

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年3月9日(09.03.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/032952 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/20 (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)
C12P 7/6458 (2022.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/032516

(22) 国際出願日: 2022年8月30日(30.08.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-139674 2021年8月30日(30.08.2021) JP

(71) 出願人: 天野 エンザイム 株式会社 (AMANO ENZYME INC.) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 松田 貫暉 (MATSUDA Kanki); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP). 楊明紅(YANG Minghong); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP). 児玉 侑朔(KODAMA Yusaku); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP). 田伏 志帆(TABUSE Shiho); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザード目6番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: ENZYMATIC AGENT FOR TRANSESTERIFICATION CONTAINING LIPASE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: リパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing an enzymatic agent for transesterification that contains as an active ingredient a lipase having excellent thermostability and high 1,3-position specificity. The present invention provides an enzymatic agent for transesterification that contains as an active ingredient a lipase comprising an amino acid sequence having 90% or more sequence identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4.

(57) 要約: 本発明の課題は、耐熱性に優れ、1, 3位特異性が高いリパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤を提供することである。本発明によれば、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤が提供される。



WO 2023/032952 A1

明 細 書

発明の名称：

リパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤

技術分野

[0001] 本発明は、リパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤及びその用途に関する。

背景技術

[0002] 油脂の物性の改質方法としては、化学的エステル交換と酵素的エステル交換の2つがある。しかし、化学的エステル交換は環境負荷が高いことから、酵素的エステル交換への期待が高まっている。油脂の酵素的エステル交換のための酵素としては、エステル交換能を有する一部のリパーゼを使用することができる。

[0003] 油脂の酵素的エステル交換には、キャンディダ属 (*Candida*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、フミコーラ属 (商品名：ノボザイム社、Lipozyme TL IM) 等の由来のリパーゼが利用できるとされているが、食品用途に実用できる酵素は少ない。

[0004] 一方、特許文献1には、*Talaromyces thermophilus*由来リパーゼが記載されており、バイオ燃料の合成反応（オレイン酸ブチル合成）の触媒、及びエステル化反応の触媒として使用することが記載されている。非特許文献1には、*Talaromyces thermophilus*由来リパーゼが記載されており、バイオ燃料の合成反応（脂肪酸メチルエステル合成）の触媒として使用することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：チュニジア特許出願番号TN/P/2011/193

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Gene Volume 494, Issue 1, 15 February 2012, Pages 112-11

8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記の通り、油脂の物性を酵素的エステル交換により改質することが検討されている。ステアリン酸及びパルミチン酸を構成脂肪酸として有する油脂は常温で固体であることから、反応時に油脂を融点以上の温度に維持して反応させる必要がある。リパーゼは一般的に熱安定性が低いことから、より耐熱性に優れたリパーゼの開発が求められている。さらに1, 3位特異性が高いリパーゼの開発も求められている。

[0008] 本発明は、耐熱性に優れ、1, 3位特異性が高いリパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤を提供することを解決すべき課題とする。本発明はさらに、上記のエステル交換用酵素剤を用いた改質された油脂の製造方法を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討し、1万株以上の菌株ライブラリーから耐熱性リパーゼをスクリーニングした結果、*Talaromyces thermophilus* NBRC 31798T株 (*Thermomyces dubautii* NBRC 31798T株と称する場合もある) 由来の耐熱性リパーゼ2種類を見出すことにより、本発明を完成するに至った。本発明によれば以下の発明が提供される。

[0010] <1> 配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤。

<2> リパーゼが、タラロマイセス (サーモマイセスと称する場合もある) 属細菌由来である、<1>に記載の酵素剤。

<3> リパーゼが、タラロマイセス・サーモフィラス (サーモマイセス・デュポンティと称する場合もある) 由来である、<1>又は<2>に記載の酵素剤。

<4> <1>から<3>の何れかーに記載の酵素剤を油脂に作用させることを含む、エステル交換された油脂の製造方法。

<5> 酵素剤を60℃以上の温度において油脂に作用させる、<4>に記載の方法。

<6> 配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列と99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼであって、50mM PIPES緩衝液(pH7.0)中で70℃で30分処理後も酵素活性が残存する、リパーゼ。

<7> 以下のステップ(1)及び(2)を含んでなる、リパーゼの製造法：

(1) <6>に記載のリパーゼの産生能を有する微生物を培養するステップ；

(2) 培養後の培養液及び／又は菌体より、リパーゼを回収するステップ；

<8> 微生物が、タラロマイセス・サーモフィラス(サーモマイセス・デュポンティと称する場合もある)NBRC31798T株である、<7>に記載の製造法。

発明の効果

[0011] 本発明のエステル交換用酵素剤におけるリパーゼは、耐熱性が高く、かつ1, 3位特異性が高い。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、耐熱性評価の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] <1>エステル交換用酵素剤及びその有効成分(リパーゼ)

本発明のエステル交換用酵素剤は、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼを有効成分として含有する。

[0014] 本発明におけるリパーゼは、好ましくは、Talaromyces属又はThermomyces

属細菌に由来するリパーゼであり、より好ましくはタラロマイセス・サーモフィラス (*Talaromyces thermophilus*) (サーモマイセス・デュポンティ (*Thermomyces dupontii*) と称する場合もある) に由来するリパーゼである。「タラロマイセス・サーモフィラス (*Talaromyces thermophilus*) に由来するとは、タラロマイセス・サーモフィラスに分類される微生物 (野生株であっても変異株であってもよい) が生産するリパーゼ、あるいはタラロマイセス・サーモフィラス (野生株であっても変異株であってもよい) のリパーゼ遺伝子を利用して遺伝子工学的手法によって得られたリパーゼであることを意味する。従って、タラロマイセス・サーモフィラスより取得したリパーゼ遺伝子 (又は当該遺伝子を改変した遺伝子) 又はそれと等価な塩基配列を有する遺伝子を導入した宿主微生物によって生産された組み換え体も、タラロマイセス・サーモフィラスに由来するリパーゼに該当する。本酵素がそれに由来することになるタラロマイセス・サーモフィラス (のことを、本酵素の由来菌という。また、本酵素を生産するために用いた微生物 (タラロマイセス・サーモフィラス、宿主微生物) を生産菌という。

[0015] タラロマイセス・サーモフィラスの具体例は、*Talaromyces thermophilus* NBRC 31798T株である。NBRC 31798T株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) に保存された菌株 (NBRC CultureカタログにNBRC 31798Tとして掲載されている) であり、所定の手続を経ることにより、入手することができる。

[0016] NBRC 31798T株が産生するリパーゼのアミノ酸配列 (配列番号2及び配列番号4) が決定された。本発明におけるリパーゼの一態様は、配列番号2又は配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質からなる。一般に、あるタンパク質のアミノ酸配列の一部に改変を施した場合において改変後のタンパク質が改変前のタンパク質と同等の機能を有することがある。即ちアミノ酸配列の改変がタンパク質の機能に対して実質的な影響を与えず、タンパク質の機能が改変前後において維持されることがある。本発明においては、配列番号2又は配列番号4に示すアミノ酸配列と等価なアミノ酸配

列からなり、エステル交換活性を有するタンパク質（以下、「等価タンパク質」ともいう）を使用してもよい。

[0017] 本発明は、油脂のエステル交換に有用な酵素剤（エステル交換用酵素剤）に関する。本発明の酵素剤（以下、「本酵素剤」とも呼ぶ）は有効成分としてエステル交換リパーゼ（以下、「本酵素」とも呼ぶ）を含有する。有効成分のエステル交換リパーゼ、即ち本酵素は、配列番号 2 又は配列番号 4 に示すアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列からなる。

[0018] 「等価なアミノ酸配列」とは、基準のアミノ酸配列（配列番号 2 のアミノ酸配列又は配列番号 4 のアミノ酸配列）と一部で相違するが、当該相違がタンパク質の機能（ここではエステル交換能）に実質的な影響を与えていないアミノ酸配列のことをいう。従って、等価なアミノ酸配列を有する酵素はエステル交換反応を触媒する。活性の程度は、エステル交換リパーゼとしての機能を発揮できる限り特に限定されない。但し、基準となるアミノ酸配列からなる酵素と同程度又はそれよりも高いことが好ましい。

[0019] 「アミノ酸配列の一部の相違」は、例えば、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の中の 1 又は複数のアミノ酸の欠失、置換、アミノ酸配列に対して 1 又は複数のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの任意の組合せによって生じる。アミノ酸配列の一部の相違はエステル交換活性が保持される限り許容される（活性の多少の変動があってもよい）。この条件を満たす限り、アミノ酸配列の相違する位置は特に限定されない。また、アミノ酸配列の相違が複数の箇所（場所）で生じていてもよい。

[0020] アミノ酸配列の一部の相違をもたらすアミノ酸の数は、アミノ酸配列を構成する全アミノ酸の例えば約 30%未満に相当する数であり、好ましくは約 20%未満に相当する数であり、より好ましくは約 15%に相当する数であり、更に好ましくは約 10%未満に相当する数であり、更に更に好ましくは約 7%未満に相当する数であり、更に更に更に好ましくは約 5%未満に相当する数であり、一層好ましくは約 3%未満に相当する数であり、より一層好ましくは約 2%未満に相当する数であり、最も好ましくは約 1%未満に相当

する数である。従って、等価タンパク質は、基準のアミノ酸配列と例えば約 70%以上、好ましくは約 80%以上、より好ましくは約 85%以上、更に好ましくは約 90%以上、更に更に好ましくは約 93%以上、更に更に更に好ましくは約 95%以上、一層好ましくは約 97%以上、より一層好ましくは約 98%以上、最も好ましくは約 99%以上の同一性を有する。

[0021] 「アミノ酸配列の一部の相違」の典型例の一つは、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の中の 1~40 個（好ましくは 1~30 個、より好ましくは 1~10 個、更に好ましくは 1~7 個、更に更に好ましくは 1~5 個、より一層好ましくは 1~3 個）のアミノ酸の欠失、置換、アミノ酸配列に対して 1~40 個（好ましくは 1~30 個、より好ましくは 1~10 個、更に好ましくは 1~7 個、更に更に好ましくは 1~5 個、より一層好ましくは 1~3 個）のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることである。

[0022] 好ましくは、エステル交換能に必須でないアミノ酸残基において保存的アミノ酸置換が生じることによって等価なアミノ酸配列が得られる。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0023] 二つのアミノ酸配列の同一性（%）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一

の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるといえる。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（すなわち、同一性（％）＝同一位置の数／位置の総数×１００）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数およびサイズも考慮に入れる。

[0024] 二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。アミノ酸配列の同一性は例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のblastp(protein-protein BLAST)により得ることが出来る。パラメータはデフォルトのパラメータを用いれば良いが、例えばBLOSUM62マトリックスを使用してGap CostsをExistence:11、Extension:1に設定すればよい。

[0025] 本酵素剤の有効成分であるエステル交換リパーゼ、即ち本酵素が、より大きいタンパク質（例えば融合タンパク質）の一部であってもよい。融合タンパク質において付加される配列としては、例えば、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、組み換え生産の際の安定性を確保する付加配列等が挙げられる。

[0026] 本酵素剤の有効成分である本酵素はエステル交換反応を触媒する。エステル交換反応とは、エステル化合物における酸基（カルボン酸基）を他の酸（カルボン酸）に交換する反応のことを言い、エステル化反応（カルボン酸とアルコールからエステルを生成する反応）とは区別される。本発明におけるエステル交換反応とは、受容体基質（油脂（トリグリセリド）、グリセリン脂肪酸エステル（ジグリセリド、モノグリセリド））を構成する脂肪酸残基

と供与体基質（脂肪酸、エステル化合物（脂肪酸エステルなど）若しくは油脂（受容体基質と同じでもよい））の脂肪酸を交換する反応のことを言う。

[0027] 本酵素剤を油脂、油脂加工品等の物性の改質・改良に利用すれば、融点が高い油脂に対して、エステル交換が可能となり、処理前とは異なる脂肪酸組成（特に2位の脂肪酸が異なる組成）の油脂になることによる品質の向上（所望の物性の獲得）が期待できる。

[0028] 本酵素剤における有効成分（本酵素）の含有量は特に限定されないが、例えば、本酵素剤1g当たりの酵素活性が1U～100000U、好ましくは10U～30000Uになるように有効成分の含有量を設定ないし調整することができる。本発明の酵素剤は通常、固体状（例えば、顆粒、粉体、或いはシリカや珪藻土、また多孔質ポリマー等の担体表面又は内部に酵素を固定させうる素材に当該酵素を固定化した固定化酵素）又は液体状で提供される。

[0029] 本酵素剤は、有効成分（本酵素）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などを含有していてもよい。賦形剤としては乳糖、ソルビトール、D-マンニトール、マルトデキストリン、白糖等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

[0030] 本発明はさらに、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列と99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼであって、50mM PIPES緩衝液（pH7.0）中で70℃で30分処理後も酵素活性が残存する、リパーゼに関する。本発明はさらに、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列からなるリパーゼに関する。

[0031] <2>本酵素の製造方法

本酵素は、エステル交換リパーゼを産生する微生物（エステル交換リパー

ゼ産生株)を培養することにより得ることができる。

[0032] 本発明のリパーゼの製造法は、以下のステップ(1)及び(2)を含んでいてもよい。

(1) 配列番号2又は配列番号4のアミノ酸配列と99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼであって、50mM PIPES緩衝液(pH7.0)中で70℃で30分処理後も酵素活性が残存するリパーゼの産生能を有する微生物を培養するステップ;

(2) 培養後の培養液及び／又は菌体より、リパーゼを回収するステップ。

[0033] エステル交換リパーゼ産生株は野生株であっても変異株(例えば紫外線照射によって変異株が得られる)であってもよい。本酵素の産生株の具体例は、タラロマイセス・サーモフィラス(*Talaromyces thermophilus*)NBRC31798T株である。変異株は、紫外線、X線、 γ 線などの照射、亜硝酸、ヒドロキルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどによる処理等によって得ることができる。変異株は、本酵素を産生する限り限定されない。変異株として、本酵素の生産性が向上した株、夾雑物の生産性が低減した株、培養が容易になった株、培養液からの回収が容易になった株などが挙げられる。

[0034] 本酵素の製造方法としては、本酵素を産生する微生物を培養するステップ(ステップ(1))と培養後の培養液及び／又は菌体よりリパーゼを回収するステップ(ステップ(2))を行うことができる。

[0035] 培養条件や培養法は、本酵素が生産されるものである限り特に限定されない。即ち、本酵素が生産されることを条件として、使用する微生物の培養に適合した方法や培養条件を適宜設定できる。培養法としては液体培養、固体培養のいずれでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養を例にとり、その培養条件を説明する。

[0036] 培地としては、使用する微生物が生育可能な培地であれば、特に限定されない。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アン

モニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、あるいは、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものを用いることができる。使用する微生物の生育を促進するためにビタミン、アミノ酸などを培地に添加してもよい。培地のpHは例えば約3~8、好ましくは約4~7程度に調整し、培養温度は通常約20~40℃、好ましくは約25~35℃程度で、1~20日間、好ましくは3~10日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーメンターによる好氣的深部培養法が利用できる。

[0037] 以上の条件で培養した後、培養液又は菌体より目的の酵素を回収する（ステップ(2)）。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理等することによって不溶物を除去した後、限外ろ過膜による濃縮、硫酸沈殿等の塩析、透析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

[0038] 本酵素は、遺伝子工学的手法によっても容易に調製することができる。例えば、本酵素をコードするDNA（一例として、配列番号2のアミノ酸配列からなる本酵素をコードするDNA配列を配列番号1に、配列番号4のアミノ酸配列からなる本酵素をコードするDNA配列を配列番号3にそれぞれ示す）で適当な宿主細胞（例えば大腸菌）を形質転換し、形質転換体内で発現されたタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜精製される。このように組換えタンパク質として本酵素を得ることにすれば種々の修飾が可能である。例えば、本酵素をコードするDNAと他の適当なDNAとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタ

ンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなる本酵素を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはN末端若しくはC末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0039] 通常は、以上のように適当な宿主－ベクター系を利用して遺伝子の発現～発現産物（本酵素）の回収を行うが、無細胞合成系を利用することにしてもよい。ここで、「無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）」とは、生細胞を用いるのではなく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAやタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞合成系では一般に、細胞破砕液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

[0040] タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する3種類の開始因子、3種類の伸長因子、終結に關与する4種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる31種類の因子の遺伝子が大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

[0041] 用語「無細胞転写／翻訳系」は、無細胞タンパク質合成系、in vitro翻訳系又はin vitro転写／翻訳系と交換可能に使用される。in vitro翻訳系ではR

NAが鋳型として用いられてタンパク質が合成される。鋳型RNAとしては全RNA、mRNA、in vitro転写産物などが使用される。他方のin vitro転写／翻訳系ではDNAが鋳型として用いられる。鋳型DNAはリボソーム結合領域を含むべきであって、また適切なターミネータ配列を含むことが好ましい。尚、in vitro転写／翻訳系では、転写反応及び翻訳反応が連続して進行するように各反応に必要な因子が添加された条件が設定される。

[0042] 上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥や真空乾燥或いはスプレードライなどにより粉末化して提供することも可能である。その際、精製酵素を予め酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、トリス塩酸緩衝液やG00Dの緩衝液に溶解させておいてもよい。好ましくは、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液を使用することができる。尚、ここでG00Dの緩衝液としてはPIPES、MES又はMOPSが挙げられる。

[0043] 酵素の精製度は特に限定されないが、例えば加水分解活性の比活性が1～10000 (U/ μ g)、好ましくは比活性が10～20000 (U/ μ g) の状態に精製することができる。また、最終的な形態は液体状であっても固体状（粉体状を含む）であってもよい。

[0044] <3>本酵素剤／本酵素の用途（油脂のエステル交換法）

本発明によれば、本酵素剤を油脂に作用させることを含む、エステル交換された油脂の製造方法が提供される。即ち、本発明によれば、本酵素剤を用いた油脂のエステル交換法が提供される。本発明のエステル交換法では本酵素剤又は本酵素を油脂に作用させるステップを行い、当該ステップによって油脂のエステル交換、即ち、油脂中のトリアシルグリセロール（TG又はTAGと略称される）の構成脂肪酸を再編成（再配列）させる。

[0045] 本発明のエステル交換法によって処理可能な油脂として、大豆油、ナタネ油、米油、コーン油、ひまわり油、綿実油、落花生油、サフラワー油、パーム油、パーム軟質油、パーム分別油、パーム核油、ヤシ油、カカオバター等の植物油脂、魚油、ラード、牛脂、乳脂等の動物油脂及びこれらの分別油、

硬化油、トリラウリン、トリオレイン、トリパルミチン等の合成油脂を例示することができる。本発明のエステル交換法は、油脂同士のエステル交換の他、油脂と脂肪酸又は脂肪酸エステルとの間のエステル交換に利用可能である。脂肪酸の例はステアリン酸、パルミチン酸、ラウリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、オレイン酸、リノール酸であり、脂肪酸エステルの例はステアリン酸エチル、パルミチン酸エチル、オレイン酸エチル、リノール酸エチルである。

[0046] 本発明のエステル交換法では、本酵素剤又は本酵素を油脂に添加し、例えば10～110℃、20～110℃、30～105℃、40～105℃、好ましくは50～100℃、より好ましくは60℃～100℃、さらに好ましくは70℃～100℃、一層好ましくは80℃～100℃の条件下、所定時間（例えば10分～72時間、1時間～48時間、2時間～24時間）反応させる。反応を促進させるために、反応中は攪拌するとよい。

[0047] 本酵素剤又は本酵素を固定化処理に供し、固定化酵素による反応を行うことにしてもよい。固定化酵素による反応には、回分式攪拌槽型反応器、流通式攪拌槽型反応器、充填層型反応器、流動層型反応器等を利用できる。

[0048] 本発明のエステル交換法は油脂又は油脂加工品（例えばショートニング、マーガリン、カカオバター代替脂）の物性の改質・改良に有用である。例えば、展延性の向上、エマルジョン安定性の向上、固体脂含有値（SFC）の最適化、固化性の向上、特定の脂肪酸の選択的濃縮、低トランス酸油脂又は低トランス酸油脂加工品の製造等を目的として、本発明のエステル交換法を適用することができる。本発明のエステル交換法を適用して得られる油脂又はそれを含む油脂加工品は、処理前に比して物性に改善を認め、産業上の利用価値が高い。

[0049] 本発明のエステル交換法によればエステル交換油脂を製造することができる。即ち、本発明はエステル交換油脂の製造方法も提供することになる。典型的には、本発明のエステル交換油脂の製造方法では、受容体基質（油脂（トリグリセリド）、グリセリン脂肪酸エステル（ジグリセリド、モノグリセ

リド)) と供与体基質 (脂肪酸、エステル化合物 (脂肪酸エステルなど) 若しくは油脂 (受容体基質と同じでもよい)) を準備し、本酵素剤又は本酵素を作用させる (即ち受容体基質と供与体基質の存在下での酵素反応を行う) 。受容体基質や供与体基質に使用される油脂、脂肪酸、脂肪酸エステルは上記のものを使用することができる。酵素反応の条件は上記の条件 (例えば 30 ~ 100℃、好ましくは 40 ~ 100℃、より好ましくは 60℃ ~ 100℃、さらに好ましくは 70 ~ 90℃の条件下、所定時間 (例えば 1 時間 ~ 48 時間) 反応させる) を採用することができる。本発明の一例によれば、受容体基質としてトリオレイン (O O O) (O : オレイン酸)、および供与体基質としてステアリン酸又はステアリン酸メチルを準備する工程と、準備した受容体基質と供与体基質に本酵素剤又は本酵素を 40 ~ 100℃、好ましくは 60 ~ 100℃、より好ましくは 70 ~ 90℃の条件下で作用させる工程を含む、カカオバターの主成分となる、S O S 脂 (S : ステアリン酸、O : オレイン酸) の製造方法が提供される。S O S 脂とは、グリセリンにステアリン酸 (S) とオレイン酸 (O) が S O S の順に結合したトリグリセリドである。

実施例

[0050] 実施例 1 : 配列の決定

<サザンブロットィング用 TDL2 遺伝子プローブの調製>

鋳型として、*Talaromyces thermophilus* N B R C 3 1 7 9 8 T のゲノム DNA を用いて、表 1 のプライマーを設計して PCR DIG Synthesis kit (Roche 社製) を用いた PCR ラベリングにて TDL2 遺伝子プローブを調製した。

[0051] [表 1]

表 1. プライマー配列		
プライマー-F1	5 '-ATGAGGAGCTCCCTGTGTGCTTCTTCATCTCTGC-3'	(配列番号 7)
プライマー-R1	5 '-TTAATCACACTCTGCAATGGCTCCAAAGTACCAT-3'	(配列番号 8)

[0052] *Talaromyces thermophilus* N B R C 3 1 7 9 8 T のゲノム DNA を BamHI にて

37℃、一晩処理したサンプルと、TDL2遺伝子プローブを用いて、サザンブロッティングを行った結果、2本のバンドを検出した。約3.0kbpのバンドがTDL2遺伝子の全長を含んだ断片であり、約5.0kbpのバンドについては、TDL1の全長を含んだ断片が検出されたと推測した。TDL1遺伝子およびTDL2遺伝子のそれぞれが含まれると考えられる約5.0kbpおよび約3.0kbpの各断片を用いて、ライゲーション反応を行い、DNAを自己環化させた。

[0053] TDL1遺伝子を含むDNA断片の増幅を行うため、自己環化させたDNA（約5.0kbp）をテンプレートとして用いて、表2のプライマーF2およびプライマーR2にてPCRを行った。

TDL2遺伝子を含むDNA断片の増幅を行うため、自己環化させたDNA（約3.0kbp）をテンプレートとして用いて、表2.のプライマーF3およびプライマーR3にてPCRを行った。

増幅したDNA断片を精製し、シーケンス解析を行った。

[0054] [表2]

表2. プライマー配列		
プライマーF2	5' -AGGGGTGTCTAATACACAGACCAACAGTTCT-3'	(配列番号9)
プライマーR2	5' -GCACATTTCCACATGACCGCTCCACGGGGATCA-3'	(配列番号10)
プライマーF3	5' -GGAATCTCATCGTCGGTCTGCGAGATATCGA-3'	(配列番号11)
プライマーR3	5' -CGATCCAGTTCTCTATTGAGCGAGAGCCGCGGA-3'	(配列番号12)

[0055] 判明したTDL1遺伝子およびTDL2遺伝子の配列は表3に記載し、判明したTDL1遺伝子およびTDL2遺伝子の配列をもとに翻訳したアミノ酸配列は表4に記載する。

[0056]

[表3]

表 3. TDL1 遺伝子および TDL2 遺伝子の配列
TDL1 遺伝子の DNA 配列（イントロンを含む配列）（配列番号 5） ATGAGGAGCTCGCTCGTGTCTTCTGCGTGGACGGCCTTGGCCAGTCTGTCCGACGAGGTATGTAAATCACGGGGTA TACTTTTCATGCATTGCATGTGGAACCTGCTGTACTAAGATTGCGCGCACAGAGGTCTCGCAGGATCTGTTTGACCAGTTCAACCT CTTTGCGCAGTACTCGGCGGCCGATACTGCGCGAAGAACAACGATGCCCCGGCAGGTGGGAACGTAACGTGCAGGGGAAGTATTT GCCCCGAGGTAGAGAAGGCGGATGCAACGTTTCTCTACTCGTTTGAGGAGTAGGTGTCAACAAGAGTACAGGCACCCGTAGTAGAA ATAGCAGACTAACTGGGAAATGTAGTTCTGGAGTTGGCGATGTACCGGGTTCCTTGCTCTCGACAACGAAACAGACTGATCGTC CTCTCTTTCCGCGCTCTCGTTCCCTGGAAACTGGATCGGAATATCAACTTGGACTTGAAAGGAATTGACGACATCTGCTCTGG CTGCAAGGGACATGACGGCTTCACTTCCTCCTGGAGTCCGTTGCCAATACCTTGACTCAGCAAGTGCAGAATGCTGTGAGGGAGC ATCCCGACTACCGCTCGTCTTCACTGGGCACAGCTTGGGTGGTGCAATTGGCAACTGTGGCCGGGCATCTCTGCGTGGAAATGGG TACGATATAGATGTGGTATGTAGGAAAAATGATCCCGTGGAGCGGTATGTGGAAATGTGCAGGGGTGTCTAATACAGACCAA CAGTTCTCATATGGCGCTCCCCGCTCGGAAACAGGGCTTTTGGGAATTCTGACCGCACAGACGGCGGCACCTTGTACCGCAT CACCACACCAATGATATTGTCCCAGACTCCCGCCAGCGAATTGGGTTACAGCCATTCTAGCCAGAGTATTGGATCAAGCTGTG GAACCTCGTCCAGTGACCAAGAACGATATCGTCAAGGTGGAGGGCATCGATTCCACCGATGGAAACAACAGCCAAATACCCCG GACATTGTGTCGCACCTATGGTACTTCGGGTCAATGGCGACGTGTTTGTA
TDL2 遺伝子の DNA 配列（イントロンを含む配列）（配列番号 6） ATGAGAGGTTTTCTCGTGTCTTCTTCATCTCTGCGTGGACGGCCTTGGCCAGGCTGTTCCGACGAGGTATGGAATCAAGGGACAC TTTCATGCATTGCATGTTGAACCTGCTGTTCTAAGATTGTTGCGCGAGAAGTCTCGCAGGATCTGCTCGATCTGTTCAACCTCTTT GCACAATACTCGGCAGCCGCTACTGCGCGGAAAACAACGACGCTCCAGTGGGCTCGAACGTAACGTGCTCGGAGAATGTCTGTCC CAAGGTAGAGGAGGCGGACGCAACATTCTCTATTCTTTTGAAGAGTGGGTGTGACGAATATACAAAGACAGTACCTAGTCTAAC TGGGAAATATGTATATATAGTTCTGGACTGGGCGATGTACCGGCTTCTCGCGCTCGACAACGAAACAACTGATCGTCCTTGC TTTCCGCGGCTCTCGCTCAATAGAGAACTGGATCGGAATCTCATCGTCCGTCTGCGAGATATCGACGATATCTGCTCCGGCTGCG AGGGGCATACCGGCTTCGTGGCTTCCTGGAAGTCCGTAGCCAATACCTGAGAGGACAGGTGAGAATGCCGTGAAGGAGCATCCC GACTACCGCTGGTCTTCACAGGACATAGTTTGGGTGGTGCATGGCAACCAATTGCTGGAGCCGCTCTGCGTGGGAATGGGTATAA TATCGACGTGGTATGTGGAAATAGTTCCCCAGACAACGATCATGTGGAAACGTGCAGGGGTGTCTAATACAGGACCAACAGTTCT CATATGGCGCCCCCGCTCGGCAACAGGGCTTTTGCAGAATTTCTGACCGCACAGACCGGTGGACCCCTGTACCGCATACCCAC ACCAATGATATTGTCCCAGACTCCACCGCGAGACTGGGGTTACAGTCACTCCAGCCAGAGTACTGGATCACGTCCGGCAATGA CGCCCCAGTGACCGCAACGATATCGTCAAGGTGGAGGGCATTGATTCCACCGACGGTAACAACCAGCCGAATATCCCGGACATTC CTTCACATCTATGGTACTTTGGAGCCATTGCAGAGTGTGATTAA

[0057]

[表4]

表 4. TDL1 および TDL2 のアミノ酸配列
TDL1 のアミノ酸配列 (配列番号 2) MRSSLVLFFVSAWTALASPVRREVSQDLFDQFNLFQAQYSAAYCAKNDAPAGGNVTCRGSICPEVEKADATFLYSFEDSGVGDVT GFLALDNTNRLIVLSFRGSRSLNWNINLDLKGIDDCSGCKGHDGFTSSWRSVANTLTQQVQNAVREHPDYRVVFTGHSLGGA LATVAGASLRNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTAQTGGTLYRITHITNDIVPRLPPRELGYSHSSPEYWITSGTLVPVTKNDIV KVEGIDSTDGNNQNPNTPTIAAHLWYFGSMATCL
TDL2 のアミノ酸配列 (配列番号 4) MRGFLVLFFISAWTALARPVREVSQDLDFNLFAQYSAAYCAENNDAPVGSNVTCSENVCPKVEEADATFLYSFEDSGLGDVT GLLALDNTNKLIVLAFRGSRSIENWIGNLIVGLRDEDDICSGCEGHTGFVASWKSVAANTLRQVENAVKEHPDYRVVFTGHSLGGA LATIAGAAIRNGYNTDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTAQTGGTLYRITHITNDIVPRI.PPRDWGYSHSSPEYWITSGNDAPVTANDIV KVEGIDSTDGNNQNPNDIPSHLWYFGAIAECD

[0058] 判明した耐熱性リパーゼ遺伝子をもとに、FGENESH (FGENESH - HMM-based gene structure prediction (softberry.com)) にてcDNA配列を推定した。

[0059] TDL1のcDNA配列 (配列番号 1)

ATGAGGAGCTCGCTCGTGCTGTTCTTCGTTTCTGCGTGGACGGCCTTGCCAGTCCTGTCCGACGAGAG
GTCTCGCAGGATCTGTTTGACCAGTTCAACCTCTTTGCGCAGTACTCGGCGGCCGCATACTGCGCGAAG
AACAACGATGCCCCGGCAGGTGGGAACGTAACGTGCAGGGGAAGTATTTGCCCCGAGGTAGAGAAGGCG
GATGCAACGTTTCTCTACTCGTTTGAGGATTCTGGAGTTGGCGATGTCACCGGGTTCCTTGCTCTCGAC
AACACGAACAGACTGATCGTCCTCTCTTTCCGCGGCTCTCGTTCCCTGGAAAACCTGGATCGGGAATATC
AACTTGACTTGAAAGGAATTGACGACATCTGCTCTGGCTGCAAGGGACATGACGGCTTCACTTCCTCC
TGGAGGTCCGTTGCCAATACCTTGACTCAGCAAGTGCAGAATGCTGTGAGGGAGCATCCCGACTACCGC
GTCGTCTTCACTGGGCACAGCTTGGGTGGTGCATTGGCAACTGTGGCCGGGGCATCTCTGCGTGAAAT
GGGTACGATATAGATGTGTTCTCATATGGCGCTCCCCGCGTCGGAAACAGGGCTTTTGCGGAATTCCTG
ACCGCACAGACCGGGCGGCACCTTGACCGCATCACCCACACCAATGATATTGTCCCCAGACTCCCGCCA
CGCGAATTGGGTACAGCCATTCTAGCCCAGAGTATTGGATCACGTCTGGAACCCTCGTCCCAGTGACC
AAGAACGATATCGTCAAGGTGGAGGGCATCGATTCCACCGATGGAAACAACCAGCCAAATACCCCGGAC
ATTGCTGCGCACCTATGGTACTTCGGGTCAATGGCGACGTGTTTGTA

[0060] TDL2のcDNA配列 (配列番号 3)

ATGAGAGGTTTTCTCGTGCTGTTCTTCATCTCTGCGTGGACGGCCTTGCCAGGCCTGTTGACGAGAA
GTCTCGCAGGATCTGCTCGATCTGTTCAACCTCTTTGCACAATACTCGGCAGCCGCCTACTGCGCGGAA
AACACGACGCTCCAGTGGGCTCGAACGTAACGTGCTCGGAGAATGTCTGTCCCAAGGTAGAGGAGGCG
GACGCAACATTCTCTATTCTTTGAAGATTCTGGACTGGGCGATGTCACCGGCCTTCTCGCGCTCGAC
AACACGAACAACTGATCGTCCTTGCTTTCCGCGGCTCTCGCTCAATAGAGAACTGGATCGGGAATCTC
ATCGTCGGTCTGCGAGATATCGACGATATCTGCTCCGGCTGCGAGGGGCATACCGGCTTCGTGGCTTCC
TGGAAGTCCGTAGCCAATACCCTGAGAGGACAGGTCGAGAATGCCGTGAAGGAGCATCCCGACTACCGC
GTGGTCTTCACAGGACATAGTTTGGGTGGTGCACTGGCAACCATTGCTGGAGCCGCTCTGCGTGGAAT
GGGTATAATATCGACGTGTTCTCATATGGCGCCCCCGCGTCGGCAACAGGGCTTTTGCAGAATTTCTG
ACCGCACAGACCGGTGGCACCCTGTACCGCATCACCCACACCAATGATATTGTCCCAGACTCCCACCG
CGAGACTGGGGTTACAGTCACTCCAGCCCAGAGTACTGGATCACGTCCGGCAATGACGCCCCAGTGACC
GCAAACGATATCGTCAAGGTGGAGGGCATTGATTCCACCGACGGTAACAACCAGCCGAATATCCCGGAC
ATTCCTTCACATCTATGGTACTTTGGAGCCATTGCAGAGTGTGATTAA

[0061] 実施例 2 ; 耐熱性の評価

<精製酵素の調製>

Talaromyces thermophilus NBRC 31798T をオートクレーブした小麦ふすま培地で固体培養（40℃、4日間培養）して得られた培養液をろ過後、20mMリン酸緩衝液（pH8.0）と1.0M塩化ナトリウム含有20mMリン酸緩衝液（pH8.0）のリニアグラジエント条件にて陰イオン交換クロマトグラフィー（GE Healthcare製HiPrep DEAE FF）を行った後、1.0M硫酸アンモニウム含有20mMリン酸緩衝液（pH7.0）と20mMリン酸緩衝液（pH7.0）のリニアグラジエント条件にて疎水性クロマトグラフィー（GE Healthcare製Hitrap Butyl FF）によって精製酵素を得た。

[0062] <熱処理>

TDL1およびTDL2の精製酵素をcOmplete ULTRA Tablets（Roche社製プロテインインヒビター）を含む、50mM PIPES緩衝液（pH7.0）を使用し2倍希釈後、水浴にて熱処理（70℃ あるいは 100℃ 30分間）を行い、熱処理サンプルとした。

[0063] 実施例3：リパーゼのトリオレイン加水分解活性の確認方法

＜方法＞

シリカゲルカラムを用いて、ヒマワリ油からトリオレインを分取後、ポリビニルアルコール溶液と混合し、乳化した。乳化トリオレイン溶液に各サンプルを添加し、加水分解反応（40℃、1時間）を行った。反応液に酢酸エチルを添加し、トリオレインおよび反応生成物（ジオレイン、モノオレイン、オレイン酸）を抽出した。抽出液をクロロホルム：アセトン＝96：4の展開溶媒条件にて薄層クロマトグラフィーによる分離・検出を行った。

[0064] ＜結果＞

耐熱性評価の結果（図1）、TDL1は70℃処理サンプルにおいても、反応生成物（ジオレイン、オレイン酸）が確認できることから、70℃で30分間処理後も活性が残存していることが判明した。

[0065] 一方、TDL2は70℃および100℃処理サンプルにおいても、反応生成物（ジオレイン、オレイン酸）が確認できることから、70℃および100℃で30分間処理後も活性が残存しており、高い耐熱性を持つことが確認できている。

[0066] 実施例4：リパーゼのエステル交換活性の確認

＜組換え酵素発現株の取得＞

タラロマイセス・サーモフィラス NBRC 31798T（サーモマイセス・デュポンティ NCBI：txid28565）のゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、TDL1遺伝子（配列番号5）およびTDL2遺伝子（配列番号6）を増幅した。増幅したDNAを糸状菌発現ベクター（*Aspergillus oryzae*由来 α -アミラーゼ改変プロモーター、*Aspergillus oryzae*由来FAD-GDHのターミネーター及びpyrG遺伝子を挿入したpUC19）に連結し、プロトプラストPEG法によって*A. oryzae*に導入した。

[0067] ＜組換え酵素の取得方法＞

得られた形質転換体を澱粉、酵母エキス、無機塩類を含む液体培地（pH 6.0）に接種し、30℃で90時間、通気攪拌培養した。培養上清を珪藻

土ろ過によって生産菌体除去後、限外ろ過膜で濃縮し、凍結乾燥にて酵素の乾燥粉末を得た。

[0068] <固定化酵素の調製方法>

固定化担体として珪藻土を使用した。酵素の乾燥粉末中のタンパク質量を Bradford 法キット (BIO-RAD) にて測定し、測定値をもとにタンパク質量 0.1g になるように酵素の乾燥粉末を精製水 1 mL に溶解し、酵素溶解液とした。常法に従い、固定化担体 (セライト No. 535 (Celite 社製)) に固定化し、固定化酵素 (TDL1-IM、TDL2-IM) を調整した。

[0069] <評価方法>

50 mL チューブに 3.4 g のトリオレイン (オレインリッチ、昭和産業製) と 5 g のパルミチン酸メチル (Wako 製) を加え、反応温度 (40℃、80℃) で 30 分保温した。固定化酵素として Lipzyme TL-IM (ノボザイムス社)、TDL1-IM、TDL2-IM を用いた。各固定化酵素を 0.05 g 加えた後、振とうして反応させた。20 時間後の上清を回収し反応サンプルとした。

[0070] 反応サンプルに含まれる成分をガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。1.5 mL チューブに 990 μ L ヘキサンと 10 μ L 反応サンプルを加え、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌した。0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過して GC 分析用サンプルを得た。以下の条件で GC 分析を実施した。エリア面積から全成分中のオレイン酸メチル (OAME) の比率を算出した。生成した OAME が多いほど、エステル交換反応が進んでおり、エステル交換活性が高いことを示唆する。

使用機器 : Agilent 8890 GC

カラム : DB-1HT (5m, 0.25mm, 0.10 μ m)

注入口温度 : 370℃

注入量 : 1 μ L

スプリット比 : 50

検出器温度：370℃

昇温条件：

[0071] [表5]

レート(℃/min)	温度(℃)	ホールド(min)
—	120	4
20	150	—
30	315	3
1.5	325	—
30	370	2

[0072] さらに、反応サンプルに含まれるトリグリセリド中のPOP（グリセリンの1位と3位にパルミチン酸、2位にオレイン酸がエステル結合）とPPO（グリセリンの1位と2位にパルミチン酸、3位にオレイン酸がエステル結合）の比率をHPLCで分析した。バイアルに0.9mLヘキサンと0.1mLGC分析用サンプルを加え、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌したのち、以下の条件でHPLC分析を実施した。POPとPPOのエリア面積から、 $POP / (POP + PPO)$ によってPOP比率（%）を算出した。POP比率が高いほど1, 3位特異性が高いことを示唆する。

使用機器：HPLC（Shimadzu）

カラム：Silver column KANTO 250-4.6 (5μm)

カラム温度：25℃

溶離液：Acetone/Hexane = 3/97

流速：1.0mL/min

検出：ELSD-LT II (350kPa, 40 ° C, gain 1)

注入量：20μL

[0073] <結果>

全てのリパーゼにおいてOAMEの生成が確認できた。TDL1-IMとLipozyme TL-IMは同等の生成量であり、TDL2-IMは他

の2つに比べて60％程度の生成量であった。各リパーゼを用いた場合のPOP比率（％）を表6に示す。

[0074] [表6]

反応温度	POP/(POP+PPO) (%)		
	Lipozyme TL-IM	TDL1-IM	TDL2-IM
40℃	94	89	99
80℃	77	92	95

[0075] TDL1-IM、TDL2-IMともに80℃において高いPOP比率を示した。Lipozyme TL-IMに比べて高温反応における1, 3位特異性が高いことが示唆された。

OAME生成量が同等のときの1, 3位特異性を評価するため、OAME生成量が約20％となるように各リパーゼで反応後、POP比率を評価した。上記評価方法に準じた方法で反応温度は80℃で実施した。酵素添加量や反応時間を適宜調整してOAME生成量が約20％となった時点で上清を回収した。

各リパーゼを用いた場合のPOP比率（％）を表2に示す。

[0076] [表7]

	POP/(POP+PPO) (%)
Lipozyme TL-IM	77
TDL1-IM	92
TDL2-IM	86

[0077] OAME生成量が同等のときであっても、TDL1-IM、TDL2-IMともにLipozyme TL-IMよりも高いPOP比率を示した。

産業上の利用可能性

[0078] 本発明の酵素剤は、食品や医療用途の分野での使用に適し、産業上の利用価値は高い。特に、耐熱性が高く、1, 3位特異性が高いリパーゼを含む本発明のエステル交換用酵素剤は、カカオバター代替脂製造用途において有用である。

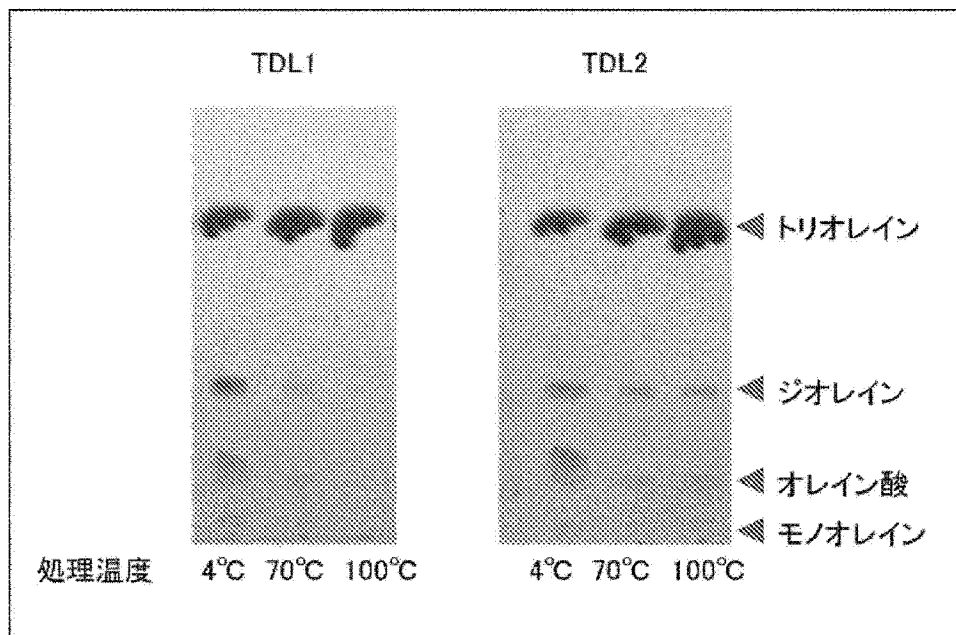
[0079] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるも

のではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文及び特許文献などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号 2 又は配列番号 4 のアミノ酸配列と 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼを有効成分として含有するエステル交換用酵素剤。
- [請求項2] リパーゼが、タラロマイセス（サーモマイセスと称する場合もある）属細菌由来である、請求項 1 に記載の酵素剤。
- [請求項3] リパーゼが、タラロマイセス・サーモフィラス（サーモマイセス・デュポンティと称する場合もある）由来である、請求項 1 又は 2 に記載の酵素剤。
- [請求項4] 請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の酵素剤を油脂に作用させることを含む、エステル交換された油脂の製造方法。
- [請求項5] 酵素剤を 60℃以上の温度において油脂に作用させる、請求項 4 に記載の方法。
- [請求項6] 配列番号 2 又は配列番号 4 のアミノ酸配列と 99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるリパーゼであって、50mM PIPES 緩衝液（pH 7.0）中で 70℃で 30 分処理後も酵素活性が残存する、リパーゼ。
- [請求項7] 以下のステップ（1）及び（2）を含んでなる、リパーゼの製造法。
（1）請求項 6 に記載のリパーゼの産生能を有する微生物を培養するステップ；
（2）培養後の培養液及び／又は菌体より、リパーゼを回収するステップ；
- [請求項8] 微生物が、タラロマイセス・サーモフィラス（サーモマイセス・デュポンティと称する場合もある）NBRC 31798 T 株である、請求項 7 に記載の製造法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/032516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 9/20</i> (2006.01)i; <i>C12P 7/6458</i> (2022.01)i; <i>C12N 15/55</i> (2006.01)n FI: C12N9/20 ZNA; C12P7/6458; C12N15/55 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N9/20; C12P7/6458; C12N15/55 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/ GeneSeq; UniProt/GeneSeq																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>ROMDHANE, Ines Belhaj-Ben et al. Gene cloning and molecular characterization of the <i>Talaromyces thermophilus</i> lipase catalyzed efficient hydrolysis and synthesis of esters. <i>Gene</i>. 2012, vol. 494, no. 1, pp. 112-118 p. 112, right column, second paragraph, p. 113, right column, seventh paragraph, p. 114, left column, fourth paragraph, p. 117, right column, second paragraph</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2004-522448 A (NOVOZYMES A/S) 29 July 2004 (2004-07-29) paragraphs [0007], [0028], example 8, table 5</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 106591258 A (XINYU UNIVERSITY) 26 April 2017 (2017-04-26) claims, paragraphs [0002], [0018]</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Database GenBank. Accession No. AEE61324. Definition: lipase [<i>Thermomyces dupontii</i>], [online]. 2012, [retrieved on 17 October 2022], <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/aee61324> DBSOURCE, ORIGIN</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	ROMDHANE, Ines Belhaj-Ben et al. Gene cloning and molecular characterization of the <i>Talaromyces thermophilus</i> lipase catalyzed efficient hydrolysis and synthesis of esters. <i>Gene</i> . 2012, vol. 494, no. 1, pp. 112-118 p. 112, right column, second paragraph, p. 113, right column, seventh paragraph, p. 114, left column, fourth paragraph, p. 117, right column, second paragraph	1-8	X	JP 2004-522448 A (NOVOZYMES A/S) 29 July 2004 (2004-07-29) paragraphs [0007], [0028], example 8, table 5	1-8	X	CN 106591258 A (XINYU UNIVERSITY) 26 April 2017 (2017-04-26) claims, paragraphs [0002], [0018]	1-8	A	Database GenBank. Accession No. AEE61324. Definition: lipase [<i>Thermomyces dupontii</i>], [online]. 2012, [retrieved on 17 October 2022], <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/aee61324 > DBSOURCE, ORIGIN	1-8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	ROMDHANE, Ines Belhaj-Ben et al. Gene cloning and molecular characterization of the <i>Talaromyces thermophilus</i> lipase catalyzed efficient hydrolysis and synthesis of esters. <i>Gene</i> . 2012, vol. 494, no. 1, pp. 112-118 p. 112, right column, second paragraph, p. 113, right column, seventh paragraph, p. 114, left column, fourth paragraph, p. 117, right column, second paragraph	1-8															
X	JP 2004-522448 A (NOVOZYMES A/S) 29 July 2004 (2004-07-29) paragraphs [0007], [0028], example 8, table 5	1-8															
X	CN 106591258 A (XINYU UNIVERSITY) 26 April 2017 (2017-04-26) claims, paragraphs [0002], [0018]	1-8															
A	Database GenBank. Accession No. AEE61324. Definition: lipase [<i>Thermomyces dupontii</i>], [online]. 2012, [retrieved on 17 October 2022], <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/aee61324 > DBSOURCE, ORIGIN	1-8															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 20 October 2022		Date of mailing of the international search report 08 November 2022															
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/032516**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIAN, Weishuai et al. Immobilized Talaromyces thermophilus lipase as an efficient catalyst for the production of LML-type structured lipids. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2019, vol. 42, no. 2, pp. 321-329 abstract	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/032516

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/032516

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2004-522448	A	29 July 2004	US 2004/0101928 A1 paragraphs [0008], [0051], example 8, table 5 WO 2002/066622 A2 EP 1404827 A2	
CN	106591258	A	26 April 2017	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 9/20(2006.01)i; C12P 7/6458(2022.01)i; C12N 15/55(2006.01)n FI: C12N9/20 ZNA; C12P7/6458; C12N15/55		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N9/20; C12P7/6458; C12N15/55		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2022年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2022年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/ GeneSeq; UniProt/GenSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	ROMDHANE, Ines Belhaj-Ben, et al., Gene cloning and molecular characterization of the Talaromyces thermophilus lipase catalyzed efficient hydrolysis and synthesis of esters, Gene, 2012, Vol. 494, No. 1, pp. 112-118 112ページ右欄第2段落、113ページ右欄第7段落、114ページ左欄第4段落、117 ページ右欄第2段落	1-8
X	JP 2004-522448 A (ノボザイムス アクティールスラブ) 29.07.2004 (2004 - 07 - 29) [0007]、 [0028]、実施例8、表5	1-8
X	CN 106591258 A (XINYU UNIVERSITY) 26.04.2017 (2017 - 04 - 26) 請求の範囲、 [0002]、 [0018]	1-8
A	Database GenBank, Accession No. AEE61324, Definition: lipase [Thermomyces dupontii], [online], 2012, [retrieved on 17-Oct-2022], <URL: https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/aee61324> DBSOURCE, ORIGIN	1-8
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 20.10.2022		国際調査報告の発送日 08.11.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 松原 寛子 4N 2564 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	LIAN, Weishuai, et al., Immobilized Talaromyces thermophilus lipase as an efficient catalyst for the production of LML-type structured lipids, Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, Vol. 42, No. 2, pp. 321-329 要約	1-8

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/032516

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2004-522448	A	29.07.2004	US 2004/0101928 A1 [0008]、[0051]、実施例 8、表 5 WO 2002/066622 A2 EP 1404827 A2	
CN	106591258	A	26.04.2017	(ファミリーなし)	