

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5504268号
(P5504268)

(45) 発行日 平成26年5月28日(2014.5.28)

(24) 登録日 平成26年3月20日(2014.3.20)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 P 7/40	(2006.01)	C 12 P 7/40 Z N A
C 11 D 3/00	(2006.01)	C 11 D 3/00
A 23 L 3/3508	(2006.01)	A 23 L 3/3508
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 A

請求項の数 36 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2011-523081 (P2011-523081)
(86) (22) 出願日	平成21年8月11日 (2009.8.11)
(65) 公表番号	特表2012-504938 (P2012-504938A)
(43) 公表日	平成24年3月1日 (2012.3.1)
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/053365
(87) 国際公開番号	W02010/019544
(87) 国際公開日	平成22年2月18日 (2010.2.18)
審査請求日	平成24年7月30日 (2012.7.30)
(31) 優先権主張番号	61/102,520
(32) 優先日	平成20年10月3日 (2008.10.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/088,673
(32) 優先日	平成20年8月13日 (2008.8.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	390023674 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・ アンド・カンパニー E. I. DU PONT DE NEMO URS AND COMPANY アメリカ合衆国、デラウエア州、ウイルミ ントン、マーケット・ストリート 100 7
(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素的過酸生成の制御

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産する方法であって、

a. 標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産させるための一式の反応成分を選択すること、ここで該反応成分は、

1) 下記の化合物の少なくとも1つ又はそれらの混合物：

i) 以下の構造

[X]_m R₅

[式中、

X は式 R₆ C(O) O のエステル基であり、R₆ は、場合によりヒドロキシル基又はC 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換される、C 1 ~ C 7 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R₆ は、場合により、R₆ が C 2 ~ C 7 の場合1つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；R₅ は、場合によりヒドロキシル基で置換される、C 1 ~ C 6 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R₅ 中の各炭素原子はそれぞれ最大で1つのヒドロキシル基又は最大で1つのエステル基を含み、ここで R₅ は、場合により、1つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；m は1から R₅ 中の炭素数までの整数である]

を有するエステルであって、

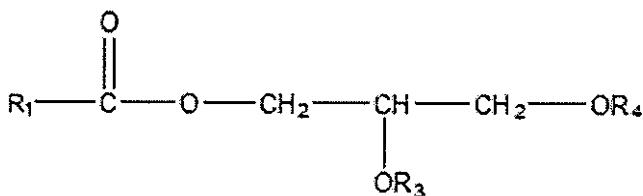
25 で水に対して少なくとも5 ppmの溶解度を有する、上記エステル；又は

10

20

ii) 以下の構造

【化1】



[式中、R₁は場合によりヒドロキシル基又はC1～C4のアルコキシ基で置換される、C1～C7の直鎖又は分岐鎖のアルキルであり、そしてR₃及びR₄はそれぞれH又はR₁、C(O)である]を有するグリセリド；又は

iii) アセチル化单糖、アセチル化二糖、又はアセチル化多糖；

2) 過酸素源；

3) ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒、ここで該酵素触媒は、C L U S T A L Wを用いると参照配列の配列番号2にアラインするCE-7シグネチャー モチーフを有する酵素を含み、該シグネチャー モチーフは、

i) 配列番号2のアミノ酸の位置118～120におけるRGQモチーフ；

ii) 配列番号2のアミノ酸の位置179～183におけるGXSQGモチーフ；及び

iii) 配列番号2のアミノ酸の位置298～299におけるHEモチーフ；を含み、ここで該酵素は、配列番号2と少なくとも30%のアミノ酸同一性を含む；そして

4) 場合により、少なくとも1つの緩衝液；

を含み；そして

b. 選択された一式の反応成分を水性の反応条件下で混合して反応混合物を形成させ；それによって、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物を形成させること；ここで、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物により、反応混合物のpHが、反応成分を混合して約1分～約10分以内に約6未満に低下し、そして標的濃度のペルオキシカルボン酸が生産され、ここで反応混合物のpH低下を、生産される標的濃度のペルオキシカルボン酸を制御するために使用する；

を含む、上記方法。

【請求項2】

少なくとも1つの緩衝液が約0.01mM～約200mMの範囲の濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

反応生産物により、反応混合物のpHが、反応成分を混合した後約1分～約10分以内に約5に低下する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が約200ppm～約2500ppmである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が約400ppm～約1200ppmである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が約400ppm～約600ppmである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が、反応成分を混合した後約1～約10分以内に達成される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が、反応成分を混合した後約5分以内に達成される、

10

20

30

40

50

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が、反応成分を混合した後約 1 分以内に達成される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ペルオキシカルボン酸の濃度は、一旦ペルオキシカルボン酸の標的濃度に達すると、該標的濃度の約 20 % 未満で変動する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

緩衝液が約 8 . 0 ~ 約 6 . 0 の pK_a を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

初期反応混合物の初期 pH が、6 . 5、7 . 2、7 . 5、8 . 1、及び 8 . 5 を含むグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒が、サーモトガ・ネアポリタナ由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒が、サーモトガ・マリチマ M S B 8 由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

pH の低下により、反応成分を混合した後 10 分以内に、ペルヒドロリシス活性が約 80 % 以上減少する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

酵素触媒が、微生物細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞抽出物、部分的精製酵素、精製酵素の形態にあるか、又は部分的精製酵素若しくは精製酵素の固定化形態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

ペルオキシカルボン酸が、過酢酸、過プロピオン酸、過酪酸、過乳酸、過グリコール酸、過メトキシ酢酸、過 - ヒドロキシ酪酸、及びこれらの混合物から成るグループから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

酵素触媒がカタラーゼ活性を欠乏する、請求項 1 に記載の方法。

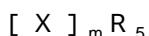
【請求項 19】

標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産させることによって硬表面又は無生物を消毒する方法であって、

a . 標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産させるための一式の反応成分を選択すること、ここで該反応成分は、

1) 下記の化合物の少なくとも 1 つ又はそれらの混合物 :

i) 以下の構造



[式中、

X は式 $R_6C(O)O$ のエステル基であり、

R_6 は、場合によりヒドロキシル基又は C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換される、C 1 ~ C 7 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_6 は、場合により、 R_6 が C 2 ~ C 7 の場合 1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み ;

R_5 は、場合によりヒドロキシル基で置換される、C 1 ~ C 6 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_5 中の各炭素原子はそれぞれ最大で 1 つのヒドロキシル基又は最大で 1 つのエステル基を含み、ここで R_5 は、場合により、1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み ;

m は 1 から R_5 中の炭素数までの整数である]

を有するエステルであって

10

20

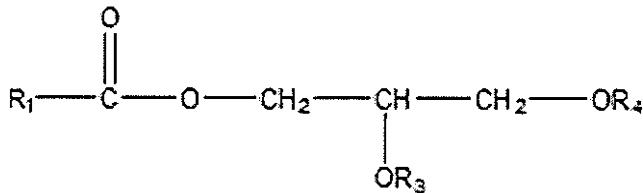
30

40

50

25 で水に対して少なくとも 5 ppm の溶解度を有する、上記エステル；又は
ii) 以下の構造

【化 2】



10

[式中、R₁は場合によりヒドロキシル基又はC1～C4のアルコキシ基で置換される、C1～C7の直鎖又は分岐鎖のアルキルであり、そしてR₃及びR₄はそれぞれH又はR₁、C(O)である]を有するグリセリド；又は

iii) アセチル化单糖、アセチル化二糖、又はアセチル化多糖；

2) 過酸素源；

3) ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒、ここで該酵素触媒は、CLUSTALW を用いると参照配列の配列番号2にアラインするCE-7シグネチャー モチーフを有する酵素を含み、該シグネチャー モチーフは、

i) 配列番号2のアミノ酸の位置118～120におけるRGQモチーフ；

ii) 配列番号2のアミノ酸の位置179～183におけるGXSQGモチーフ；及び

iii) 配列番号2のアミノ酸の位置298～299におけるHEモチーフ；を含み、ここで該酵素は、配列番号2と少なくとも30%のアミノ酸同一性を含む；そして

4) 場合により、少なくとも1つの緩衝液；

を含み；そして

b. 選択された一式の反応成分を水性の反応条件下で混合して反応混合物を形成させ；それによって、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物を形成させること；ここで、ペルオキシカルボン酸を含む反応生成物により、反応混合物のpHが、反応成分を混合して約1分～約10分以内に約6未満に低下し、そして標的濃度のペルオキシカルボン酸が生産され、ここで反応混合物のpH低下を、生産される標的濃度のペルオキシカルボン酸を制御するために使用し；そして

c. 工程(b)で生産されるペルオキシカルボン酸を硬表面又は無生物に適用すること；

を含む、上記方法。

【請求項20】

少なくとも1つの緩衝液が約0.01mM～約200mMの範囲の濃度で存在する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

反応生産物により、反応混合物のpHが、反応成分を混合した後約1分～約10分以内に約5に低下する、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が約200ppm～約2500ppmである、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が約400ppm～約1200ppmである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が約400ppm～約600ppmである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が、反応成分を混合した後約1～約10分以内に達成

20

30

40

50

される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 26】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が、反応成分を混合した後約 5 分以内に達成される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 27】

ペルオキシカルボン酸の標的濃度が、反応成分を混合した後約 1 分以内に達成される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

ペルオキシカルボン酸の濃度は、一旦ペルオキシカルボン酸の標的濃度に達すると該標的濃度の約 20 % 未満で変動する、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 29】

緩衝液が約 8.0 ~ 約 6.0 の pK_a を有する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 30】

初期反応混合物の初期 pH が、6.5、7.2、7.5、8.1、及び 8.5 を含むグループから選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 31】

ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒がサーモトガ・ネアポリタナ由来である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 32】

ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒がサーモトガ・マリチマ M S B 8 由来である、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 33】

pH の低下により、反応成分を混合した後 10 分以内に、ペルヒドロリシス活性が約 80 % 以上減少する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 34】

酵素触媒が、微生物細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞抽出物、部分的精製酵素、精製酵素の形態にあるか、又は部分的精製酵素若しくは精製酵素の固定化形態である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 35】

ペルオキシカルボン酸が、過酢酸、過プロピオン酸、過酪酸、過乳酸、過グリコール酸、過メトキシ酢酸、過 - ヒドロキシ酪酸、及びこれらの混合物から成るグループから選択される、請求項 19 に記載の方法。

30

【請求項 36】

酵素触媒がカタラーゼ活性を欠乏する、請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年8月13日付けで出願された米国仮出願第 61/088673 号及び 2008 年 10 月 3 日付けで出願された米国仮出願第 61/102520 号の便益を主張するものであり、その両者の全文は、参照することによって本明細書に組み込まれている。

40

【0002】

本発明は、過酸の生合成及びその場 (in situ) での酵素触媒作用の分野に関する。具体的には、セファロスボリンアセチルヒドロラーゼ (CAH; E.C. 3.1.1.41) 及びアセチルキシランエステラーゼ (AXE; E.C. 3.1.1.72) を含む、構造的に炭水化物エステラーゼの CE-7 ファミリーに属するものとして同定されている酵素のペルヒドロリシス (perhydrolysis) 活性によって生成する過酸の生産を制御する方法を提供する。酵素的なプロセスによって、カルボン酸エステル基質から過カルボン酸が生産される。反応の比活性対 pH プロファイルの解明が、緩衝液濃度及び pH を含むパラメーターを変えることによる反応の制御を可能にする。本明細書で説明される方法によつ

50

て生産される過酸を含む消毒製剤を提供する。

【背景技術】

【0003】

過酸組成物は、有効な抗菌剤であることが報告されている。硬表面、肉製品、生きた植物組織、及び医療用デバイスを、望ましくない微生物の増殖に関して清浄にする、消毒する、及び／又は衛生的にする方法が記載されている（特許文献1、2、3、4及び5）。また過酸は、洗濯用洗剤用途の漂白組成物の製造に有用であることも報告されている（特許文献6、7及び8）。

【0004】

過酸は、カルボン酸と過酸化水素との化学反応によって製造することができる（非特許文献1を参照）。反応は通常、濃硫酸のような強い無機酸によって触媒される。過酸化水素とカルボン酸との反応は平衡反応であり、過酸の生産では、過剰な濃度の過酸化物及び／又はカルボン酸の使用、又は水の除去が好ましい。

10

【0005】

酵素触媒も、また、使用時及び／又は適用時の迅速な過酸の生産を可能にし、過酸濃度の経時的な低下を起こす可能性がある過酸溶液の貯蔵の必要性を回避することができる。過酸化水素との直接の化学反応による過酸の生産に一般的に用いられる高いカルボン酸濃度は酵素的な過酸の生産には必要なく、酵素触媒による反応では、化学反応で一般に用いられる濃度よりもかなり低い濃度のカルボン酸エステルを基質として使用することができる。酵素触媒による反応は、広範なpHにわたって行うことができるが、所定のpHでの酵素活性及び安定性、並びに所定のpHでのペルヒドロリシスに対する基質特異性に依存する。

20

【0006】

エステラーゼ、リパーゼ及びいくつかのプロテアーゼは、アルキルエステルの加水分解を触媒して、それに対応するカルボン酸を生産する能力を有する（式1）。

【数1】

式1

リパーゼ、エステラーゼ、
又はプロテアーゼ

30



【0007】

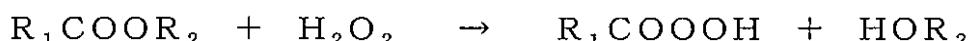
また、いくつかのエステラーゼ、リパーゼ及びプロテアーゼは、ペルヒドロリシス活性も示し、アルキルエステルからの過酸の合成を触媒する（式2）。

【数2】

式2

リパーゼ、エステラーゼ、
又はプロテアーゼ

40



【0008】

炭水化物エステラーゼのCE-7類(class)は、エステル、特にアルコール、ジオール及びグリセロールのアセチルエステルのペルヒドロリシスに対して高い比活性を有することが見出されている。特許文献9、10、11及び12は、消毒剤及び／又は漂白剤として使用するのに十分な濃度でカルボン酸エステルを（過酸化水素などの好適な過酸素源の存在下で）ペルオキシカルボン酸に変換する、顕著なペルヒドロリシス活性を特徴とする炭水化物エステラーゼ（例えば、セファロスボリンCデアセチラーゼ[CAII]及びアセチルキシランエステラーゼ[AXE]）のCE-7ファミリーのメンバーとして構造

50

的に分類される酵素を開示している。特定の反応条件下で、CE-7エステラーゼは、過酸濃度の生産を1分間に少なくとも4000~5000 ppmの高さに、そして5分から30分間に少なくとも最大9000 ppmまで触媒することができる（特許文献12）。ペルオキシカルボン酸は、しかしながら、ある金属表面を腐食する可能性があり、従って、結果として生じる溶液の腐食作用を防止する又は最小限にするために、反応中に生産される過酸の総量を制限することが望ましい。例えば、1分間に僅か200 ppm~1000 ppmの過酸の生産を必要とする適用には、しばしばこれらの制限を優に上回る過酸の最終濃度を生じる反応条件が使用される。硬表面消毒用の過酸のその場発生の適用では、上限の有効消毒剤濃度を著しく超過することなく目的の濃度の過酸を迅速に発生する能力を有することが望ましく、それによって表面の或る成分の腐食を制限又は防止する。洗濯物又は布地の漂白用の過酸のその場発生の適用では、上記の漂白に必要な生成される過酸の濃度に対しても同様な制限が望ましい。

【0009】

過酸の生産を触媒することに加え、CE-7エステラーゼは、また、過酸の加水分解を触媒してカルボン酸と過酸化水素を生成させる。従って、酵素が長時間活性を保持する反応条件下では、エステルと過酸化物との最初の酵素触媒反応で生産された過酸を壊し、消毒剤溶液に嫌な臭いを付け得る副産物としてのカルボン酸（例えば、酢酸）を生じさせる。また、酵素のこの過酸加水分解活性は、CE-7エステラーゼによって生産された過酸含有製剤の長期安定性を、数時間で、又は消毒剤製剤中の過酸の安定性によっては数日若しくは数週間で、損なわせかねない。

【0010】

過酸溶液は、多様な用途を有する。過酸溶液を生産するための効率的且つ有効な方法の考案は進展されたものの、改良された方法が必要である。酵素触媒による過酸生産を過酸濃度依存的に制限する、過酸生産のその場的方法は、タスク適切（task-appropriate）な方法で標的濃度の過酸の生産を可能にする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第6,545,047号

【特許文献2】国特許第6,183,807号

【特許文献3】米国特許第6,518,307号

【特許文献4】米国公開特許公報第20030026846号

【特許文献5】米国特許第5,683,724号

【特許文献6】米国特許第3,974,082号

【特許文献7】米国特許第5,296,161号

【特許文献8】米国特許第5,364,554号

【特許文献9】米国特許出願第11/638,635号

【特許文献10】米国特許出願第11/743,354号

【特許文献11】米国特許出願第11/943,872号

【特許文献12】米国特許出願第12/143,375号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】「有機過酸化物」（Organic Peroxides），Daniel Swern, ed., Vol. 1, pp 313-516; Wiley Interscience, New York, 1971

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本明細書は、標的濃度の過酸を生産する酵素触媒による方法を開示する。酵素触媒による過酸の生産は、過酸濃度依存的に制限される。また、本明細書は、標的濃度の過酸を供給する過酸含有溶液を利用して、表面又は無生物を消毒する方法、及び布地又は洗濯物を

10

20

30

40

50

漂白する方法を開示する。本明細書で説明される方法は、C E - 7 エステラーゼの構造ファミリーに属する酵素（例えば、セファロスポリン C デアセチラーゼ [C A H] 及びアセチルキシランエステラーゼ [A X E] ）が、カルボン酸エステルを過酸に変換する顕著なペルヒドロリシス活性を示す第 1 の発見によって、並びに前記酵素のエステルから過酸を生産するペルヒドロリシス活性、及び過酸からカルボン酸と過酸化水素を生産する加水分解活性の両者の活性が、過酸及び / 又はカルボン酸を生産する反応の間に反応の pH が低下するのに伴って著しく低下する又は不活性化されるという第 2 の発見によって可能になる。過酸を生産する、及び場合により、過酸を加水分解する C E - 7 エステラーゼの活性は、標的濃度の過酸又は標的濃度範囲の過酸が生産されるように、これらに限定されないが、反応の初期 pH の選択、又はペルヒドロリシス反応の緩衝液及び緩衝液濃度の選択、又は初期 pH と緩衝液並びに緩衝液濃度の組み合わせの選択を含む、多くの方法によって制御することができる。10

【 0 0 1 4 】

1 つの実施態様では、その方法は、表面又は無生物を消毒するのに十分な、並びに溶液の高過酸濃度に伴う腐食作用を減少若しくは防止するのに十分な過酸濃度を有する、酵素触媒による過酸溶液の生産手段を提供する。第 2 の実施態様では、その方法は、消毒する、又は布地若しくは洗濯物から染みを除くのに十分な、そしてまた、溶液中のより高い過酸濃度に伴う染色した布地若しくは衣類に対する損傷作用、又は織物の品位に関わる損傷作用を軽減若しくは防止するのに十分な過酸濃度を有する、酵素触媒による過酸溶液の生産手段を提供する。いくつかの実施態様では、その方法は、酵素活性の持続期間が、第 2 の酵素触媒による過酸の加水分解がカルボン酸（例えば、酢酸）を生産する場合の、最初の酵素触媒反応で生産された過酸の第 2 の酵素触媒による実質的な加水分解を仲介するのには十分でない、表面若しくは無生物を消毒するのに好適な酵素触媒による過酸溶液の生産手段を提供する。20

【 0 0 1 5 】

酵素触媒反応によって生産される過酸の量を制御する 1 つの方法は、酵素の触媒機能を選択的に低下させる又は不活性化するという反応条件を使用することである。ペルヒドロラーゼ酵素の触媒活性は、反応混合物の pH を変化させるなど、多くの方法で制御できる。従って、反応混合物の初期 pH は、過酸が生産されるにつれて反応物の pH が低下し、最終的に酵素活性が著しく低下するか又は不活性化されるような pH を有する反応混合物を生じるように調整すればよい。あるいは、低濃度の過酸しか望まない場合、反応の初期 pH は、実質的に酵素活性を低下させ、ほんの短時間の酵素触媒による過酸生産を起こさせるのに十分なだけ低くすることができる。酵素触媒反応によって生産される過酸の量を制御する別の方法は、緩衝能力が制限され、過酸及び他の反応生産物（例えば、カルボン酸）が生産されるにつれて緩衝能が迅速に消耗され、それによって反応混合物の pH が低下し、そして、酵素活性を低下又は不活性化させるような、反応混合物中の緩衝液の濃度を使用することである。酵素触媒反応によって生産される過酸の量を制御する 1 つの方法は、反応混合物の初期 pH の選択、及び反応混合物の pH が、目的の量の過酸が生産されるにつれて反応の酵素活性が低下又は不活性化されるように、反応混合物の pH 低下を起こさせる pK_a を持つ緩衝液を選択することである。別のアプローチは、触媒活性が著しく低下するか又は不活性化されるポイントまで、反応混合液の pH 低下を起こせる過酸の高い初期生産力の反応を生み出す高い触媒反応速度を持つ pH 感受性酵素を使用することである。しかし、これらのそれぞれのアプローチは、反応に用いるために、反応混合物が所望の pH に到達した時、過酸の生産を触媒する酵素の能力が無くなる又は実質的に低下するような、pH 感受性触媒活性を有する酵素を選択する必要がある。また、目標量の過酸を生産するペルヒドロリシス反応をデザインするためには、酵素の比活性対反応 pH プロファイルを理解しなければならない。本明細書では、pH 感受性ペルヒドロラーゼ酵素及び一定時間に標的濃度の過酸を生産する方法を説明する。30

【 0 0 1 6 】

比較的安定な過酸濃度、即ち、酵素触媒活性の pH が介在する低下又は不活化の後、目40

標過酸濃度の約20%以内を保持する過酸水溶液を説明する。いくつかの好ましい実施態様では、酵素触媒活性のpHが介在する低下又は不活化の後、目標過酸濃度の約15%以内、そしてより好ましくは目標過酸濃度の約10%以内の過酸濃度を保持する過酸水溶液が提供される。過酸濃度の安定性は、過酸の酵素触媒生産の低下又は不活化の後、数時間持続することができる。1つの実施態様では、過酸濃度は、過酸の酵素触媒生産を停止した後、約3時間、約6時間、約9時間、約12時間、約15時間、約18時間、約21時間、約24時間、約30時間、約36時間、約42時間又は約48時間安定である。

【0017】

ペルヒドロラーゼの具体的な例としては、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) (ATCC (登録商標) 31954 (商標))、B.ズブチリス B E 1010 (Payne and Jackson, *J. Bacteriol.* 173:2278-2282 (1991))、B.ズブチリス ATCC (登録商標) 6633 (商標) (米国特許第6,465,233号)、B.ズブチリス ATCC (登録商標) 29233 (商標) ; B.リケニフォルミス ATCC (登録商標) 14580 (商標) (Rey et al., *Genome Biol.*, 5(10):article 77 (2004))、クロストリジウム・テルモセルム (*Clostridium thermocellum*) ATCC (登録商標) 27405 (商標) (Copeland et al., *GENBANK* (登録商標) ZP_00504991), B.プミルス PS 213 (Degrassi et al., *Microbiology*, 146:1585-1591 (2000))、サーモトガ・ネアポリタナ (*Thermotoga neapolitana*) (GENBANK (登録商標) AAB70869.1)、バチルス・クラウシイ (*clausii*) KSM-K16 (GENBANK (登録商標) YP_175265)、バチルス属NRRL B-14911 (GENBANK (登録商標) ZP_01168674)、バチルス・ハロデュランス (*Bacillus halodurans*) C-125 (GENBANK (登録商標) NP_244192)、サーモアナエロバクテリウム属 (*Thermoanaerobacterium* sp.) JW/SL YS485 (GENBANK (登録商標) AAB68821)、バチルス・ズブチリス亞種ズブチリス株168 (GENBANK (登録商標) NP_388200)、サーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*) MSB8 (GENBANK (登録商標) NP_227893.1)、サーモアナエロバクテリウム・サッカロリチカム (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*) (GENBANK (登録商標) S41858)、サーモトガ・レティンガエ (*Thermotoga lettingae*) (GENBANK (登録商標) CP000812)、サーモトガ・ペトロフィラ (*Thermotoga petrophila*) (GENBANK (登録商標) CP000702) 及びサーモトガ属 (*Thermotoga* sp.) RQ2 (GENBANK (登録商標) CP000969) が挙げられる。

【0018】

本明細書において説明されるそれぞれの本発明のペルヒドロラーゼ酵素は、保存された構造的特徴 (即ち、保存されたシグネチャーモチーフ) を共通して保持しており、それに加えて、他の / - 加水分解酵素と比較した場合、優れたペルヒドロリシス活性も保持しており、このために、この酵素ファミリーは、過酸を消毒剤及び/又は漂白剤として使用するのに十分な濃度でその場生成するのに特に適したものとなっている。本発明の方法において有用な好適なペルヒドロラーゼは、炭水化物エステラーゼのCE-7ファミリー内で見出された、保存されたシグネチャーモチーフによって同定することができる。

【課題を解決するための手段】

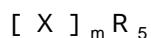
【0019】

本明細書において提供されるものは、標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産する方法であって、

a. 標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産させるための一式の反応成分を選択すること、ここで該反応成分は、

1) 下記の化合物の少なくとも1つ又はそれらの混合物：

i) 以下の構造



[式中、

10

20

30

40

50

X は式 $R_6C(O)O$ のエステル基であり、

R_6 は、場合によりヒドロキシル基又は C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換される、C 1 ~ C 7 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_6 は、場合により、 R_6 が C 2 ~ C 7 の場合 1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

R_5 は、場合によりヒドロキシル基で置換される、C 1 ~ C 6 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_5 中の各炭素原子はそれぞれ最大で 1 つのヒドロキシル基又は最大で 1 つのエステル基を含み、ここで R_5 は、場合により、1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

m は 1 から R_5 中の炭素数までの整数である]

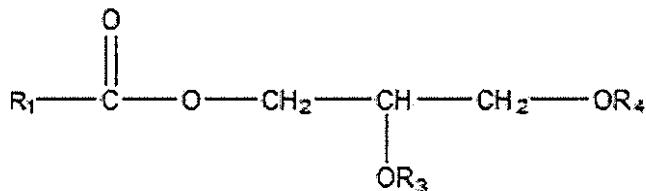
を有するエステルであって、

10

25 で水に対して少なくとも 5 ppm の溶解度を有する、上記エステル；又は

i i) 以下の構造

【化 1】



20

[式中、 R_1 は、場合によりヒドロキシル基又は C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換される、C 1 ~ C 7 の直鎖又は分岐鎖のアルキルであり、そして R_3 及び R_4 はそれぞれ H 又は $R_1C(O)$ である] を有するグリセリド；又は

i i i) アセチル化单糖、アセチル化二糖、又はアセチル化多糖；

2) 過酸素源；

3) ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒、ここで該酵素触媒は、C L U S T A L W を用いると参照配列の配列番号 2 にアラインする C E - 7 シグネチャー モチーフを有する酵素を含み、該シグネチャー モチーフは、

i) 配列番号 2 のアミノ酸の位置 118 ~ 120 における R G Q モチーフ；

i i) 配列番号 2 のアミノ酸の位置 179 ~ 183 における G X S Q G モチーフ；及び

i i i) 配列番号 2 のアミノ酸の位置 298 ~ 299 における H E モチーフ；を含み、ここで該酵素は、配列番号 2 と少なくとも 30 % のアミノ酸同一性を含む；そして

4) 場合により、少なくとも 1 つの緩衝液；

を含み；そして

b . 選択された一式の反応成分を水性の反応条件下で混合して反応混合物を形成させ；それによって、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物を形成させること；ここで、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物により、反応混合物の pH が、反応成分を混合して約 1 分 ~ 約 10 分以内に約 6 未満に低下し、そして標的濃度のペルオキシカルボン酸が生産され、ここで反応混合物の pH 低下を、生産される標的濃度のペルオキシカルボン酸を制御するために使用する；

を含む方法である。

40

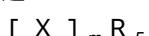
【0020】

また、本明細書において提供されるものは、標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産することによって硬表面又は無生物を消毒する方法であって、

a . 標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産させるための一式の反応成分を選択すること、ここで、該反応成分は、

1) 下記の化合物の少なくとも 1 つ又はそれらの混合物；

i) 以下の構造



【式中、

50

X は式 $R_6C(O)O$ のエステル基であり、

R_6 は、場合によりヒドロキシリル基又は C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換される、C 1 ~ C 7 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_6 は、場合により、 R_6 が C 2 ~ C 7 の場合 1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

R_5 は、場合によりヒドロキシル基で置換される、C 1 ~ C 6 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_5 中の各炭素原子はそれぞれ最大で 1 つのヒドロキシル基又は最大で 1 つのエステル基を含み、ここで R_5 は、場合により、1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

m は 1 から R_5 中の炭素数までの整数である。1

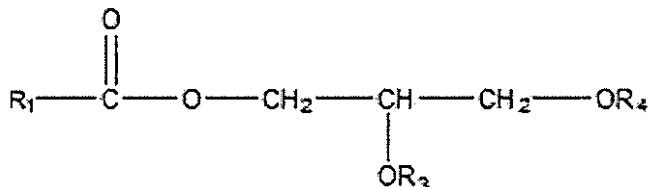
を有するエステルであって、

10

25 で水に対して少なくとも 5 ppm の溶解度を有する、上記エステル；又は

i i) 以下の構造

【化 2】



20

[式中、R₁は場合によりヒドロキシル基又はC1～C4のアルコキシ基で置換される、C1～C7の直鎖又は分岐鎖のアルキルであり、そしてR₃及びR₄はそれぞれH又はR₁、C(O)である]を有するグリセリド；又は

i i i) アセチル化单糖、アセチル化二糖、又はアセチル化多糖；

2) 過酸素源:

3) ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒、ここで該酵素触媒は、CLUSTALWを用いると参照配列の配列番号2にアラインするCE-7シグネチャー-モチーフを有する酵素を含み、該シグネチャー-モチーフは、

i) 配列番号 2 のアミノ酸の位置 118 ~ 120 における R G Q モチーフ；

i i) 配列番号 2 のアミノ酸の位置 1 7 9 ~ 1 8 3 における G X S Q G モチーフ ; 及び

i i i) 配列番号 2 のアミノ酸の位置 298 ~ 299 における HE モチーフ ; を含み、ここで該酵素は、配列番号 2 と少なくとも 30 % のアミノ酸同一性を含む；そして

4) 場合により、少なくとも 1 つの緩衝液；

を含み；そして

b. 選択された一式の反応成分を水性の反応条件下で混合して反応混合物を形成させ；それによって、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物を形成させること；ここで、ペルオキシカルボン酸を含む反応生産物により、反応混合物の pH が、反応成分を混合して約 1 分～約 10 分以内に約 6 未満に低下し、そして標的濃度のペルオキシカルボン酸が生産され、ここで反応混合物の pH 低下を、生産される標的濃度のペルオキシカルボン酸を制御するために使用し；そして

c. 工程 (b) で生産されるペルオキシカルボン酸を硬表面又は無生物に適用すること

•
i

を含む方法である。

0 0 2 1]

いくつかの

【0022】 別の実施態様では、触媒は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号30、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、及び配列番号62から成るグループから選択される1つ又はそれ以上の

58

のアミノ酸配列と、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一なアミノ酸配列を有する、実質的に類似した酵素である。

【0023】

別の実施態様では、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 29、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 59、及び配列番号 61 から成るグループから選択される 1 つ又はそれ以上の核酸配列と、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされたアミノ酸配列を有する酵素を含む。好ましい実施態様では、本発明は、配列番号 1、配列番号 9、配列番号 13、及び配列番号 15 から成るグループから選択される核酸配列を有する核酸分子と、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする分離された核酸分子によってコードされたペルヒドロラーゼ活性を有する酵素を包含する。

10

【0024】

別の実施態様では、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号 69、70、71、72、又は 73 と比較した場合、配列番号 69、70、71、72、又は 73 のアミノ酸 277 への置換が、セリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるという条件で、ペアワイズアラインメントデフォルトパラメーター (pairwise alignment default parameter) の K T U P L E = 1、G A P P E N A L T Y = 3、W I N D O W = 5 及び D I A G O N A L S S A V E D = 5 を用いた、C L U S T A L のアラインメント法 (C L U S T A L W など) に基づくと、少なくとも 95% アミノ酸配列の同一性 (又は、様々な実施態様では、96%、97%、98%、又は 99% の同一性) を有する変異型サーモトガ酵素を包含する。

20

【0025】

別の実施態様では、ペルヒドロラーゼ触媒は、アミノ酸残基 277 がセリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるなら、配列番号 69、70、71、72、及び 73 から成るグループから選択されるアミノ酸配列を含む変異型サーモトガ酵素を包含する。

30

【0026】

1 つの特定の実施態様では、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号 69 のアミノ酸残基 277 がセリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含む、変異型サーモトガ・ネアポリタナ酵素を包含する。

【0027】

更なる特定の実施態様では、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号 70 のアミノ酸残基 277 がセリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含む、変異型サーモトガ・マリチマ酵素を包含する。

【0028】

いくつかの態様では、反応混合物水溶液は緩衝液を含有し、特定の初期 pH を有する。緩衝液は、目的の pH で酵素的ペルヒドリシス反応を行うのに好適な任意の緩衝液でよい。いくつかの態様では、緩衝液は、ナトリウム塩、カリウム塩又はナトリウムとカリウムの混合塩の重炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、メチルホスホン酸緩衝液、ピロリン酸緩衝液及びリン酸塩緩衝液から成るグループから選択される。いくつかの態様では、緩衝液は、重炭酸緩衝液又はクエン酸緩衝液である。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 5.5 ~ 約 8.5 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 8.5 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 8.1 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 7.2 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 6.5 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 6.0 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 5.5 の初期 pH を有する。いくつかの態様では、緩衝液を含む反応混合物は、約 5.5 の初期 pH を

40

50

有する。

【0029】

いくつかの態様では、反応混合物水溶液に含まれる緩衝液が混合物の初期pHを規定することができる。いくつかの態様では、緩衝液は、反応混合物水溶液に約5.5～約8.5の初期pHを出現させる。いくつかの態様では、緩衝液は、反応混合物水溶液に約8.1の初期pHを出現させる。いくつかの態様では、緩衝液は、反応混合物水溶液に約7.2の初期pHを出現させる。いくつかの態様では、緩衝液は、反応混合物水溶液に約6.5の初期pHを出現させる。いくつかの態様では、緩衝液は、反応混合物水溶液に約6の初期pHを出現させる。いくつかの態様では、緩衝液は、反応混合物水溶液に約5.5の初期pHを出現させる。

10

【0030】

いくつかの態様では、反応混合物水溶液は、特定の濃度を有する少なくとも1つの緩衝液を含んでもよい。緩衝液は、酵素的ペルヒドロリシス反応を行うのに好適な任意の緩衝液でよい。いくつかの態様では、反応混合物は、緩衝液を約0.01 mM～約200 mMの濃度で含む。いくつかの態様では、反応混合物は、緩衝液を約50 mMの濃度で含む。いくつかの態様では、反応混合物は、約25 mM～約0.1 mMの濃度を有する緩衝液を含む。いくつかの態様では、反応混合物は、約25 mM～約0.1 mMの濃度を有する重炭酸緩衝液を含む。いくつかの態様では、反応混合物は、約5 mM未満の濃度を有する緩衝液を含む。いくつかの態様では、反応混合物は、約5 mM未満の濃度を有する重炭酸緩衝液を含む。

20

【0031】

好ましい実施態様では、基質は、以下から成るグループから選択される：モノアセチン；ジアセチン；トリアセチン；モノプロピオニン；ジプロピオニン；トリプロピオニン；モノブチリン；ジブチリン；トリブチリン；グルコースペンタアセテート；キシロースステトラアセテート；アセチル化キシラン；アセチル化キシランフラグメント；-D-リボフラノース-1,2,3,5-テトラアセテート；トリ-O-アセチル-D-ガラクタール；トリ-O-アセチル-グルカール；1,2-エタンジオール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、1,2-ブタンジオール、1,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,2-ペンタンジオール、2,5-ペンタンジオール、1,6-ペンタンジオール、1,2-ヘキサンジオール、2,5-ヘキサンジオール、1,6-ヘキサンジオールのモノエステル又はジエステル；及びそれらの混合物。

30

【0032】

生物学的配列の簡単な説明

以下の配列は、37 C. F. R. 1.821～1.825（「ヌクレオチド配列及び/又はアミノ酸配列の開示を含む特許出願の要件 - 配列規則（" Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosure - the Sequence Rules " ）」）に準拠し、世界知的所有権機関（WIPO）標準S T. 25（1998）、並びに欧州特許条約（EPC）及び特許協力条約（PCT）の規則5.2及び49.5（a-bis）並びに細則208及び実施細則の付属書Cに記載の配列表の要件に従う。ヌクレオチド及びアミノ酸配列データで用いられる記号及び様式は37 C. F. R. § 1.822に記載されている規則に準拠する。

40

【0033】

配列番号1は、バチルス・ズブチリスATCC（登録商標）31954（商標）由来のセファロスボリンCデアセチラーゼ（c a h）のコード領域の核酸配列である。

【0034】

配列番号2は、バチルス・ズブチリスATCC（登録商標）31954（商標）由来のセファロスボリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号3は、B.ズブチリス亞種のズブチリス株168由来のセファロスボリンCデ

50

アセチラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0036】

配列番号4は、B.ズブチリス亜種のズブチリス株168由来のセファロスボリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列であり、B.ズブチリスB E 1010由来のセファロスボリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列と同一である。

【0037】

配列番号5は、B.ズブチリスA T C C(登録商標)6633(商標)由来のセファロスボリンアセチルエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0038】

配列番号6は、B.ズブチリスA T C C(登録商標)6633(商標)由来のセファロスボリンアセチルエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。 10

【0039】

配列番号7は、B.リケニフォルミスA T C C(登録商標)14580(商標)由来のセファロスボリンCデアセチラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0040】

配列番号8は、B.リケニフォルミスA T C C(登録商標)14580(商標)由来のセファロスボリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0041】

配列番号9は、B.プミルスP S 2 1 3由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。 20

【0042】

配列番号10は、B.プミルスP S 2 1 3由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0043】

配列番号11は、クロストリジウム・テルモセルムA T C C(登録商標)27405(商標)由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0044】

配列番号12は、クロストリジウム・テルモセルムA T C C(登録商標)27405(商標)由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0045】

配列番号13は、サーモトガ・ネアポリタナ由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。 30

【0046】

配列番号14は、サーモトガ・ネアポリタナ由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0047】

配列番号15は、サーモトガ・マリチマM S B 8由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0048】

配列番号16は、サーモトガ・マリチマM S B 8由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。 40

【0049】

配列番号17は、サーモアナエロバクテリウム属J W / S L Y S 4 8 5由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0050】

配列番号18は、サーモアナエロバクテリウム属J W / S L Y S 4 8 5由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0051】

配列番号19は、バチルス属N R R L B - 1 4 9 1 1由来のセファロスボリンCデアセチラーゼのコード領域の核酸配列である。 50

【0052】

配列番号20は、バチルス属N R R L B - 1 4 9 1 1由来のセファロスポリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0053】

配列番号21は、バチルス・ハロデュランスC - 1 2 5由来のセファロスポリンCデアセチラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0054】

配列番号22は、バチルス・ハロデュランスC - 1 2 5由来のセファロスポリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0055】

配列番号23は、バチルス・クラウシイK S M - K 1 6由来のセファロスポリンCデアセチラーゼのコード領域の核酸配列である。

10

【0056】

配列番号24は、バチルス・クラウシイK S M - K 1 6由来のセファロスポリンCデアセチラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0057】

配列番号25及び26は、p S W 1 9 4及びp S W 1 8 9を構築するためにバチルス・ズブチリス種由来のペルヒドロラーゼ遺伝子をP C Rで増幅するために用いられるプライマーである。

【0058】

配列番号27は、p S W 1 9 4にクローニングしたP C R産物の核酸配列である。

20

【0059】

配列番号28は、p S W 1 8 9にクローニングしたP C R産物の核酸配列である。

【0060】

配列番号29は、バチルス・ズブチリスA T C C(登録商標)2 9 2 3 3(商標)セファロスポリンCデアセチラーゼ(c a h)遺伝子の核酸配列である。

【0061】

配列番号30は、バチルス・ズブチリスA T C C(登録商標)2 9 2 3 3(商標)セファロスポリンCデアセチラーゼ(C A H)の推測のアミノ酸配列である。

【0062】

配列番号31及び32は、p S W 1 9 1を構築するためにバチルス・リケニフォルミスA T C C(登録商標)1 4 5 8 0(商標)セファロスポリンCデアセチラーゼ遺伝子をP C Rで増幅するために用いられるプライマーである。

30

【0063】

配列番号33及び34は、p S W 1 9 5を構築するためにバチルス・プミルスP S 2 1 3アセチルキシランエステラーゼのコード配列(G E N B A N K(登録商標)AJ249957)をP C Rで増幅するために用いられるプライマーである。

【0064】

配列番号35は、カナマイシン耐性遺伝子の核酸配列である。

【0065】

配列番号36は、プラスミドp K D 1 3の核酸配列である。

40

【0066】

配列番号37及び38は、E.コリM G 1 6 5 5中で、k a t Gカタラーゼ遺伝子に相同性を有する領域に隣接したカナマイシン遺伝子をコードするP C R産物を生成するために使用されるプライマーである。この産物は、内因性k a t G遺伝子を破壊するために用いられた。

【0067】

配列番号39は、E.コリM G 1 6 5 5中でk a t Gカタラーゼ遺伝子に相同性を有する領域に隣接したカナマイシン耐性遺伝子をコードするP C R産物の核酸配列である。この産物は、内因性k a t G遺伝子を破壊するために用いられた。

50

【0068】

配列番号40は、E.コリMG1655におけるkatGカタラーゼ遺伝子の核酸配列である。

【0069】

配列番号41は、E.コリMG1655におけるkatGカタラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0070】

配列番号42は、プラスミドpKD46の核酸配列である。

【0071】

配列番号43及び44は、katG遺伝子の破壊を確認するために使用されるプライマーである。
10

【0072】

配列番号45は、プラスミドpCP20の核酸配列である。

【0073】

配列番号46及び47は、E.コリMG1655中でkatEカタラーゼ遺伝子に相同意を有する領域に隣接したカナマイシン遺伝子をコードするPCR産物を生成するために使用されるプライマーである。この産物は、内因性katE遺伝子を破壊するのに用いられた。

【0074】

配列番号48は、E.コリMG1655中で、katEカタラーゼ遺伝子に相同意を有する領域に隣接したカナマイシン遺伝子をコードするPCR産物の核酸配列である。この産物は、内因性katE遺伝子を破壊するのに用いられた。
20

【0075】

配列番号49は、E.コリMG1655中でのkatEカタラーゼ遺伝子の核酸配列である。

【0076】

配列番号50は、E.コリMG1655中でのkatEカタラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0077】

配列番号51及び52は、單一ノックアウト株E.コリMG1655katE、及び二重ノックアウト株E.コリMG1655katGkatEにおけるkatE遺伝子の破壊を確認するのに用いられるプライマーであり、本明細書においてE.コリKLP18と称される。
30

【0078】

配列番号53は、配列番号2のアミノ酸残基118～299を包含する領域のアミノ酸配列である。

【0079】

配列番号54は、サーモアナエロバクテリウム・サッカロリチカム(GENBANK(登録商標)受託番号S41858)由来のアセチルキシランエステラーゼのアミノ酸配列である。
40

【0080】

配列番号55は、サーモトガ・レティンガ由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0081】

配列番号56は、サーモトガ・レティンガ由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【0082】

配列番号57は、サーモトガ・ペトロフィラ由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【0083】

配列番号 58 は、サーモトガ・ペトロフィラ由来のアセチルキシランエステラーゼの推測のアミノ酸配列である。

【 0 0 8 4 】

配列番号 59 は、本明細書で「 R Q 2 (a) 」として識別されるサーモトガ属 R Q 2 由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【 0 0 8 5 】

配列番号 60 は、本明細書で「 R Q 2 (a) 」として識別されるサーモトガ属 R Q 2 由来のアセチルキシランエステラーゼ (G E N B A N K (登録商標) 受託番号 A C B 0 9 2 2 2) の推測のアミノ酸配列である。

【 0 0 8 6 】

配列番号 61 は、本明細書で「 R Q 2 (b) 」として識別されるサーモトガ属 R Q 2 由来のアセチルキシランエステラーゼのコード領域の核酸配列である。

【 0 0 8 7 】

配列番号 62 は、本明細書で「 R Q 2 (b) 」として識別されるサーモトガ属 R Q 2 由来のアセチルキシランエステラーゼ (G E N B A N K (登録商標) 受託番号 A C B 0 8 8 6 0) の推測のアミノ酸配列である。

【 0 0 8 8 】

配列番号 63 及び 64 は、サーモトガ・マリチマ M S B 8 のアセチルキシランエステラーゼ遺伝子 (G E N B A N K (登録商標) 受託番号 N P _ 2 2 7 8 9 3 . 1) を P C R 増幅するために用いたプライマーである。

【 0 0 8 9 】

配列番号 65 は、 p S W 2 0 7 を生成するために使用した、サーモトガ・マリチマ M S B 8 アセチルキシランエステラーゼの P C R で増幅した遺伝子配列である。

【 0 0 9 0 】

配列番号 66 及び 67 は、 p S W 1 9 6 を構築するためにサーモトガ・ネアポリタナのアセチルキシランエステラーゼ遺伝子 (G E N B A N K (登録商標) 5 8 6 3 2) を P C R で増幅するために用いたプライマーである。

【 0 0 9 1 】

配列番号 68 は、プラスミド p S W 1 9 6 中の、サーモトガ・ネアポリタナのアセチルキシランエステラーゼ遺伝子のコドン最適化バージョンの核酸配列である。

【 0 0 9 2 】

配列番号 69 は、サーモトガ・ネアポリタナ由来のアセチルキシランエステラーゼの野生型配列から誘導される、 277 番目の X a a 残基が A l a 、 V a l 、 S e r 、又は T h r であるアセチルキシランエステラーゼ変異体の推測のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 9 3 】

配列番号 70 は、サーモトガ・マリチマ M S B 8 由来のアセチルキシランエステラーゼの野生型配列から誘導される、 277 番目の X a a 残基が A l a 、 V a l 、 S e r 、又は T h r であるアセチルキシランエステラーゼ変異体の推測のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 9 4 】

配列番号 71 は、サーモトガ・レティンガ由来のアセチルキシランエステラーゼの野生型配列から誘導される、 277 番目の X a a 残基が A l a 、 V a l 、 S e r 、又は T h r であるアセチルキシランエステラーゼ変異体の推測のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 9 5 】

配列番号 72 は、サーモトガ・ペトロフィラ由来のアセチルキシランエステラーゼの野生型配列から誘導される、 277 番目の X a a 残基が A l a 、 V a l 、 S e r 、又は T h r であるアセチルキシランエステラーゼ変異体の推測のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 9 6 】

配列番号 73 は、本明細書で「 R Q 2 (a) 」として識別されるサーモトガ属 R Q 2 由来のアセチルキシランエステラーゼの野生型配列から誘導される、 277 番目の X a a 残基が A l a 、 V a l 、 S e r 、又は T h r であるアセチルキシランエステラーゼ変異体の推測のアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

50

推測のアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0097】

上記した課題は、CE-7炭水化物エステラーゼファミリーに属する酵素が、カルボン酸エステル基質を過酸に変換する有意なペルヒドロリシス活性を示すこと、そしてそれは反応混合物のpHのコントロールによって制御できるという発見によって解決している。CE-7炭水化物エステラーゼの比活性対pHプロファイルの解明は、緩衝液濃度及びpHを含む反応パラメーターを変えることによって、酵素駆動の過酸生産の制御を可能にする。これを理解すれば、この構造的に関連する酵素ファミリーは、消毒及び/又は漂白用途のための、安定した標的濃度の過酸を生産させるために使うことができる。

10

【0098】

この開示では、多くの用語及び略語が使用される。特に他の規定がない限り、以下の定義が適用される。

【0099】

本明細書で用いられる用語「～を含む」は、述べられた特徴、整数、工程又は構成要素が請求項で述べられるように存在することを意味するが、1つ又はそれ以上の他の特徴、整数、工程、構成要素又はそれらのグループの存在若しくは付加を排除するものではない。用語「～を含む」は、「基本的に～から成る」及び「～から成る」によって包含される具体的表現を含むことを意図する。同様に、用語「基本的に～を含む」は、用語「～から成る」によって包含される具体的表現を含むことを意図する。

20

【0100】

本明細書で用いられる、本発明の成分若しくは反応物、又は用いられた成分若しくは反応物の量を修飾する「約」という用語は、例えば、現実での濃縮物又は使用溶液を作成するのに用いられる典型的な測定手順及び液体の取り扱い手順を通して；これらの手順中の意図しないエラーを通して；本組成物を作成したり、又は本方法を実施したりするのに用いられる成分の製造、供給源又は純度の相違を通して発生し得る数量の変動を意味する。また用語「約」は、特定の最初の混合物から得られた組成物の種々の平衡状態に起因して相違する量も包含する。用語「約」で修飾されているかどうかにかかわらず、請求項は、その量の等量も含む。

【0101】

30

本明細書で用いられる用語「過酸」は、ペルオキシ酸(peroxyacid)、ペルオキシカルボン酸、ペルオキシ酸(peroxy acid)、過カルボン酸、及びペルオキソ酸(peroxic acid)と同義語である。

【0102】

本明細書で用いられる用語「過酢酸」は「PAA」のように略記され、ペルオキシ酢酸、エタンペルオキシ酸、及びCAS登録番号79-21-0の全てのその他の同義語と同義である。

【0103】

本明細書で用いられる用語「モノアセチン」は、グリセロールモノアセテート、グリセリンジアセテート、グリセリルジアセテートと同義である。

40

【0104】

本明細書で用いられる用語「ジアセチン」は、グリセロールジアセテート；グリセリンジアセテート、グリセリルジアセテート、及びCAS登録番号25395-31-7の全てのその他の同義語と同義である。

【0105】

本明細書で用いられる用語「トリアセチン」は、グリセリントリアセテート；グリセロールトリアセテート；グリセリルトリアセテート、1,2,3-トリアセトキシプロパン、1,2,3-プロパントリオールトリアセテート、及びCAS登録番号102-76-1の全てのその他の同義語と同義である。

【0106】

50

本明細書で用いられる用語「モノブチリン」は、グリセロールモノブチラート、グリセリンモノブチラート、及びグリセリルモノブチラートと同義である。

【0107】

本明細書で用いられる用語「ジブチリン」は、グリセロールジブチラート及びグリセリルジブチラートと同義である。

【0108】

本明細書で用いられる用語「トリブチリン」は、グリセロールトリブチラート及び1, 2, 3-トリブチルグリセロール、及びCAS登録番号60-01-5の全てのその他の同義語と同義である。

【0109】

本明細書で用いられる用語「モノプロピオニン」は、グリセロールモノプロピオナート、グリセリンモノプロピオナート、及びグリセリルモノプロピオナートと同義である。

【0110】

本明細書で用いられる用語「ジプロピオニン」は、グリセロールジプロピオナート及びグリセリルジプロピオナートと同義である。

【0111】

本明細書で用いられる用語「トリプロピオニン」は、グリセリルトリプロピオナート、グリセロールトリプロピオナート、1, 2, 3-トリプロピオニルグリセロール、及びCAS登録番号139-45-7の全てのその他の同義語と同義である。

【0112】

本明細書で用いられる用語「酢酸エチル」は、酢酸エチル(acetic ether)、アセトキシエタン、エチルエタノアート、酢酸エチルエステル、エタン酸エチルエステル、エチル酢酸エステル、及びCAS登録番号141-78-6の全てのその他の同義語と同義である。

【0113】

本明細書で用いられる用語「乳酸エチル」は、乳酸エチルエステル及びCAS登録番号97-64-3の全てのその他の同義語と同義である。

【0114】

本明細書で用いられる用語「アセチル化糖(acetylated sugar)」及び「アセチル化糖(acetylated saccharide)」は、少なくとも1個のアセチル基を含む单糖、二糖及び多糖を意味する。例えば、このようなものとして、これらに限定されないが、グルコースペントアセテート、キシローステトラアセテート、アセチル化キシラン、アセチル化キシランフラグメント、-D-リボフラノース-1, 2, 3, 5-テトラアセテート、トリ-O-アセチル-D-ガラクタール、及びトリ-O-アセチル-グルカールが挙げられる。

【0115】

本明細書で用いられる用語「ヒドロカルビル」、「ヒドロカルビル基」及び「ヒドロカルビル部分」は、一重、二重又は三重の炭素・炭素結合によって及び/又はエーテル結合によって接続される、そしてそれ相応に水素原子で置換される炭素原子の直鎖状、分枝鎖状又は環状配置を意味する。そのようなヒドロカルビル基は、脂肪族及び/又は芳香族であってもよい。ヒドロカルビル基の例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、シクロプロピル、シクロブチル、ペンチル、シクロペンチル、メチルシクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシル、ベンジル及びフェニルが挙げられる。好ましい実施態様では、ヒドロカルビル部分は、一重の炭素・炭素結合及び/又はエーテル結合によって接続される、そしてそれ相応に水素原子で置換される炭素原子の直鎖状、分枝鎖状又は環状配置である。

【0116】

本明細書で用いられる用語の、1, 2-エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-プロパンジオール、1, 2-ブタンジオール、1, 3-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオール、1, 4-ブタンジオール、1, 2-ペンタンジオール、2, 5-ペンタンジオール、1, 6-ペンタンジオール、1, 2-ヘキサンジオール、2, 5-ヘキサ

10

20

30

40

50

ンジオール、1,6-ヘキサンジオールの「モノエステル」及び「ジエステル」は、少なくとも1つの、式 $R-C(O)O$ 、式中、RはC1~C7の直鎖状のヒドロカルビル部分である、のエステル基を含む該化合物を意味する。

【0117】

本明細書で用いられる用語「好適な酵素反応混合物」、「過酸のその場生成に好適な成分」、「好適な反応成分」、「選択された一式の反応成分」及び「好適な反応混合物水溶液」は、反応物質及び酵素触媒が接触するようになる材料及び水を意味する。反応成分は、酵素触媒のペルヒドロリシス活性を低下及び/又は不活性化することによってペルオキシカルボン酸の必要な標的濃度の生産を制御するために、反応混合物のpHが使われるよう選択される。

10

【0118】

本明細書で用いられる用語「反応生産物」は、選択した反応成分を混ぜ合わせた後、反応混合物の中で形成される化合物の混合物を意味する。反応生産物は、酵素的に生成されたペルオキシカルボン酸（例えば、過酢酸）並びに対応するカルボン酸（例えば、酢酸）のような1つ又はそれ以上の加水分解生成物（酵素的及び/又は化学的な加水分解生成物）から構成される。1つの実施態様では、選択された一式の反応成分を混ぜ合わせると、反応混合物のpHを低下させ、それによって反応成分を混合してから10分以内に、好ましくは約1分~10分以内に酵素触媒のペルヒドロリシス活性を実質的に低下及び/又は不活性化させる反応生産物を形成できる反応混合物が生成される。1つの実施態様では、酵素触媒のペルヒドロリシス活性は、反応成分を混ぜ合わせてから10分又はそれ以下で少なくとも80%低下する。反応生産物は、酵素的に生成されたペルオキシカルボン酸の量を制御するのに好適なpHを反応混合物にもたらす。初期の反応pHは、反応成分の濃度、反応温度、緩衝液の有無、緩衝液のpKa及び緩衝液の濃度を含めた多くの変数に依存する。1つの実施態様では、反応混合物のpHは、選択された一式の反応成分を混ぜ合わせてから10分以内に約6.0以下に下がる。別の実施態様では、反応生産物は、反応成分を混ぜ合わせてから約1分~約10分以内に反応混合物のpHを約6未満に低下させる。

20

【0119】

好適な反応混合物水溶液の成分は本明細書に提供されており、当然ながら、当業者は本方法に好適な成分の変動範囲について理解している。1つの実施態様において、好適な酵素反応混合物は、反応成分を混ぜ合わせた際に過酸をその場生成する。そのようなものとして、反応成分は、反応成分の1種又はそれ以上が使用するまで別々になったままの多成分系として提供されてもよい。複数の活性成分を分離し、それらを組み合わせるための系及び手段の設計は当該分野でよく知られており、一般的には、個々の反応成分の物理的形態に依存することになる。例えば、複数の活性流体（液体-液体）系は、典型的にはマルチチャンバー式のディスペンサー・ボトル、又は二相系（米国特許出願第2005/0139608号；米国特許第5,398,846号；米国特許第5,624,634号；米国特許第6,391,840号；欧州特許第0807156号B1；米国特許出願第2005/0008526号；及びPCT公報WO00/11713A1）を使用しており、これらは、例えば、反応性の流体を混合した際に望ましい漂白剤が生産されるようある種の漂白用途で見られる。過酸を生成するために使用される多成分系のその他の形態としては、これらに限定されないが、1種又はそれ以上の固形成分、固体-液体成分の組み合わせ、例えば、粉末（例えば、多くの市販の漂白組成物、米国特許第5,116,575号）、多層錠（米国特許第6,210,639号）、複数のコンパートメントを有する水溶性のパケット（米国特許第6,995,125号）、及び水を添加すると反応する固体の凝集体（米国特許第6,319,888号）として設計されたものが挙げられる。

30

【0120】

1つの実施態様では、酵素の触媒活性を制御することによって標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産する方法であって、

標的濃度のペルオキシカルボン酸を生産させるために、好適な水性反応条件下で、選択

40

50

された反応成分を混ぜ合わせること、ここで、該反応成分は、

以下を含む第1の混合物：

i) ペルヒドロラーゼ活性を有する酵素触媒、ここで、該酵素触媒はC E - 7シグネチャーモチーフを有する酵素を含む；及び

i) カルボン酸エステル基質；

ここで、該第1の混合物は、場合により、無機又は有機緩衝液、腐食防止剤、湿润剤、及びそれらの組み合わせから成るグループから選択される成分を含む；並びに

過酸素源及び水を含む第2の混合物、ここで、該第2の混合物は、場合によりキレート剤を含む；

を含む；

を含む方法が提供される。

【 0 1 2 1 】

更なる関連する実施態様では、該処方の第1の混合物におけるカルボン酸エステル基質は、

i) 以下の構造

[X]_m R₅

[式中、

X = 式 $R_6C(O)O$ のエステル基であり、

R_6 は、場合によりヒドロキシリル基又は C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換される、C 1 ~ C 7 の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_6 は、場合により、 R_6 が C 2 ~ C 7 の場合 1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

R_5 = 場合によりヒドロキシル基で置換される、C1～C6の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、ここで R_5 中の各炭素原子はそれぞれ最大で1つのヒドロキシル基又は最大で1つのエステル基を含み、ここで R_5 は、場合により、1つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

$m = 1$ から R_5 中の炭素数までの整数である]

を有するエステルであって、

25 で水に対して少なくとも 5 ppm の溶解度を有する、上記エステル；

i i) 以下の構造

【化 3】

$$\begin{array}{ccccccc}
 & \text{O} & & & & & \\
 & \parallel & & & & & \\
 \text{R}_1 & - \text{C} & - \text{O} & - \text{CH}_2 & - \text{CH} & - \text{CH}_2 & - \text{OR}_4 \\
 & & & & | & & \\
 & & & & \text{OR}_3 & &
 \end{array}$$

[式中、場合によりヒドロキシル基又はC1～C4のアルコキシ基で置換される、R₁はC1～C7の直鎖又は分岐鎖のアルキルであり、そしてR₃及びR₄はそれぞれ独立にH又はR₁C(O)である]を有するグリセリド；そして

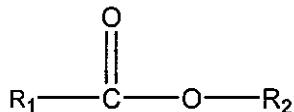
i i i) アセチル化单糖、アセチル化二糖、又はアセチル化多糖から成るグループから選択されるアセチル化糖；

から成るグループから選択される。

【 0 1 2 2 】

別の実施態様において、該処方の第1の混合物中のカルボン酸エステル基質は、以下の式：

【化4】



式中、 $\text{R}_1 = \text{C} 1 \sim \text{C} 7$ の直鎖状又は分枝鎖状のアルキルであり、場合によりヒドロキシル基若しくは $\text{C} 1 \sim \text{C} 4$ のアルコキシ基で置換され、 $\text{R}_2 = \text{C} 1 \sim \text{C} 10$ の直鎖状又は分枝鎖状のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、ヘテロアリール、 $(\text{C}_2\text{H}_2 - \text{O})_n\text{H}$ 、又は $(\text{C}_2\text{H}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_3) - \text{O})_n\text{H}$ であり、そして $n = 1 \sim 10$ である；
によって定義される。

【0123】

1つの好ましい実施態様では、 R_6 は、 $\text{C} 1 \sim \text{C} 7$ の直鎖状のヒドロカルビル部分であり、場合によりヒドロキシル基若しくは $\text{C} 1 \sim \text{C} 4$ のアルコキシ基で置換され、場合により1つ又はそれ以上のエーテル結合を含む。更に好ましい実施態様では、 R_6 は、 $\text{C} 2 \sim \text{C} 7$ の直鎖状のヒドロカルビル部分であり、場合によりヒドロキシル基で置換され、及び/又は場合により1つ又はそれ以上のエーテル結合を含む。

【0124】

別の実施態様において、カルボン酸エステル基質は、以下から成るグループから選択される：モノアセチン；ジアセチン；トリアセチン；モノプロピオニン；ジプロピオニン；トリプロピオニン；モノブチリン；ジブチリン；トリブチリン；グルコースペンタアセテート；キシローステトラアセテート；アセチル化キシラン；アセチル化キシランフラグメント；-D-リボフラノース-1,2,3,5-テトラアセテート；トリ-O-アセチル-D-ガラクタール；トリ-O-アセチル-グルカール；1,2-エタンジオール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、1,2-ブタンジオール、1,3-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,2-ペンタジオール、2,5-ペンタジオール、1,6-ペンタジオール、1,2-ヘキサンジオール、2,5-ヘキサンジオール、及び1,6-ヘキサンジオールのモノエステル又はジエステル；及びそれらの混合物。

【0125】

別の実施態様において、カルボン酸エステルは、モノアセチン、ジアセチン、トリアセチン及びそれらの組み合わせから成るグループから選択される。別の実施態様において、カルボン酸エステルは、アセチル化糖である。別の実施態様において、基質は、1つ又はそれ以上のエステル基を含む $\text{C} 1 \sim \text{C} 7$ ポリオールである。好ましい実施態様では、 $\text{C} 1 \sim \text{C} 6$ の1つ又はそれ以上のヒドロキシル基は、1つ又はそれ以上のアセトキシ基（例えば、1,3-プロパンジオールジアセテート、1,4-ブタンジオールジアセテートなど）で置換される。別の実施態様において、酵素触媒は粒子状固体である。別の実施態様において、上記に記載の第1の反応混合物は、固体錠剤又は粉末である。

【0126】

本明細書で用いられる用語「ペルヒドロリシス」は、選択された基質と過酸化物から過酸を形成する反応と定義される。典型的には、無機過酸化物は、触媒の存在下で選択された基質と反応して、過酸を生産する。あるいは、過酸化水素は、オキシダーゼ活性を有する酵素（例えば、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ）によって触媒される基質と酸素の反応によって、その場生成させることができる。本明細書で用いられる用語「化学的なペルヒドロリシス」は、基質（過酸前駆体）を過酸化水素源と組み合わせるペルヒドロリシス反応を含み、ここで、過酸は酵素触媒の非存在下で形成される。

【0127】

本明細書で用いられる用語「ペルヒドロラーゼ活性」は、タンパク質の単位質量（例え

10

20

30

40

50

ば、ミリグラム)、乾燥細胞質量、又は固定化触媒質量当たりの触媒活性を意味する。

【0128】

本明細書で用いられる、「酵素活性の1単位」又は「活性の1単位」又は「U」は、特定の温度で、1分当たり1 μm o lの過酸生成物の生産に必要なペルヒドロラーゼ活性の量と定義される。

【0129】

本明細書で用いられる用語「酵素触媒」及び「ペルヒドロラーゼ触媒」は、ペルヒドロリシス活性を有する酵素を含む触媒を意味し、これは、微生物の全細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞抽出物、部分的に精製酵素又は精製酵素の1種又はそれ以上の細胞の成分の形態であってもよい。また、その酵素触媒は、化学修飾されていてもよい(例えば、ペグ化によって、又は架橋試薬との反応による)。また、ペルヒドロラーゼ触媒は、当業者によく知られた方法を用いて可溶性又は不溶性支持体に固定化されていてもよい; 例えば、酵素及び細胞の固定化 (Immobilization of Enzymes and Cells) ; Gordon F. Bickertaff, Editor; Humana Press, Totowa, NJ, USA; 1997を参照。本明細書において説明されているように、本発明のペルヒドロリシス活性を有する酵素はいずれも、構造的に炭水化物ファミリーのエステラーゼファミリー7 (CE-7) に属する酵素である (Coutinho, P.M., Henrissat, B. 最近の炭水化物生物工学の進展「炭水化物-活性酵素: 統合データベース入門」 ("Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach" in Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering), H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., (1999) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12を参照)。

【0130】

CE-7ファミリーに属するものとしては、セファロスポリンCデアセチラーゼ (CAH; E.C.3.1.1.41)、及びアセチルキシランエステラーゼ (AXE; E.C.3.1.1.72) が挙げられる。CE-7エステラーゼファミリーに属するものは、保存されたシグネチャーモチーフを共有する (Vincent et al., J. Mol. Biol., 330:593-606 (2003))。CE-7シグネチャーモチーフ及び/又は実質的に類似の構造を含むペルヒドロラーゼは、本発明で使用するのに適している。実質的に類似した生体分子を同定する手段は当該分野で公知である(例えば、配列アラインメントプロトコール、核酸ハイブリダイゼーション、保存されたシグネチャーモチーフの存在など)。1つの態様において、このような本発明の方法における酵素触媒は、本明細書で示された配列と、少なくとも30%、好ましくは少なくとも33%、より好ましくは少なくとも40%、更により好ましくは少なくとも50%、なにより好ましくは少なくとも60%、その上なにより好ましくは少なくとも70%、その上なにより好ましくは少なくとも80%、その上なにより好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有する実質的に類似した酵素を含む。本明細書では、本発明のCE-7炭水化物エステラーゼをコードする核酸分子も提供する。更なる実施態様では、本発明の方法において有用なペルヒドロラーゼ触媒は、ストリンジェントな条件下で本発明の核酸分子の何れか1つにハイブリダイズする核酸分子によってコードされている。

【0131】

本明細書で用いられる用語「セファロスポリンCデアセチラーゼ」及び「セファロスボリンCアセチルヒドロラーゼ」は、セファロスボリンC及び7-アミノセファロスボラン酸のようなセファロスボリンの脱アセチル化を触媒する酵素 (E.C.3.1.1.41) を意味する (Mitsushima et al., Appl. Environ. Microbiol. 61(6): 2224-2229 (1995); 米国特許第5,528,152号; 及び米国特許第5,338,676号)。本明細書で説明されているように、有意なペルヒドロリシス活性を有するいくつかのセファロスボリンCデアセチラーゼが提供される。

【0132】

本明細書で用いられる「アセチルキシランエステラーゼ」は、アセチル化キシラン及び

10

20

30

40

50

その他のアセチル化糖の脱アセチル化を触媒する酵素(E . C . 3 . 1 . 1 . 7 2 ; A X E)を意味する。本明細書で説明されているように、有意なペルヒドロラーゼ活性を有するアセチルキシランエステラーゼとして分類される数種の酵素が提供される。

【 0 1 3 3 】

本明細書で用いられる用語「バチルス・ズブチリス(A T C C (登録商標) 3 1 9 5 4 (商標))」は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection; A T C C)に寄託された、国際寄託の受託番号 A T C C (登録商標) 3 1 9 5 4 (商標) を有する細菌細胞を意味する。バチルス・ズブチリス A T C C (登録商標) 3 1 9 5 4 (商標) は、2~8個の炭素アシル基を有するグリセロールエステル、特にジアセチンを加水分解することができるエステルヒドロラーゼ(「ジアセチナーゼ」)活性を有することが報告されている(米国特許第4,444,886号; 参照によりその全文が本明細書に組み込まれている)。本明細書において説明されているように、有意なペルヒドロラーゼ活性を有する酵素は既に B . ブチリス A T C C (登録商標) 3 1 9 5 4 (商標) から単離されており、これは、配列番号 2 として示される。単離された酵素のアミノ酸配列は、G E N B A N K (登録商標) 受託番号 B A A 0 1 7 2 9 . 1 によって提供されたセファロスボリン C デアセチラーゼと 100% のアミノ酸同一性を有する。

【 0 1 3 4 】

本明細書で用いられる用語「バチルス・ズブチリス B E 1 0 1 0 」は、Payne及びJacks on(J . Bacteriol . 173:2278-2282 (1991))によって報告されているようなバチルス・ズブチリス株を意味する。バチルス・ズブチリス B E 1 0 1 0 は、染色体のズブチリシン及び中性プロテアーゼをコードする遺伝子に欠損を有する、派生的なバチルス・ズブチリス 亜種のズブチリス株 B R 1 5 1 (A T C C (登録商標) 3 3 6 7 7 (商標)) である。本明細書において説明されているように、有意なペルヒドロラーゼ活性を有する酵素は既に B . ブチリス B E 1 0 1 0 から単離されており、これは、配列番号 4 として示される。単離された酵素のアミノ酸配列は、バチルス・ズブチリス 亜種のズブチリス株 B R 1 6 8 で報告されているセファロスボリン C デアセチラーゼと 100% のアミノ酸同一性を有する(Kunst et al ., Nature, 390:249-256 (1997))。

【 0 1 3 5 】

本明細書で用いられる用語「バチルス・ズブチリス A T C C (登録商標) 2 9 2 3 3 (商標) 」は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A T C C)に寄託された、国際寄託の受託番号 A T C C (登録商標) 2 9 2 3 3 (商標) を有するバチルス・ズブチリス株を意味する。本明細書において説明されているように、有意なペルヒドロラーゼ活性を有する酵素は、 B . ズブチリス A T C C (登録商標) 2 9 2 3 3 (商標) から単離され、配列が決定されており、これは、配列番号 3 0 として示される。

【 0 1 3 6 】

本明細書で用いられる用語「クロストリジウム・テルモセルム A T C C (登録商標) 2 7 4 0 5 (商標) 」は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A T C C)に寄託された、国際寄託の受託番号 A T C C (登録商標) 2 7 4 0 5 (商標) を有するクロストリジウム・テルモセルム株を意味する。 C . テルモセルム A T C C (登録商標) 2 7 4 0 5 (商標) 由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 1 2 として示される。

【 0 1 3 7 】

本明細書で用いられる用語「バチルス・ズブチリス A T C C (登録商標) 6 6 3 3 (商標) 」は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A T C C)に寄託された、国際寄託の受託番号 A T C C (登録商標) 6 6 3 3 (商標) を有する細菌細胞を意味する。バチルス・ズブチリス A T C C (登録商標) 6 6 3 3 (商標) は、セファロスボリンのアセチルヒドロラーゼ活性を有することが報告されている(米国特許第6,465,233号)。 B . ズブチリス A T C C (登録商標) 6 6 3 3 (商標) 由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 6 として示される。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる用語「バチルス・リケニフォルミス A T C C (登録商標) 14580 (商標)」は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) に寄託された、国際寄託の受託番号 A T C C (登録商標) 14580 (商標) を有する細菌細胞を意味する。バチルス・リケニフォルミス A T C C (登録商標) 14580 (商標) は、セファロスボリンのアセチルヒドロラーゼ活性を有することが報告されている (G E N B A N K (登録商標) 受託番号 Y P _ 0 7 7 6 2 1)。B.リケニフォルミス A T C C (登録商標) 14580 (商標) 由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 8 として示される。

【 0 1 3 9 】

本明細書で用いられる用語「バチルス・ブミルス P S 2 1 3」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されている細菌細胞を意味する (G E N B A N K (登録商標) A J 2 4 9 9 5 7)。バチルス・ブミルス P S 2 1 3 由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 10 として示される。

【 0 1 4 0 】

本明細書で用いられる用語「サーモトガ・ネアポリタナ」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されているサーモトガ・ネアポリタナ株を意味する (G E N B A N K (登録商標) A A B 7 0 8 6 9)。サーモトガ・ネアポリタナ由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 14 として示される。

【 0 1 4 1 】

本明細書で用いられる用語「サーモトガ・マリチマ M S B 8」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されている細菌細胞を意味する (G E N B A N K (登録商標) N P _ 2 2 7 8 9 3 . 1)。サーモトガ・マリチマ M S B 8 由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 16 として示される。

【 0 1 4 2 】

本明細書で用いられる用語「バチルス・クラウシイ K S M - K 1 6」は、セファロスボリン C デアセチラーゼ活性を有することが報告されている細菌細胞を意味する (G E N B A N K (登録商標) Y P _ 1 7 5 2 6 5)。バチルス・クラウシイ K S M - K 1 6 由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 24 として示される。

【 0 1 4 3 】

本明細書で用いられる用語「サーモアナエロバクテリウム・サッカロリチカム」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されている細菌の菌株を意味する (G E N B A N K (登録商標) S 4 1 8 5 8)。サーモアナエロバクテリウム・サッカロリチカム由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列は、配列番号 54 として示される。

【 0 1 4 4 】

本明細書で用いられる用語「サーモトガ・レティンガエ」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されている細菌細胞を意味する (G E N B A N K (登録商標) C P 0 0 0 8 1 2)。サーモトガ・レティンガエ由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素の推測したアミノ酸配列は、配列番号 56 として示される。

【 0 1 4 5 】

本明細書で用いられる用語「サーモトガ・ペトロフィラ」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されている細菌細胞を意味する (G E N B A N K (登録商標) C P 0 0 0 7 0 2)。サーモトガ・ペトロフィラ由来のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素の推測したアミノ酸配列は、配列番号 58 として示される。

【 0 1 4 6 】

本明細書で用いられる用語「サーモトガ属 R Q 2」は、アセチルキシランエステラーゼ活性を有することが報告されている細菌細胞を意味する (G E N B A N K (登録商標) C P 0 0 0 9 6 9)。サーモトガ属 R Q 2 から異なる 2 つのアセチルキシランエステラーゼが同定されており、それらは本明細書において「R Q 2 (a)」(推測されるアミノ酸配列は配列番号 60 として示される) 及び「R Q 2 (b)」(推測されるアミノ酸配列は配

10

20

30

40

50

列番号 62 として示される) を意味する。

【0147】

本明細書で用いられる用語「単離された核酸分子」及び「単離された核酸フラグメント」は、交換可能に用いられることになり、一本鎖又は二本鎖の RNA 又は DNA の高分子を意味し、場合により合成、非天然又は改変されたヌクレオチド塩基を含む。DNA の高分子の形態で単離された核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA、又は合成DNAの1種又はそれ以上のセグメントで構成されていてもよい。

【0148】

用語「アミノ酸」は、タンパク質又はポリペプチドの基礎となる化学的な構造単位を意味する。本明細書において、特定のアミノ酸を示すのに以下の略語が用いられる：

【表1】

<u>アミノ酸</u>	<u>3文字略語</u>	<u>1文字略語</u>
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
システィン	C y s	C
グルタミン	G l n	Q
グルタミン酸	G l u	E
グリシン	G l y	G
ヒスチジン	H i s	H
イソロイシン	I l e	I
ロイシン	L e u	L
リジン	L y s	K
メチオニン	M e t	M
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
セリン	S e r	S
スレオニン	T h r	T
トリプトファン	T r p	W
チロシン	T y r	Y
バリン	V a l	V
任意の(又は本明細書で定義の) アミノ酸	X a a	X

【0149】

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる「実質的に類似した」は、核酸分子において、1個又はそれ以上のヌクレオチド塩基における変化によって1個又はそれ以上のアミノ酸の付加、置換又は欠失がおこるが、そのDNA配列によってコードされたタンパク質の機能特性（即ち、ペルヒドロリシス活性）に影響を与えないことを意味する。また本明細書で用いられる「実質的に類似した」は、本明細書において報告された配列に対して、少なくとも30%、好みしくは少なくとも33%、より好みしくは少なくとも40%、更により好みしくは少なくとも50%、なおより好みしくは少なくとも60%、その上なより好みしくは少なくとも70%、その上なより好みしくは少なくとも80%、その上なより好みしくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一なアミノ酸配列を有する酵素も意味しており、その中で、生じた酵素は本発明の機能特性（即ち、ペルヒドロリシス活性）を保持する。また、「実質的に類似した」は、ストリンジエントな条件下で本明細書において報告された核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によってコードされた、ペルヒドロリシス活性を有する酵素を意味する場合もある。従って、当然ながら、本発明は、特定の例示された配列よりも多くのものを包含する。10

【0150】

例えれば、当該分野でよく知られているように、所定の部位で化学的に等価なアミノ酸の生産をもたらすが、コードされたタンパク質の機能特性に影響を与えない遺伝子の変更は一般的である。本発明の目的に対して、置換は、以下の5グループのうちいずれか1つの範囲内の変換と定義される：20

1. 小さい脂肪族の非極性の又はわずかに極性を有する残基：A l a、S e r、T h r（P r o、G l y）；
2. 極性の負電荷を有する残基及びそれらのアミド：A s p、A s n、G l u、G l n；
3. 極性の正電荷を有する残基：H i s、A r g、L y s；
4. 大きい脂肪族の非極性残基：M e t、L e u、I l e、V a l（C y s）；及び
5. 大きい芳香族残基：P h e、T y r、T r p。

【0151】

従って、疎水性アミノ酸であるアミノ酸アラニンに対応するコドンが、その他のより低い疎水性の残基（例えは、グリシン）、又はより高い疎水性の残基（例えは、バリン、ロイシン又はイソロイシン）をコードするコドンで置換されていてもよい。同様に、ある負電荷を有する残基の他の残基での置換（例えは、グルタミン酸をアスパラギン酸で置換）、又はある正電荷を有する残基の他の残基での置換（例えは、アルギニンをリジンで置換）が起こる変化も、また、機能的に等価な生成物を生産することができる。多くの場合において、タンパク質分子のN末端及びC末端部分の変更をもたらすヌクレオチドの変化も、また、タンパク質活性を変更しないと予測される。30

【0152】

提案されたそれぞれの改変は、十分に当該分野における決まりきった技術の範囲内であり、コードされた生成物の生物活性が保持されているかどうかの決定も同様である。更に、当業者は、実質的に類似した配列も本発明に包含されることを認識している。1つの実施態様において、実質的に類似した配列は、ストリンジエントな条件下（0.1×S S C、0.1% S D S、65°、及び2×S S C、0.1% S D Sで洗浄、続いて0.1×S S C、0.1% S D S、65°）で、本明細書において例示された配列とハイブリダイズするそれらの能力によって定義される。1つの実施態様において、本発明は、ストリンジエントな条件下で、本明細書において報告された核酸分子にハイブリダイズする単離された核酸分子によってコードされた、ペルヒドロラーゼ活性を有する酵素を含む。好みしい実施態様において、本発明は、ストリンジエントな条件下で配列番号1、配列番号9、配列番号13、及び配列番号15から成るグループから選択される核酸配列を有する核酸分子にハイブリダイズする、単離された核酸分子によってコードされたペルヒドロラーゼ活性を有する酵素を含む。40

【0153】

本明細書で用いられるように、温度及び溶液のイオン強度の適切な条件下で、第1の核酸分子の一本鎖がその他の核酸分子にアニールすることができる場合、その核酸分子は、cDNA、ゲノムDNA又はRNAのような他の核酸分子に「ハイブリダイゼーション可能」である。ハイブリダイゼーション及び洗浄条件はよく知られており、Sambrook, J. 及び Russell, D., T. の、分子クローニング：実験室マニュアル、第3版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001) に例が示されている。ハイブリダイゼーションの「ストリングエンサー」を決定するのは、温度及びイオン強度の条件である。ストリングエンサー条件を調節することによって、中程度に類似した分子、例えば、関連性の遠い生物由来の相同配列から、高度に類似した分子、例えば、密接に関連した生物由来の機能的な酵素を複製する遺伝子までスクリーニングすることができる。典型的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄がストリングエンサー条件を決定する。好ましい条件の構成は、 $6 \times SSC$ 、 $0.5\% SDS$ を用いた室温で 15 分間の洗浄から開始し、続いて $2 \times SSC$ 、 $0.5\% SDS$ を用いた 45 で 30 分間の洗浄を繰り返し、続いて $0.2 \times SSC$ 、 $0.5\% SDS$ を用いた 50 で 30 分間の洗浄を 2 回繰り返す一連の洗浄を使用するものである。より好ましい構成は、より高い温度を使用するものであり、この場合、最後の $0.2 \times SSC$ 、 $0.5\% SDS$ を用いた 2 回の 30 分間の洗浄の温度が、60 に高められることを除いて、洗浄は上記の洗浄と同じである。その他の好ましいストリングエントなハイブリダイゼーションの条件の構成は、 $0.1 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ 、65 及び $2 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ で洗浄、続いて最後に本明細書において例示された順序を用いた、 $0.1 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ 、65 での洗浄である。10 20

【0154】

ハイブリダイゼーションは、2種の核酸が相補配列を含むことが必要であるが、ハイブリダイゼーションのストリングエンサーに応じて、塩基間のミスマッチが生じる可能性がある。ハイブリダイゼーションする核酸にとって適切なストリングエンサーは、核酸の長さ、及び相補性の程度、当該分野で公知の可変値に依存する。2種のヌクレオチド配列間の類似性又は相同性の程度が大きいほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドのための T_m 値は大きくなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対的な安定性（より高い T_m に対応する）は、以下の順番で低くなる：RNA : RNA、DNA : RNA、DNA : DNA。長さが 100 個より長いヌクレオチドのために、 T_m を計算する方程式が導かれている (Sambrook 及び Russell、上記)。比較的短い核酸、即ち、オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションのためには、ミスマッチの位置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する (Sambrook 及び Russell、上記)。1つの態様では、ハイブリダイゼーション可能な核酸は、少なくとも約 10 個のヌクレオチドの長さを有する。好ましくはハイブリダイゼーション可能な核酸の最短の長さは、少なくとも約 15 個のヌクレオチドの長さ、より好ましくは少なくとも約 20 個のヌクレオチドの長さ、更により好ましくは少なくとも 30 個のヌクレオチドの長さ、更により好ましくは少なくとも 300 個のヌクレオチドの長さ、及び最も好ましくは少なくとも 800 個のヌクレオチドの長さである。更に、当然のことながら、当業者は、プローブの長さのような要素に応じて、温度及び洗浄溶液の塩濃度を調節することが可能であることを認識している。30 40

【0155】

本明細書で用いられる用語「パーセント同一性」は、配列の比較によって決められるような、2種又はそれ以上のポリペプチド配列間、又は2種又はそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当業界において、「同一性」は、また、ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列間の配列の関連性の程度も意味し、これは、場合によっては、このような配列のストリング間のマッチングによって決定されることもある。「同一性」及び「類似性」は、既知の方法によって容易に計算することができ、このような方法としては、これらに限定されないが、以下で説明されるものが挙げられる：Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Info 50

rmatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); and Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Dvereux, J., eds.) Stockton Press, NY (1991)。同一性及び類似性を決定する方法は、公に利用可能なコンピュータープログラムにおいて体系化されている。配列アラインメント及びパーセント同一性の計算は、Megalign program of the LASERGENE bioinformatics computing suite (DNASTAR Inc., Madison, WI), the AlignX program of Vector NTI v. 7.0 (Informax, Inc., Bethesda, MD), 又は the EMBOSS Open Software Suite (EMBL-EBI; Rice et al., Trends in Genetics 16, (6) pp276-277 (2000)) を用いて行ってもよい。アラインメントのクラスタル (Clustal) 法 (即ち、CLUSTALW; 例えは、バージョン 1.83) (Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151153 (1989); Higgins et al., Nucleic Acids Res., 22:4673-4680 (1994); and Chenna et al., Nucleic Acids Res., 31 (13):3497-500 (2003); the European Bioinformatics Institute 経由で the European Molecular Biology Laboratory から入手可能) を用いて、デフォルトパラメーターにより配列のマルチプルアラインメントを行うことができる。CLUSTALW タンパク質アラインメントの好適なパラメーターは、GAP 存在ペナルティー = 15、GAP 伸長 = 0.2、マトリックス = Gonnet (例えは、Gonnet 250)、タンパク質 END GAP = -1、タンパク質 GAPDIST = 4、及び K T U P L E = 1 を含む。1 つの実施態様において、速い又は遅いアラインメントがデフォルト設定で用いられ、この場合遅いアラインメントが好ましい。あるいは、CLUSTALW 法 (バージョン 1.83) を用いるパラメーターは、K T U P L E = 1、GAP 存在ペナルティー = 10、GAP 伸長 = 1、マトリックス = BLOSUM (例えは、BLOSUM 64)、ウィンドウ = 5、保存された頂点対角 (TOP DIAGONAL SAVED) = 5 も使用できるように改変してもよい。

【0156】

本発明の 1 つの態様において、好適な単離された核酸分子 (本発明の単離されたポリヌクレオチド) は、本明細書において報告されたアミノ酸配列に、少なくとも 30%、好ましくは少なくとも 33%、より好ましくは少なくとも 40%、更により好ましくは少なくとも 50%、なおより好ましくは少なくとも 60%、その上なおより好ましくは少なくとも 70%、その上なおより好ましくは少なくとも 80%、その上なおより好ましくは少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。本発明の好適な核酸分子は、上記の相同性を有するだけでなく、典型的には、約 310 ~ 約 340 個のアミノ酸、より好ましくは約 310 ~ 約 330 個のアミノ酸、及び最も好ましくは約 318 個のアミノ酸を有するポリペプチドもコードする。

【0157】

本明細書で用いられる用語「シグネチャーモチーフ」、「CE-7シグネチャーモチーフ」及び「診断モチーフ」は、定義された活性を有する酵素ファミリーの間で共通の保存された構造を意味する。このようなシグネチャーモチーフを用いて、定義された基質グループに対して類似した酵素活性を有する構造的に関連する酵素のファミリーを特徴付け及び / 又は同定することができる。シグネチャーモチーフは、単一の連続したアミノ酸配列でもよいし、又は一緒になってシグネチャーモチーフを形成する隣接していない保存されたモチーフの集合であってもよい。典型的には、保存されたモチーフは、アミノ酸配列で示される。本明細書において説明されているように、本発明のペルヒドロラーゼは、CE-7 炭水化物エステラーゼファミリーに属する。この酵素ファミリーは、シグネチャーモチーフの存在によって特徴付けることができる (Vincent et al.、上記)。

【0158】

本明細書で用いられる「コドンの縮退」は、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列に影響を与えることなく、ヌクレオチド配列の変化が可能な遺伝子コードの性質を意味する。従って、本発明は、本発明の微生物のポリペプチドをコードする、アミノ酸配列の全

10

20

30

40

50

部又はかなりの部分をコードするあらゆる核酸分子に関する。当業者であれば、所定のアミノ酸を指定するためのヌクレオチドコドンの使用において、特定の宿主細胞によって示される「コドン偏位」のことはよく認識している。従って、宿主細胞における発現を改善するための遺伝子を合成する場合、そのコドンの使用頻度が宿主細胞の好ましいコドンの使用頻度に近くなるように遺伝子を設計することが望ましい。

【0159】

本明細書で用いられる「合成遺伝子」は、当業者によく知られた手法を用いて化学合成されたオリゴヌクレオチドの部分構造から構築することができる。これらの部分構造をライゲーションし、アニールして遺伝子のセグメントを形成することができ、続いてこれを酵素的に組み立てて遺伝子全体を構築することができる。「化学合成された」は、DNA配列に関する場合、ヌクレオチド成分が生体外で構築されたことを意味する。十分に確立された手法を用いて、DNAの手作業による化学合成を達成してもよいし、又は多数の市販の機械のいずれか1種を用いて自動化学合成を行ってもよい。従って、このような遺伝子は、宿主細胞のコドン偏位を反映するヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現が行われるように適合させることができる。当業者は、コドンの使用が、宿主にとって好ましいコドンに偏っている場合、遺伝子発現の成功的見込みについてよく理解している。好ましいコドンの決定は、配列情報が入手可能な宿主細胞由来の遺伝子の調査に基づいて行うことができる。

10

【0160】

本明細書で用いられる「遺伝子」は、特定のタンパク質を発現する核酸分子を意味し、これには、コード配列の前に存在する調節配列(5'の非コード配列)、及びコード配列の後に存在する調節配列(3'の非コード配列)も含まれる。「天然型の遺伝子」は、天然に見出されるような遺伝子(それら自身の調節配列も共に含む)を意味する。「キメラ遺伝子」は、天然に一緒に見出されない調節及びコード配列を含む非天然型遺伝子であるあらゆる遺伝子を意味する。従って、キメラ遺伝子は、異なる供給源から誘導された調節配列及びコード配列を含んでもよいし、又は同じ供給源から誘導されたが、天然に見出されるものとは異なる形態で配置された調節配列及びコード配列を含んでもよい。「内因性遺伝子」は、生物のゲノムの中でそれらの天然の位置に存在する天然型遺伝子を意味する。「外来」遺伝子は、通常では宿主生物中に見出されないが、遺伝子移入によって宿主生物に導入される遺伝子を意味する。外来遺伝子は、非天然型の生物に挿入された天然型遺伝子を含んでいてもよいし、又はキメラ遺伝子を含んでいてもよい。「導入遺伝子」は、形質転換によってゲノムに導入された遺伝子である。

20

30

【0161】

本明細書で用いられる「コード配列」は、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を意味する。「好適な調節配列」は、コード配列の上流(5'の非コード配列)、コード配列内、又はその下流(3'の非コード配列)に位置し、転写、RNAプロセッシング、又は連結したコード配列の安定性若しくは翻訳に影響を与えるヌクレオチド配列を意味する。調節配列は、プロモーター、翻訳リーダー配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、及びシステム・ループ構造を含んでいてもよい。

【0162】

40

本明細書で用いられる「プロモーター」は、コード配列又は機能的なRNAの発現を制御することができるDNA配列を意味する。一般に、コード配列は、プロモーター配列の3'側に位置する。プロモーターは、それらの全体が天然型遺伝子から誘導されたものでもよいし、又は天然に見出される異なるプロモーターから誘導された異なる要素で構成されていてもよいし、又は合成DNAセグメントを含んでいてもよい。当業者は、様々なプロモーターが、発生の様々な段階で、又は様々な環境又は生理学的条件に応答して、遺伝子の発現を指示する可能性があることを理解する。最も多くの場合、遺伝子を発現させるプロモーターは、一般的に「構成的プロモーター」と呼ばれる。更に、ほとんどの場合、調節配列の正確な境界は完全に決められていないため、異なる長さのDNAフラグメントが、同一のプロモーター活性を有する可能性があることが認められている。

50

【0163】

本明細書で用いられる「3'非コード配列」は、コード配列の下流に位置するDNA配列を意味し、このような配列としては、ポリアデニル化認識配列（一般的には、真核生物に限定される）、及びmRNAプロセッシング又は遺伝子発現に影響を与えることができる調節シグナルをコードするその他の配列が挙げられる。ポリアデニル化シグナルは、通常は、mRNA前駆体の3'末端へのポリアデニル酸領域（一般的には、真核生物に限定される）に影響を与えることを特徴とする。

【0164】

本明細書で用いられる用語「機能するように連結した」は、一方の機能が他方の影響を受けるように、単一の核酸分子へ核酸配列が連結していることを意味する。例えば、プロモーターがそのコード配列の発現に影響を与えることができる場合、そのプロモーターはコード配列と機能する様に連結しており、即ち、そのコード配列は、プロモーターの転写制御下にある。コード配列は、センス方向で調節配列に機能するように連結していくよいし、又はアンチセンス方向で連結していくてもよい。

10

【0165】

本明細書で用いられる用語「発現」は、本発明の核酸分子から誘導されたセンス（mRNA）又はアンチセンスRNAの転写及び安定な蓄積を意味する。また、発現は、mRNAのポリペプチドへの翻訳を意味することもある。

【0166】

本明細書で用いられる「形質転換」は、宿主生物のゲノムに核酸分子が移入することによって、遺伝学的に安定な遺伝が起こることを意味する。本発明において宿主細胞のゲノムは、染色体遺伝子、及び染色体外遺伝子（例えば、プラスミド）を含む。形質転換した核酸分子を含む宿主生物は、「トランスジェニック」又は「組み換え」又は「形質転換した」生物と呼ばれる。

20

【0167】

本明細書で用いられる用語「プラスミド」、「ベクター」及び「カセット」は、多くの場合に細胞の中の中心的な代謝の一部ではない遺伝子を有する染色体外要素を意味し、通常は環状の二本鎖DNA分子の形態である。このような要素は、自律複製型の配列、ゲノムを統合させる配列、ファージ又はヌクレオチド配列であってもよく、直鎖状又は環状でもよく、あらゆる供給源から誘導された一本鎖又は二本鎖DNA又はRNAでもよく、ここで、多数のヌクレオチド配列が統合されるか又は組み換えられて、選択された遺伝子産物のためのプロモーターフラグメント及びDNA配列を、適切な3'非翻訳配列と共に細胞に導入することができる特有の構造になる。「形質転換カセット」は、外来遺伝子を含み、外来遺伝子に加えて特定の宿主細胞の形質転換を容易にするエレメントを有する特定のベクターを意味する。「発現カセット」は、外来遺伝子を含み、外来遺伝子に加えて、その遺伝子の外来宿主中の発現を強化することができるエレメントを有する特定のベクターを意味する。

30

【0168】

本明細書で用いられる用語「配列解析ソフトウェア」は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列の解析に有用な、あらゆるコンピューターアルゴリズム又はソフトウェアプログラムを意味する。「配列解析ソフトウェア」は、市販のものでもよいし、又は個別に開発したものでもよい。典型的な配列解析ソフトウェアとしては、これらに限定されないが、一式のGCGプログラム（Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI）、BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403410 (1990)、及びDANSTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 USA)、CLUSTALW (例えば、バージョン1.83; Thompson et al., Nucleic Acids Research, 22(22):4673-4680 (1994)、及びSmith-Watermanアルゴリズムを内包したFASTAプログラム (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 11120. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, NY)、Vector NTI (Informax, Bethesda, M

40

50

D)、及び Sequencher v. 4.05 が挙げられる。本出願に関して、解析に配列解析ソフトウェアが用いられる場合、解析結果は、特に他の規定がない限り指定されたプログラムの「デフォルト値」に基づくこととする。本明細書で用いられる「デフォルト値」は、ソフトウェアの製造元によって設定されたあらゆる値又はパラメーターのセットを意味することとし、このようなデフォルト値は、最初に初期設定した際にソフトウェアでもともとローディングされるものである。

【0169】

本明細書で用いられる用語「生物学的な汚染物質」は、1種又はそれ以上の不要な、及び/又は病原性の生物学的な物体を意味し、例えば、これらに限定されないが、微生物、胞子、ウイルス、プリオン、及びそれらの混合物が挙げられる。本方法は、生存可能な生物学的な汚染物質の存在を減少及び/又は除去するのに有用な有効濃度の少なくとも1種の過カルボン酸を生産する。好ましい実施態様において、微生物汚染物質は、生きた病原性の微生物である。

【0170】

本明細書で用いられる用語「消毒する」は、生物学的な汚染物質を破壊したり、又はその増殖を予防したりするプロセスを意味する。本明細書で用いられる用語「消毒剤」は、生物学的な汚染物質を破壊したり、中和したり、又はその増殖を阻害することによって消毒作用を示す物質を意味する。典型的には、消毒剤は、無生物又は表面を処理するのに用いられる。本明細書で用いられる用語「防腐剤」は、病気を運搬する微生物の増殖を阻害する化学物質を意味する。実施態様の1つの態様では、生物学的な汚染物質は病原微生物である。

【0171】

本明細書で用いられる用語「殺ウイルス剤」は、ウイルスを阻害又は破壊する物質を意味し、「viricide」と同義語である。ウイルスを阻害又は破壊する能力を示す物質は、「殺ウイルス」活性を有すると説明される。過酸は、殺ウイルス活性を有する可能性がある。本発明と共に使用するのに好適な、当該分野で既知の典型的な代替えの殺ウイルス剤としては、例えば、アルコール、エーテル、クロロホルム、ホルムアルデヒド、フェノール、-プロピオラクトン、ヨウ素、塩素、水銀塩、ヒドロキシルアミン、エチレンオキシド、エチレングリコール、第四級アンモニウム化合物、酵素、及び洗剤が挙げられる。

【0172】

本明細書で用いられる用語「殺生物剤」は、微生物を不活性又は破壊する化学物質を意味し、典型的には広範囲抗菌スペクトルを有するものである。微生物を不活性又は破壊する能力を示す化学物質は、「殺菌」活性を有すると説明される。過酸は、殺菌活性を有する可能性がある。本発明で使用するのに好適な、当該分野で既知の典型的な代わりの殺生物剤としては、例えば、塩素、二酸化塩素、クロロイソシアヌレート、次亜塩素酸塩、オゾン、アクロレイン、アミン、塩素化フェノール、銅塩、有機硫黄化合物、及び第四級アンモニウム塩が挙げられる。

【0173】

本明細書で用いられる語句「最少殺菌濃度」は、一定の接触時間で、標的微生物の生存する集団に、所望の致死性で不可逆的な減少を引き起こす殺菌性の物質の最少濃度を意味する。この有効性は、処理後の生存する微生物数の $10^{g_{10}}$ の減少によって測定することができる。1つの態様において、標的とする生存微生物における処理後の減少は、少なくとも 310^g の減少、より好ましくは少なくとも 410^g の減少、及び最も好ましくは少なくとも 510^g の減少である。別の態様において、最少殺菌濃度は、生存微生物細胞で少なくとも 610^g の減少である。

【0174】

本明細書で用いられる用語「過酸素源」及び「過酸素の源」は、水溶液にした場合、約 1mM 又はそれ以上の濃度で過酸化水素を与えることができる化合物を意味し、例えば、それらに限定されないが、過酸化水素、過酸化水素付加物（例えば、尿素の過酸化水素付

10

20

30

40

50

加物（カルバミドペルオキシド））、ペルボーレート、及びペルカルボネートが挙げられる。本明細書において説明されているように、反応混合物水溶液中で過酸素化合物によって提供される過酸化水素の濃度は、反応成分を混ぜ合わせた際に、最初のうちは少なくとも 1 mM 又はそれより高い濃度である。1 つの実施態様において、反応混合物水溶液中の過酸化水素の濃度は、少なくとも 10 mM である。別の実施態様において、反応混合物水溶液中の過酸化水素の濃度は、少なくとも 100 mM である。別の実施態様において、反応混合物水溶液中の過酸化水素の濃度は、少なくとも 200 mM である。別の実施態様において、反応混合物水溶液中の過酸化水素の濃度は、少なくとも 500 mM 又はそれより高い濃度である。更に別の実施態様において、反応混合物水溶液中の過酸化水素の濃度は、少なくとも 1000 mM 又はそれより高い濃度である。反応混合物水溶液中の過酸化水素と酵素基質（例えば、トリグリセリド）とのモル比（H₂O₂ : 基質）は、約 0.002 ~ 2.0 であってもよく、好ましくは約 0.1 ~ 1.0、最も好ましくは 0.5 ~ 5 である。あるいは、過酸素源（例えば、過酸化水素）は、オキシダーゼ活性を有する酵素（例えば、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミンオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ）によって触媒された基質と酸素の反応によって、その場生成させることができる。

【0175】

カルボン酸エステル及び過酸化水素からの酵素触媒による、過酸の製造を制御するための好適な反応条件

1 つの態様において、pH 感受性ペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒の存在下で、カルボン酸エステルと、無機過酸化物、例えば、これらに限定されないが、過酸化水素、過ホウ酸ナトリウム又は過炭酸ナトリウムとを反応させることによって標的濃度の過酸を含む水性混合物の製造方法が提供される。1 つの実施態様において、このような酵素触媒は、CE-7 炭水化物エステラーゼファミリーに属する構造を有するペルヒドロラーゼを含む。別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、構造的にセファロスポリン C デアセチラーゼと分類される。別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、構造的にアセチルキシランエステラーゼと分類される。

【0176】

1 つの実施態様では、ペルヒドロラーゼ触媒は、CLUSTALW を用いると参照配列の配列番号 2 と合致する CE-7 シグネチャーモチーフを有する酵素を含み、該シグネチャーモチーフは以下を含む：

- i) 配列番号 2 のアミノ酸位置 118 ~ 120 に RGQ モチーフ；
- ii) 配列番号 2 のアミノ酸位置 179 ~ 183 に SEQ モチーフ；及び
- iii) 配列番号 2 のアミノ酸位置 298 ~ 299 に HE モチーフ；

ここで、該酵素は、配列番号 2 に対して少なくとも 30 % のアミノ酸同一性を有する。

【0177】

更なる実施態様において、シグネチャーモチーフは、更に CLUSTALW を用いて参照配列の配列番号 2 に合致した場合、アミノ酸残基 267 ~ 269 に LXD モチーフと定義された第 4 の保存されたモチーフを含む。

【0178】

別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 30、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 58、配列番号 60、及び配列番号 62 から成るグループから選択されるアミノ酸配列を有する酵素、又は前記アミノ酸配列に 1 つ又はそれ以上のアミノ酸の置換、欠失又は付加によって誘導されたペルヒドロラーゼ活性を有する実質的に類似した酵素を含む。

【0179】

別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号

10

20

30

40

50

18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号30、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、及び配列番号62から成るグループから選択される1つ又はそれ以上のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるアミノ酸配列を有する、実質的に類似した酵素を含む。

【0180】

別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号29、配列番号55、配列番号57、配列番号59、及び配列番号61から成るグループから選択される核酸配列にハイブリダイズする核酸分子によってコードされたアミノ酸配列を有する酵素を含む。

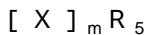
10

【0181】

別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号61として定義され、上記の保存されたモチーフ（例えば、RGQ、GXSQG、及びHE、並びに場合によりLXD）が保存されている連続的なシグネチャーモチーフと、少なくとも30%、好ましくは36%のアミノ酸同一性を有する酵素が含まれる。

【0182】

1つの実施態様において、好適な基質は以下の式：



20

式中、

X = 式 $R_6 C(O)O$ のエステル基、 $R_6 = C_1 \sim C_7$ の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、場合によりヒドロキシル基若しくは $C_1 \sim C_4$ のアルコキシ基で置換され、ここで、 R_6 は、場合により、 R_6 が $C_2 \sim C_7$ の場合は1つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

$R_5 = C_1 \sim C_6$ の直鎖状、分枝鎖状又は環状のヒドロカルビル部分であり、場合によりヒドロキシル基で置換され、ここで、 R_5 中のそれぞれの炭素原子は単独に最大で1つのヒドロキシル基又は最大で1つのエステル基を含み、且つ、 R_5 は、場合により1つ又はそれ以上のエーテル結合を含み；

$m = 1$ から R_5 中の炭素数までの整数であり；

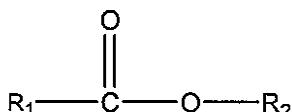
30

ここで、25における水に対する該エステルの溶解度は、少なくとも5ppmである；で示されるエステルを含む。

【0183】

別の実施態様において、好適な基質は、また、以下の式：

【化5】



40

式中、

$R_1 = C_1 \sim C_7$ の直鎖状又は分枝鎖状のアルキルであり、場合によりヒドロキシル基若しくは $C_1 \sim C_4$ のアルコキシ基で置換され；そして

$R_2 = C_1 \sim C_{10}$ の直鎖状又は分枝鎖状のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アルキルアリール、アルキルヘテロアリール、ヘテロアリール、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 、又は $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_n\text{H}$ であり；そして

$n = 1 \sim 10$ である；

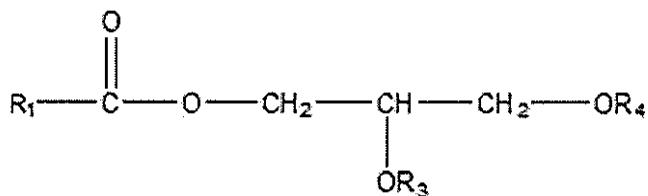
のエステルを含む。

【0184】

別の実施態様において、好適な基質は、以下の式：

50

【化6】



式中、

R_1 = C 1 ~ C 7 の直鎖状又は分枝鎖状のアルキルであり、場合によりヒドロキシル基
若しくは C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換され；

R_3 及び R_4 は、それぞれ H 又は $\text{R}_1\text{C}(\text{O})$ である；
のグリセリド含む。

【0185】

別の実施態様において、 R_6 は、C 1 ~ C 7 の直鎖状のヒドロカルビル部分であり、場合によりヒドロキシル基若しくは C 1 ~ C 4 のアルコキシ基で置換され、場合により、1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含む。更なる好ましい実施態様では、 R_6 は、C 2 ~ C 7 の直鎖状のヒドロカルビル部分であり、場合によりヒドロキシル基で置換され、及び/又は場合により、1 つ又はそれ以上のエーテル結合を含む。

【0186】

別の実施態様において、好適な基質は、また、アセチル化単糖、アセチル化二糖、及びアセチル化多糖から成るグループから選択されるアセチル化糖も含む。好ましい実施態様では、アセチル化糖としては、アセチル化単糖、アセチル化二糖、及びアセチル化多糖が挙げられる。別の実施態様において、アセチル化糖は、アセチル化キシラン、アセチル化キシランフラグメント、アセチル化キシロース（例えば、キシローステトラアセテート）、アセチル化グルコース（例えば、グルコースペンタアセテート）、-D-リボフラノース-1, 2, 3, 5-テトラアセテート、トリ-O-アセチル-D-ガラクタール、及びトリ-O-アセチル-グルカール、及びアセチル化セルロースから成るグループから選択される。好ましい実施態様において、アセチル化糖は、-D-リボフラノース-1, 2, 3, 5-テトラアセテート、トリ-O-アセチル-D-ガラクタール、及びトリ-O-アセチル-グルカール、及びアセチル化セルロースから成るグループから選択される。そのようなものとして、アセチル化炭水化物は、本発明の方法を用いて（即ち、過酸素源の存在下で）過カルボン酸を生成するのに好適な基質の可能性がある。

【0187】

1つの実施態様において、基質は、モノアセチン；ジアセチン；トリアセチン；モノブロピオニン；ジプロピオニン；トリプロピオニン；モノブチリン；ジブチリン；トリブチリン；グルコースペンタアセテート；キシローステトラアセテート；アセチル化キシラン；アセチル化キシランフラグメント；-D-リボフラノース-1, 2, 3, 5-テトラアセテート；トリ-O-アセチル-D-ガラクタール；トリ-O-アセチル-グルカール；1, 2-エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-プロパンジオール、1, 2-ブタンジオール、1, 3-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオール、1, 4-ブタンジオール、1, 2-ペンタンジオール、2, 5-ペンタンジオール、1, 6-ペンタンジオール、1, 2-ヘキサンジオール、2, 5-ヘキサンジオール、及び1, 6-ヘキサンジオールのモノエステル又はジエステル；及びそれらの混合物から成るグループから選択される。

【0188】

好ましい実施態様において、基質は、酢酸エチル、乳酸メチル、乳酸エチル、グリコール酸メチル、グリコール酸エチル、メトキシ酢酸メチル、メトキシ酢酸エチル、3-ヒドロキシ酪酸メチル、3-ヒドロキシ酪酸エチル、2-アセチルクエン酸トリエチル、グルコースペンタアセテート、グルコノラクトン、グリセリド（モノ、ジ及びトリグリセリド

10

20

30

40

50

)、例えばモノアセチン、ジアセチン、トリアセチン、モノプロピオニン、ジプロピオニン(グリセリルジプロピオナート)、トリプロピオニン(1,2,3-トリプロピオニルグリセロール)、モノブチリン；ジブチリン(グリセリルジブチラート)、トリブチリン(1,2,3-トリブチルグリセロール)、アセチル化糖、及びそれらの混合物から成るグループから選択される。

【0189】

更なる好ましい態様において、カルボン酸エステル基質は、モノアセチン、ジアセチン、トリアセチン、モノプロピオニン、ジプロピオニン；トリプロピオニン；モノブチリン；ジブチリン；トリブチリン、酢酸エチル、及び乳酸エチルから成るグループから選択される。なお別の態様では、カルボン酸エステル基質は、ジアセチン、トリアセチン、酢酸エチル、及び乳酸エチルから成るグループから選択される。好ましい態様では、カルボン酸エステルは、モノアセチン、ジアセチン、トリアセチン、及びそれらの混合物から成るグループから選択されるグリセリドである。

10

【0190】

カルボン酸エステルは、酵素触媒によるペルヒドロリシスの際に目的の濃度の過酸を生産するのに十分な濃度で反応混合物中に存在する。カルボン酸エステルは、反応混合物中において完全に可溶性でなくてもよいが、ペルヒドロラーゼ触媒によるエステルの対応する過酸への変換を許容する程度の溶解性を有する。カルボン酸エステルは、反応混合物の0.0005質量%～40質量%の濃度で、好ましくは反応混合物の0.1質量%～20質量%の濃度で、そしてより好ましくは反応混合物の0.5質量%～10質量%の濃度で反応混合物中に存在する。カルボン酸エステルの質量%は、場合によりカルボン酸エステルの溶解度限界よりも大きくてよく、その結果、例えば、カルボン酸エステルの濃度は、水、酵素触媒、及び過酸素源を含む反応混合物中の少なくとも0.0005質量%であり、その場合、カルボン酸エステルの残りは、水/有機の2相反応混合物の第2の分離相として残る。添加されたカルボン酸エステルの全部が直ちに反応混合物水溶液に溶ける必要はなく、最初の全ての反応成分を混合した後、追加の連続的又は断続的な混和は任意である。

20

【0191】

過酸素源としては、過酸化水素、過酸化水素付加物(例えば、尿素の過酸化水素付加物(カルバミドペルオキシド))、ペルボーレート、及びペルカルボネートが挙げられるが、これらに限定されない。反応混合物中の過酸素化合物の濃度は、0.0033質量%～約50質量%の範囲、好ましくは0.033質量%～約40質量%、より好ましくは0.33質量%～約30質量%の範囲であればよい。

30

【0192】

多くのペルヒドロラーゼ触媒(全細胞、透過性の全細胞、及び部分精製した全細胞抽出物；それぞれがペルヒドロラーゼ活性を有する酵素を含む)は、また、1種又はそれ以上のカタラーゼ活性を有する酵素(EC 1.11.1.6)を有することが報告されている。カタラーゼは、過酸化水素の酸素と水への変換を触媒する。1つの態様では、ペルヒドロリシス触媒は、カタラーゼ活性がない。別の態様では、カタラーゼ阻害剤が、反応混合物に添加される。カタラーゼ阻害剤としては、アジ化ナトリウム、及び硫酸ヒドロキシルアミンが挙げられるが、これらに限定されないが。当業者は、必要に応じてカタラーゼ阻害剤の濃度を調節することができる。カタラーゼ阻害剤の濃度は、典型的には0.1mM～約1M；好ましくは約1mM～約50mM；より好ましくは約1mM～約20mMの範囲である。1つの態様では、アジ化ナトリウムの濃度は、典型的には約20mM～約60mMの範囲であり、硫酸ヒドロキシルアミンの濃度は、典型的には約0.5mM～約30mM、好ましくは約10mMである。

40

【0193】

別の実施態様において、ペルヒドロラーゼは有意なカタラーゼ活性がないか、又はカタラーゼ活性を減少若しくは除去する様に操作される。宿主細胞中におけるカタラーゼ活性は、よく知られた技術を用いてカタラーゼ活性に関与する遺伝子の発現を破壊することに

50

よってダウンレギュレーションしてもよいし、又は除去してもよく、このような技術としては、これらに限定されないが、トランスポゾン変異誘発、RNAアンチセンス発現、標的変異誘発、及びランダム変異誘発が挙げられる。好ましい実施態様において、内因性カタラーゼ活性をコードする遺伝子は、ダウンレギュレーションされるか、又は破壊される（即ち、ノックアウトされる）。本明細書で用いられるように、「破壊された」遺伝子は、改変された遺伝子によってコードされるタンパク質の活性及び/又は機能がもはや存在しない遺伝子である。遺伝子を破壊する手段は、当該分野で公知であり、例えば、これらに限定されないが、対応するタンパク質の活性及び/又は機能がもはや存在しなくなる限りにおいて、遺伝子に対する挿入、欠失又は突然変異が挙げられる。更なる好ましい実施態様において、生産宿主は、katG（配列番号40）、及びkatE（配列番号49）から成るグループから選択される破壊されたカタラーゼ遺伝子を含むE.コリ生産宿主である。別の実施態様において、生産宿主は、katG1及びkatEカタラーゼ遺伝子の両者のダウンレギュレーション及び/又は破壊を含むE.コリ株である。本明細書では、katG1及びkatEの二重ノックアウトを含むE.コリ株が提供される（実施例3；E.コリ株KLP18を参照）。

【0194】

構築されたカタラーゼ陰性のE.コリ株KLP18（katG1及びkatEの二重ノックアウト）（実施例3）は、発酵槽条件での増殖によって測定すると、カタラーゼ陰性株UM2（E. coli Genetic Stock Center #7156, Yale University, New Haven CT）と比較して、ラージスケール（10L以上）のペルヒドロラーゼ酵素生産のための優れた宿主であることが実証された。KLP18及びUM2は両者ともカタラーゼ陰性株であるにもかかわらず、UM2は、多数の栄養要求を示すことが知られており、従って、高濃度の酵母抽出物及びペプトンを含む培地を必要とする。たとえ発酵のための強化培地を用いても、UM2の増殖は不十分であり、限定的な最大細胞密度（OD）にしかならない。それに対してKLP18は特殊な栄養必要条件を有さず、無機培地単独、又は追加の酵母抽出物を含む培地でも高い細胞密度に増殖した。

【0195】

反応混合物水溶液中のペルヒドロラーゼ触媒の濃度は、触媒の特定の触媒活性に依存し、所望の反応速度が得られるように選択される。ペルヒドロリシス反応中の触媒の質量は、典型的には、総反応体積当たり0.0001mg~10mg/mLの範囲であり、好ましくは0.001mg~1.0mg/mLの範囲である。また、触媒は当業者によく知られた方法を用いて、可溶性又は不溶性支持体に固定化されてもよい；例えば、酵素及び細胞の固定化（Immobilization of Enzymes and Cells）；Gordon F. Bickerstaff, Editor；Humana Press, Totowa, NJ, USA；1997を参照。固定化触媒の使用により、その後の反応における触媒の回収及び再利用が可能になる。酵素触媒は微生物全細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞抽出物、部分精製又は精製酵素、及びそれらの混合物の形態であってよい。

【0196】

1つの態様において、カルボン酸エステルの化学的な加水分解と酵素的な加水分解の組み合わせによって生成した過酸の濃度は、望ましいpHでの漂白又は消毒にとって有効な濃度の過酸を提供するのに十分な濃度である。別の態様において、本発明の方法は、所望の有効な濃度の過酸を生産するための酵素と酵素基質との組み合わせを提供し、その場合、添加された酵素が存在しない場合、それよりも有意に低い濃度の過酸しか生成されない。場合によっては無機過酸化物と酵素基質との直接的な化学反応によって実質的な酵素基質の化学的なペルヒドロリシスは起こり得るが、望ましい用途において有効な濃度の過酸を提供するために十分な濃度の過酸は生成されない可能性があり、総過酸濃度の有意な増加は、反応混合物に適切なペルオキシダーゼ触媒を添加することによって達成される。

【0197】

過酸は、ある種の金属表面に対する腐食性、使用者に対して苛性又は有害である可能性があり、従って腐食作用を防止又は最小化するために、反応中に生産される過酸の総量を

10

20

30

40

50

制限することが望ましい。例えば、約1分～約5分までに僅か約100～約1000ppmの過酸の生産を必要とする用途では、しばしばこの制限をかなり上回った過酸の最終濃度を生む反応条件が用いられる。そのような場合には、生産される過酸の量を制御する、そしてある場合には、過酸が生産される速度を制御することが望ましい。

【0198】

本明細書で説明されるように、適切な反応条件を使用すれば、反応混合物水溶液は制限された量の過酸を生産することができる。これに関して重要な反応混合物の成分は、緩衝液であり、具体的には緩衝液のpKa及び濃度である。緩衝液のこれらの特性は、過酸が生産されるときに反応混合物のpHを制御することができ、その場合過酸からカルボン酸と過酸化水素への酵素触媒による加水分解によって副生成物のカルボン酸も生産される；従って、適切な特性を持つ緩衝液を選択することは、標的濃度の過酸を生産するために、pH感受性の酵素触媒の触媒活性をコントロール又は不活性化するための1つの方法である。緩衝液は、目的のpHで酵素的ペルヒドロリシス反応を実施するのに好適な、いかなる緩衝液であってもよい。いくつかの態様では、緩衝液は、ナトリウム塩、カリウム塩又はナトリウムとカリウムの複合塩の重炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、メチルホスホン酸緩衝液、ピロリン酸緩衝液及びリン酸塩緩衝液から成るグループから選択される。いくつかの態様では、緩衝液は、重炭酸緩衝液又はクエン酸緩衝液である。いくつかの態様では、特定の初期pHを有する反応混合物水溶液は緩衝液を含む。

10

【0199】

酵素駆動の反応によって生産される過酸の量を制御する1つの方法は、酵素の触媒機能を選択的に削減又は不活性化する反応条件を使用することである。従って、反応混合物の初期pHは、過酸が生産されるにつれて反応のpHが下がり、最終的に有効な又は実質的な酵素活性を抑制するpHの反応混合物にするように調節すればよい。1つの実施態様において、反応混合物の初期pHは、約5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4又は約8.5である。

20

【0200】

いくつかの態様において、反応混合物水溶液に含まれる緩衝液は、反応混合物の初期pHを規定することができる。いくつかの態様において、緩衝液は、反応混合物水溶液に約4.0～約10.0の初期pHを生みだす。いくつかの態様において、緩衝液は、反応混合物水溶液に約5.0～約9.0の初期pHを生みだす。いくつかの態様において、緩衝液は、反応混合物水溶液に約6.0～約8.5の初期pHを生みだす。いくつかの態様において、緩衝液は、反応混合物水溶液に約5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4又は約8.5の初期pHを生みだす。いくつかの態様において、緩衝液を含む反応混合物は約8.1の初期pHを有する。いくつかの態様において、約8.1の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、緩衝液を含む反応混合物は約7.2の初期pHを有する。いくつかの態様において、約7.2の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、クエン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約7.2の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約7.2の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、リン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約7.2の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約6.5の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、クエン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約6.5の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約6.5の初期pHを有する反応混合物中の緩衝液は、リン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、緩

30

40

50

衝液を含む反応混合物は約 6.0 の初期 pH を有する。いくつかの態様において、約 6.0 の初期 pH を有する反応混合物中の緩衝液は、クエン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約 6.0 の初期 pH を有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約 6.0 の初期 pH を有する反応混合物中の緩衝液は、リン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、緩衝液を含む反応混合物は約 5.5 の初期 pH を有する。いくつかの態様において、約 5.5 の初期 pH を有する反応混合物中の緩衝液は、クエン酸緩衝液である。いくつかの態様において、約 5.5 の初期 pH を有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。

【0201】

本明細書で説明されるように、反応混合物水溶液は、適切な反応条件を用いれば、制限された量の過酸を生産することができる。例えば、低濃度の緩衝液は、過酸が生産されるにつれて反応混合物を緩衝する能力が制限されてしまい、それによって反応混合物の pH が低下する、即ち、酵素活性が不活性化する。緩衝液の濃度は、過酸の生産に伴う反応混合物の pH を制御することができる；従って、適切な濃度の緩衝液を選択することは、標的濃度の過酸を生産するために、pH 感受性の酵素触媒の触媒活性を制御又は不活性化するための 1 つの方法である。従って、いくつかの態様において、反応混合物水溶液は、特定の濃度を有する緩衝液を含む。緩衝液は、酵素的ペルヒドロリシス反応を実施するのに好適な、いかなる緩衝液であってもよい。いくつかの態様では、緩衝液は、これらに限定されないが、ナトリウム塩、カリウム塩又はナトリウムとカリウムの複合塩の重炭酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、酢酸塩緩衝液、リン酸塩緩衝液、ピロリン酸塩緩衝液及びメチルホスホン酸塩緩衝液から成るグループから選択される。いくつかの態様では、緩衝液は、重炭酸ナトリウム塩緩衝液又はクエン酸ナトリウム緩衝液である。いくつかの態様では、緩衝液は、約 0.01 mM ~ 約 200 mM の濃度を有する。いくつかの態様では、緩衝液は、約 0.01 mM ~ 約 100 mM の濃度を有する。いくつかの態様では、緩衝液は、約 0.01 mM ~ 約 50 mM の濃度を有する。いくつかの態様では、緩衝液は、約 100 、 95 、 90 、 85 、 80 、 75 、 70 、 65 、 60 、 55 、 50 、 45 、 40 、 35 、 30 、 25 、 20 、 15 、 10 、 5 、 2.5 、 1 、 0.5 又は約 0.1 mM の濃度を有する。いくつかの態様では、緩衝液は、約 50 mM の濃度を有する。いくつかの態様において、約 50 mM の初期濃度を有する反応混合物中の緩衝液は、クエン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約 50 mM の初期濃度を有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。いくつかの態様では、緩衝液は、約 25 mM ~ 約 1 mM の濃度を有する。いくつかの態様において、約 25 mM ~ 約 1 mM の初期濃度を有する反応混合物中の緩衝液は、クエン酸塩緩衝液である。いくつかの態様において、約 25 mM ~ 約 1 mM の初期濃度を有する反応混合物中の緩衝液は、重炭酸塩緩衝液である。

【0202】

酵素駆動の反応によって生産される過酸の量は、また、反応混合物の初期 pH 、及び一旦目的の濃度の過酸が生産されると、反応の酵素活性が削減されるか又は不活性化されるような、反応混合物の pH 低下を起こす pK_a の緩衝液を選択することによって制御することができる。1 つの態様において、反応混合物の初期 pH は、約 5.0 、 5.1 、 5.2 、 5.3 、 5.4 、 5.5 、 5.6 、 5.7 、 5.8 、 5.9 、 6.0 、 6.1 、 6.2 、 6.3 、 6.4 、 6.5 、 6.6 、 6.7 、 6.8 、 6.9 、 7.0 、 7.1 、 7.2 、 7.3 、 7.4 、 7.5 、 7.6 、 7.7 、 7.8 、 7.9 、 8.0 、 8.1 、 8.2 、 8.3 、 8.4 又は約 8.5 であり、緩衝液の pK_a は約 5.0 、 5.1 、 5.2 、 5.3 、 5.4 、 5.5 、 5.6 、 5.7 、 5.8 、 5.9 、 6.0 、 6.1 、 6.2 、 6.3 、 6.4 、 6.5 、 6.6 、 6.7 、 6.8 、 6.9 、 7.0 、 7.1 、 7.2 、 7.3 、 7.4 、 7.5 、 7.6 、 7.7 、 7.8 、 7.9 、 8.0 又は約 8.1 である。

【0203】

別の実施態様において、pH が低下すると酵素活性が著しく減少する酸性 pH 感受性の酵素触媒は、過酸の生産が触媒活性を著しく低減する又は不活性化する点まで反応混合物

10

20

30

40

50

の pH を低下させ得るので、酵素で触媒される反応を制御するために使用することができる。酵素活性が過酸からカルボン酸及び過酸化水素への加水分解を触媒する反応では、カルボン酸の生産が同様に触媒活性を著しく低減する又は不活性化する点まで反応混合物の pH を低下させる可能性がある。例えば、1つの実施態様では、B.ズブチリス A T C C (登録商標) 31954 (商標) の総タンパク質抽出物を触媒として使用することができた。別の実施態様において、ペルヒドロリシス活性を有する B.ズブチリス A T C C (登録商標) 31954 (商標) 由来の特定の酵素を触媒として使用することができた。1つの実施態様において、B.ブミルスの総タンパク質抽出物を触媒として使用することができた。別の実施態様において、ペルヒドロリシス活性を有する B.ブミルス 由来の特定の酵素を触媒として使用することができた。1つの実施態様において、T.ネアポリタナの総タンパク質抽出物を触媒として使用することができた。別の実施態様において、ペルヒドロリシス活性を有する T.ネアポリタナ 由来の特定のタンパク質を触媒として使用することができた。1つの実施態様において、T.マリチマの総タンパク質抽出物を触媒として使用することができた。別の実施態様において、ペルヒドロリシス活性を有する T.マリチマ 由来の特定のタンパク質を触媒として使用することができた。

【0204】

反応混合物水溶液における過酸の生産は、過酸の生成を触媒する酵素の酵素活性を変化させることができる。例えば、過酸の生産は、反応混合物の pH を下げることができ、そしてそれは、酵素触媒の活性を低減させる又は不活性化することができる。また、酵素活性が過酸からカルボン酸及び過酸化水素への加水分解を触媒することができる反応では、カルボン酸の生産が同様に触媒活性を著しく低減する又は不活性化する点まで反応混合物の pH を低下させる可能性がある。従って、いくつかの態様では、過酸又は過酸及びカルボン酸の生産が酵素触媒の活性を約 25% ~ 約 100% 低減する。いくつかの態様では、過酸又は過酸及びカルボン酸の生産が酵素触媒の活性を約 40% ~ 約 90% 低減する。いくつかの態様では、過酸又は過酸及びカルボン酸の生産が酵素触媒の活性を約 60% ~ 約 80% 低減する。いくつかの態様では、過酸又は過酸及びカルボン酸の生産が酵素触媒の活性を約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 又は約 100% 低減する。いくつかの態様では、過酸又は過酸及びカルボン酸の生産は、反応混合物の pH を、酵素触媒の活性が少なくとも約 75% 低減されるほど低下する。いくつかの態様では、過酸又は過酸及びカルボン酸の生産は、反応混合物の pH を、酵素触媒の活性が少なくとも約 85% 低減されるほど低下させる。過酸を含む最終反応混合物の pH は、約 2 ~ 約 9 である。いくつかの態様では、過酸を含む最終反応混合物の pH は、約 3 ~ 約 8、より好ましくは約 4 ~ 約 7 である。いくつかの態様では、過酸を含む最終反応混合物の pH は、約 5 ~ 約 6 である。いくつかの態様では、過酸を含む最終反応混合物の pH は、約 5 ~ 約 5.5 である。いくつかの態様では、過酸を含む最終反応混合物の pH は、約 4.5 ~ 約 5 である。

【0205】

少なくとも 1 つのカルボン酸エステルのペルヒドロリシスによって生成される過酸 (例えば、過酢酸) の濃度は、ペルヒドロリシス反応開始から 10 分以内に、好ましくは 5 分以内に、そして最も好ましくは 1 分以内に、少なくとも約 2 ppm、好ましくは少なくとも約 20 ppm、より好ましくは少なくとも約 100 ppm、より好ましくは少なくとも約 200 ppm、より好ましくは少なくとも約 300 ppm、より好ましくは少なくとも約 500 ppm、より好ましくは少なくとも約 800 ppm、より好ましくは少なくとも約 1000 ppm である。いくつかの態様では、少なくとも 1 つのカルボン酸エステルのペルヒドロリシスによって生成される過酸 (例えば、過酢酸) の濃度は、ペルヒドロリシス反応開始から 10 分以内に、好ましくは 5 分以内に、そして最も好ましくは 1 分以内に、約 100 ppm ~ 約 1200 ppm であるが、約 2500 ppm 未満である。より好ましくは、少なくとも 1 つのカルボン酸エステルのペルヒドロリシスによって生成される過酸の濃度は、ペルヒドロリシス反応開始から 10 分以内に、好ましくは 5 分以内に、そして最も好ましくは 1 分以内に、約 400 ppm ~ 約 600 ppm である。過酸を含む生成

10

20

30

40

50

物の混合物は、目的の低濃度の過酸の混合物を作るために、水又は圧倒的に水を含む溶液で任意に希釈してもよい。1つの態様では、目的の濃度の過酸を生産するために必要な反応時間は、約2時間以下、好ましくは約30分以下、より好ましくは約10分以下、なおより好ましくは約5分以下、そして最も好ましくは約1分以下である。別の態様では、微生物個体群の濃度に汚染された硬表面又は無生物は、本明細書で説明される方法に従って形成される過酸と、前記反応成分を混ぜ合わせてから約1分～約168時間の範囲で、又は約1分～約48時間の範囲で、又は約1分～2時間の範囲で、又は任意のそれらの時間の中で接触する。

【0206】

硬表面の消毒のために過酢酸をその場生成させる用途では、硬表面を消毒するのに十分な量の過酸を、有効濃度の上域を大幅に超えることなく迅速に生成させることが望ましく、それによってその表面の腐食を制限又は防止する。過酸は、このように、適切な緩衝液、pH及び酵素濃度を有する酵素触媒反応を用いて、並びにpHの低下によって、有意に活性が低下する又は不活性化する酵素を用いて製造することができる。従って、1つの態様では、酵素触媒の反応混合物には、約500ppm～約600ppmの過酸の生産の後に、目的の量の過酸が生産された時点で反応混合物のpHが酸性であるため、活性を失う触媒酵素が組み込まれる。この種類の反応混合物は、別の実施態様においては、特定の用途に基づく必要に応じて、約100ppm～約200ppmの過酸、約200ppm～約300ppmの過酸、約300ppm～約400ppmの過酸、約400ppm～約500ppmの過酸、約600ppm～約700ppmの過酸、約700ppm～約800ppmの過酸、約800ppm～約900ppmの過酸、約900ppm～約1000ppmの過酸、又は約1000ppm～約500ppmの過酸、約500ppm～約1000ppmの過酸、又は約1000ppm～約2000ppmの過酸の生産の後に触媒酵素が活性を失うように変更することができる。

【0207】

いくつかの態様では、短時間に過酸を生産することも、また、重要である；しかし、また、これらの用途の多くは、単に一定量の過酸の生産だけを必要としている。例えば、過酸に基づいた消毒溶液を生じさせる混合物のためには、生産の最初の1分の後は実質的な量の過酸は生産されないような、約1分で約100ppm～約1200ppmの過酸だけを生産するのが望ましい。従って、本明細書で提供されるものは、約100ppm～約1200ppmの濃度の過酸が約1分で生産され、その後過酸の有意な生産がない、過酸を生成する酵素触媒反応である。

【0208】

もちろん、当然のことながら、当業者は、pH、pKa、緩衝液の濃度、及び触媒活性/pH感受性に関連する他の反応条件が、本明細書で説明される方法による過酸生産を制限する手段を提供することは認識している。そのような条件及びその使用は、本開示の範囲内である。

【0209】

酵素触媒による過酸の生産が低減又は不活性化された後、比較的安定した過酸の濃度、即ち、目標過酸濃度の約20%以内に保持する過酸の水溶液、並びにそのような安定した過酸水溶液の生成法を説明する。1つの実施態様において、標的濃度の過酸濃度を含む反応生産物水溶液の安定性は、密閉系（例えば、生成したペルオキシカルボン酸と実質的に反応（又はそれを分解）しない材質でできた反応チャンバー）で、室温（おおよそ、21～22）で測定される。いくつかの好ましい実施態様では、過酸水溶液は、酵素触媒による過酸の生産が低減又は不活性化された後、過酸濃度を目標過酸濃度の約15%以内に、そしてより好ましくは10%以内に保持する。過酸濃度の安定性は、酵素触媒による過酸の生産が低減又は不活性化された後、数時間持続できる。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約3時間安定である。別の実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約6時間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約9時

10

20

30

40

50

間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約12時間安定である。別の実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約15時間安定である。別の実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約18時間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約21時間安定である。別の実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約24時間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約30時間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約36時間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約42時間安定である。別の実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約48時間安定である。1つの実施態様において、過酸濃度は、酵素触媒による過酸の生産が終了した後、約48時間超安定である。

【0210】

反応温度は、酵素触媒活性の反応速度及び安定性の両者が制御されるように選択される。反応温度は、反応混合物の凝固点（約0℃）のすぐ上の温度から、約75℃までの範囲であればよく、好ましい反応温度の範囲は、約5℃～約55℃である。

【0211】

別の態様では、酵素的なペルヒドロリシス反応混合物は、反応混合物におけるカルボン酸エステルの溶解速度を高めるための分散剤として作用する有機溶剤を含んでもよい。そのような溶媒としては、これらに限定されないが、プロピレングリコールメチルエーテル、アセトン、シクロヘキサン、ジエチレングリコールブチルエーテル、トリプロピレングリコールメチルエーテル、ジエチレングリコールメチルエーテル、プロピレングリコールブチルエーテル、ジプロピレングリコールメチルエーテル、シクロヘキサンノール、ベンジルアルコール、イソプロパノール、エタノール、プロピレングリコール及びそれらの混合物が挙げられる。

【0212】

別の態様では、酵素的なペルヒドロリシス生成物は、望ましい機能を提供する更なる成分を含んでもよい。これらの更なる成分としては、これらに限定されないが、緩衝剤、洗剤ビルダー、増粘剤、乳化剤、界面活性剤、湿潤剤、腐食抑制剤（例えば、ベンゾトリアゾール）、酵素安定化剤及び過酸化物安定化剤（例えば、金属イオンキレート剤）が挙げられる。更なる成分の多くは、洗剤産業においてよく知られている（例えば、米国特許第5,932,532号を参照；この特許は、参照することによって本明細書に組み込まれている）。乳化剤の例としては、これらに限定されないが、ポリビニルアルコール、又はポリビニルピロリドンが挙げられる。増粘剤の例としては、これらに限定されないが、ラポナイト（LAPONITE（登録商標））RD、コーンスターーチ、PVP、カーボワックス（CARBOWAX（登録商標））、カーボポール（CARBOPOL（登録商標））、カボシル（CABOSIL（登録商標））、ポリソルベート20、PVA及びレシチンが挙げられる。緩衝系の例としては、これらに限定されないが、一塩基性リン酸ナトリウム／二塩基性リン酸ナトリウム；スルファミン／トリエタノールアミン；クエン酸／トリエタノールアミン；酒石酸／トリエタノールアミン；コハク酸／トリエタノールアミン；及び酢酸／トリエタノールアミンが挙げられる。界面活性剤の例としては、これらに限定されないが、a) 非イオン界面活性剤、例えば、エチレンオキシド又はプロピレンオキシドのブロックコポリマー、エトキシ化又はプロポキシ化された直鎖状及び分枝鎖状の第一級及び第二級アルコール、及び脂肪族ホスフィン酸化物、b) カチオン性界面活性剤、例えば、第四級アンモニウム化合物、具体的には、3個のC1～C2アルキル基と結合した窒素原子に更にC8～C20アルキル基が結合した第四級アンモニウム化合物、c) アニオン性界面活性剤、例えば、アルカンカルボン酸（例えば、C8～C20脂肪酸）、アルキルホスファート、アルカンスルホナート（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム「SDS」）、又は直鎖状及び分枝鎖状のアルキルベンゼンスルホナート、アルケンスルホナ

10

20

30

40

50

ート、及び d) 両性及び双極性界面活性剤、例えば、アミノカルボン酸、アルキベタイン、及びそれらの混合物が挙げられる。更なる成分として、芳香剤、色素、過酸化水素の安定化剤（例えば、1 - ヒドロキシエチリデン - 1,1 - ジホスホン酸（D E Q U E S T（登録商標）2010, Solutia Inc., St. Louis, MOのような金属キレート剤及びエチレンジアミン四酢酸（E D T A））、T U R P I N A L（登録商標）S L、D E Q U E S T（登録商標）0520、D E Q U E S T（登録商標）0531、酵素活性の安定剤（例えば、ポリエチレングリコール（P E G））、及び洗剤ビルダーを含んでいてもよい。

【 0 2 1 3 】

別の態様では、酵素的なペルヒドロリシス生成物は、消毒する表面又は無生物との接触の前に目的の濃度のペルオキシカルボン酸を発生させるために、前もって混合してもよい。
10

【 0 2 1 4 】

別の態様では、酵素的なペルヒドロリシス生成物は、消毒する表面又は無生物との接触の前に目的の濃度のペルオキシカルボン酸を発生させるために、前もって混合しないが、その代わり、反応混合物の目的の濃度のペルオキシカルボン酸を発生させる成分を消毒する表面又は無生物と接触させ、目的の濃度のペルオキシカルボン酸を発生させる。いくつかの実施態様において、反応混合物の成分はその場所で結合又は混合する。いくつかの実施態様において、反応成分は、その場所に送達又は適用し、次いで混合又は結合して目的の濃度のペルオキシカルボン酸を発生させる。

【 0 2 1 5 】

ペルヒドロラーゼ触媒を用いた過酸のその場生産

セファロスボリン C デアセチラーゼ（E . C . 3 . 1 . 1 . 4 1；系統的名称は、セファロスボリン C アセチルヒドロラーゼ；C A H）は、セファロスボリン C、7 - アミノセファロスボラン酸、及び7 - (チオフェン - 2 - アセトアミド)セファロスボラン酸のような、セファロスボリンに結合したアセチルエステルを加水分解する能力を有する酵素である（Abbott, B. and Fukuda, D., Appl. Microbiol. 30(3):413-419 (1975)）。C A Hは、炭水化物エステラーゼファミリー 7 と称される構造的に関連する酵素のより大きなファミリーに属する（C E - 7；Coutinho, P.M., Henrissat, B. 炭水化物生物工学における最近の進歩「炭水化物 - 活性酵素：統合データベース入門」（“Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach” in Recent Advances in Carbohydrate Biotechnology），H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., (1999) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12を参照）。

【 0 2 1 6 】

C E - 7 ファミリーは、C A H 及びアセチルキシランエステラーゼ（A X E；E . C . 3 . 1 . 1 . 7 2）の両者を含む。C E - 7 ファミリーのメンバーは、共通の構造的なモチーフを共有しており、これらは典型的にはアセチル化キシロオリゴ糖及びセファロスボリン C の両者にエステル加水分解活性を示すという点で極めて珍しく、これは、C E - 7 ファミリーが、一連の小さな基質に対して多機能のデアセチラーゼ活性を有する単一のタンパク質クラスを示すことを示唆している（Vincent et al., J. Mol. Biol., 330:593-606 (2003)）。Vincentらは、このファミリーのメンバーの間の構造的な類似性を説明しており、C E - 7 ファミリーに特徴的なシグネチャー配列モチーフを定義している。
40

【 0 2 1 7 】

C E - 7 ファミリーに属する酵素は、植物、糸状菌（例えば、セファロスボリジウム・アクレモニウム（Cephalosporidium acremonium））、酵母（例えば、ロドスボリジウム・トルロイデス（Rhodosporidium toruloides）、ロドトルラ・グルチニス（Rhodotorula glutinis））、及び細菌、例えば、サーモアナエロバクテリウム属（Thermoanaerobacterium sp.）；ノカルディア・ラクタムデュランス（Norcardia lactamurans）、及びバチルス属に属する様々な菌に見られる（Politino et al., Appl. Environ. Microbiol., 63 (12):4807-4811 (1997); Sakai et al., J. Ferment. Bioeng. 85:53-57 (1998); Lorenz, W. and Wiegel, J., J. Bacteriol. 179:5436-5441 (1997); Cardoza et al., Appl. Mi

10

20

30

40

50

crobiol. Biotechnol., 54(3):406-412 (2000); Mitsushima et al., *supra* (1995), Abbott, B. and Fukuda, D., Appl. Microbiol. 30(3):413-419 (1975); Vincent et al., *supra*, Takami et al., NAR, 28(21):4317-4331 (2000); Rey et al., Genome Biol., 5(10): article 77 (2004); Degrassi et al., Microbiology., 146:1585-1591 (2000); 米国特許第6,645,233号; 米国特許第5,281,525号; 米国特許第5,338,676号; 及び国際公開公報第99/03984号)。配列番号2に有意な相同意を有するCE-7炭水化物エステラーゼファミリーの非包括的なリストを表1に示す。

【0218】

【表2】

表1：配列番号2に有意な相同意を有するCE-7酵素の例

起源生物体 (CE-7酵素の GENBANK(登録 商標)受託番号)	ヌクレオチド 配列 (配列番号)	アミノ酸 配列 (配列番号)	配列番号2に 対するアミノ 酸の同一性 (%)	文献
B. ズブチリス ATCC(登録商標) 31954(商標)	1	2	100	<u>B. subtilis</u> SHS 0133 Mitsushima et al. <i>supra</i> (1995)
B. ズブチリス亜種 ズブチリス株168 (NP_388200)	3	4	98	Kunst et al., <i>supra</i> . W099/03984
B. ズブチリス BE1010				Payne and Jackson, J. Bacteriol. 173:2278-2282 (1991))
B. ズブチリス ATCC(登録商標) 6633(商標) (YP_077621.1)	5	6	96	U.S. 6,465,233
B. ズブチリス ATCC(登録商標) 29233(商標)	29	30	96	Abbott and Fukuda, <i>supra</i>
B. リケニフォルミス ATCC(登録商標) 14580(商標) (YP_077621.1)	7	8	77	Rey et al., <i>supra</i>
B. プミルスPS21 (CAB76451.2)	9	10	76	Degrassi et al., <i>supra</i>
クロストリジウム・ テルモセルム ATCC(登録商標) 27405(商標) (ZP_00504991)	11	12	57	Copeland et al. US Dept. of Energy Joint Genome Institute (JGI-PGF) Direct Submission GEN BANK® ZP_00504991
サーモトガ・ ネアポリタナ (AAB70869.1)	13	14	42	See GENBA NK® AAB70869.1

10

20

30

40

50

【0219】

【表3】

表1 (続き)

サーモトガ・マリチマ MSB8 (NP_227893.1)	15	16	42	Nelson <i>et al.</i> , <u>Nature</u> 399 (6734):323-329 (1999)
バチルス属 N R R L B-14911 (ZP_01168674)	19	20	40	Siefert <i>et al.</i> J. Craig Venter Institute. Direct Submission Under GENBANK® ZP_01168674
サーモアナエロ バクテリウム属 (AAB68821.1)	17	18	37	Lorenz and Wiegel, <u>supra</u>
バチルス・ハロデュラ ンスC-125 (NP_244192)	21	22	36	Takami <i>et al.</i> , <u>supra</u>
サーモアナエロ バクテリウム・サッカ ロリチカム (S41858)	—	54	35	Lee, Y. E. and Zeikus, J. G., <u>J.</u> <u>Gen Microbiol.</u> (1993), 139 Pt 6:1235-1243
バチルス・クラウシイ KSM-K16 (YP_175265)	23	24	33	Kobayashi <i>et</i> <u>al.</u> , <u>Appl.</u> <u>Microbiol.</u> <u>Biotechnol.</u> 43 (3), 473-481 (1995)
サーモトガ・ レティンガエ (CP000812)	55	57	37	Copeland <i>et al.</i> US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GE NBANK® CP000812
サーモトガ・ ペトロフィラ (CP000702)	57	58	41	Copeland <i>et al.</i> US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GE NBANK® CP000702

【0220】

【表4】

表1 (続き)

サーモトガ属 RQ2 RQ2 (a) (CP000969)	59	60	42	Copeland <u>et al.</u> US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GE NBANK® CP000969
サーモトガ属 RQ2 RQ2 (b) (CP000969)	61	63	42	Copeland <u>et al.</u> US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GE NBANK® CP000969

【0221】

本発明のペルヒドロラーゼは、全てCE-7炭水化物エステラーゼファミリーに属するものである。Vincentら(上記)によって説明されているように、上記ファミリーに属するものは、このファミリーに特徴的な共通のシグネチャー-モチーフを共有する。本発明のペルヒドロラーゼのCLUSTALWアラインメントから、これらのものはいずれもCE-7炭水化物エステラーゼファミリーに属することが示される。本発明のペルヒドロラーゼの総体的なパーセントアミノ酸同一性の量の比較を表2に示す。

【0222】

【表5】

表2：ペルヒドロラーゼ間のパーセントアミノ酸同一性¹

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100														
2	99	100													
3	99	99	100												
4	96	96	97	100											
5	77	76	77	76	100										
6	76	76	76	76	68	100									
7	57	57	57	56	56	56	100								
8	42	43	43	43	43	42	41	100							
9	42	43	42	43	43	42	42	72	100						
10	42	43	43	43	44	42	43	71	91	100					
11	41	43	43	43	45	42	43	71	97	91	100				
12	41	42	42	42	43	41	42	71	98	91	97	100			
13	37	37	37	36	39	38	38	64	65	67	66	65	100		
14	34	36	35	36	35	36	33	36	32	34	34	33	36	100	
15	33	34	33	33	32	34	32	30	30	32	31	31	32	34	100

¹=BLOSUM62を用い、Blast2seqアルゴリズムを使用して、gap open=11, gap extension=1, x_drop=0, expect=10、及びword size=3で測定したパーセント同一性。Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), 「Blast 2 sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences」, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250。

1. B. ズブチリスATCC (登録商標) 31954 (商標)
2. B. ズブチリスBE1010
3. B. ズブチリスATCC (登録商標) 29233 (商標)
4. B. ズブチリスATCC (登録商標) 6633 (商標)
5. B. リケニフォルミスATCC (登録商標) 14580 (商標)
6. B. プミルスPS213
7. C. テルモセルムATCC (登録商標) 27405 (商標)
8. サーモトガ属RQ2 (b)
9. サーモトガ属RQ2 (a)
10. T. ネアポリタナ
11. T. マリチャ
12. T. ペトロフィラ
13. T. レティンガエ
14. T. サッカロリチカム
15. B. クラウシイ

【0223】

相対的なパーセントアミノ酸同一性に関して変動が観察される（即ち、クロストリジウム・テルモセルムATCC (登録商標) 27405 (商標) のペルヒドロラーゼ；配列番号12は、バチルス・ズブチリスATCC (登録商標) 31954 (商標) のペルヒドロラーゼ；配列番号2と57%のアミノ酸同一性しか共有せず、一方、バチルス・クラウシイのペルヒドロラーゼ；配列番号24は、配列番号2と33%のアミノ酸同一性しか共有しない）が、本発明のペルヒドロラーゼ酵素は、それぞれ、CE-7シグネチャー-モチーフを共有する。従って、本発明のペルヒドロラーゼ触媒は、構造的にCE-7炭水化物エステラーゼファミリーに属するものとして分類される酵素である。本発明のペルヒドロラーゼ酵素は、それぞれ、CE-7シグネチャー（診断）モチーフを含む。

【0224】

Vincentら（上記）は、CE-7エステラーゼの構造を解析し、そのファミリーの診断

10

20

30

40

50

要素である数種の高度に保存されたモチーフを同定した。これらの高度に保存されたモチーフは、Arg 118 - Gly 119 - Glu 120 (RGQ)、Gly 179 - Xaa 180 - Ser 181 - Glu 182 - Gly 183 (GXSG) 及び His 298 - Glu 299 (HE) を含む。更に、シグネチャーモチーフを更に特徴付けるために使用可能な、高度に保存された Leu 267 - Xaa 268 - Asp 269 (LXD) モチーフがある。全ての配列の番号付けは、参照配列 (B.ズブチリスATCC (登録商標) 31954 (商標) のペルヒドロラーゼ；配列番号2) の番号付けに関連する。

【0225】

1つの実施態様において、好適なペルヒドロリシス酵素は、CE-7シグネチャーモチーフの存在によって同定することができる (Vincent et al.、上記)。好ましい実施態様において、CE-7シグネチャーモチーフを含むペルヒドロリシス酵素は、バチルス・ズブチリスATCC (登録商標) 31954 (商標) のペルヒドロラーゼ (配列番号2；即ち、相対的なアミノ酸位置の番号付けに用いられる参照配列) に対して CLUSTALW アライメントを用いて同定される。配列番号2のアミノ酸残基の番号付けのように、CE-7シグネチャーモチーフは、以下のように定義される3種の保存されたモチーフを含む。

【化7】

a) Arg 118 - Gly 119 - Glu 120；

b) Gly 179 - Xaa 180 - **Ser 181** - Glu 182 - Gly 183；

及び

c) His 298 - Glu 299

【0226】

典型的には、アミノ酸残基180位におけるXaaは、グリシン、アラニン、プロリン、トリプトファン又はスレオニンである。それぞれ触媒性三つ組に属している3つのアミノ酸残基のうちの2つは、太字で示す。1つの実施態様において、アミノ酸残基180位におけるXaaは、グリシン、アラニン、プロリン、トリプトファン及びスレオニンから成るグループから選択される。

【0227】

CE-7炭水化物エステラーゼファミリー内の保存されたモチーフの更なる解析から、更にCE-7炭水化物エステラーゼファミリーに属するペルヒドロラーゼを特徴付ける可能性のある更なる保存されたモチーフ (配列番号2のアミノ酸267～269位におけるLXD) の存在が示される。更なる実施態様において、上記で特徴付けされたシグネチャーモチーフは、以下のように定義される第4の保存されたモチーフを含む。

【化8】

Leu 267 - Xaa 268 - Asp 269

【0228】

アミノ酸残基268位におけるXaaは、典型的には、イソロイシン、バリン又はメチオニンである。第4のモチーフは、触媒性の三つ組に属する3番目のアスパラギン酸残基 (太字) を含む (Ser 181 - Asp 269 - His 298)。

【0229】

本発明のシグネチャーモチーフの存在を測定するために、複数のアミノ酸配列 (ペルヒドロラーゼ活性を有する酵素を示す) をアラインさせるための、かなり多数のよく知られたグローバルアライメントのアルゴリズム (即ち、配列解析ソフトウェア) を使用することができる (例えば、CLUSTALW又はNeedleman and Wunsch (J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970))。アラインした配列は、参照配列 (配列番号2) と比較される。1

10

20

30

40

50

つの実施態様において、参照アミノ酸配列（本明細書で用いられるように、バチルス・ズブチリス A T C C（登録商標）31954（商標）由来の C A H 配列（配列番号 2））を用いた C L U S T A L アラインメント（C L U S T A L W）を用いて、C E - 7 エステラーゼファミリーに属するペルヒドロラーゼを同定することができる。保存されたアミノ酸残基の総体的な番号付けは、並べられた配列内のわずかな挿入又は欠失（5 アミノ酸以下）を明らかにするために、参照アミノ酸配列における残基の番号付けに基づく。

【0230】

本発明において例示されたペルヒドロラーゼ間の全体のパーセント相同性の比較から、配列番号 2 に対してわずか 33 % の同一性しか有さない酵素が（シグネチャーモチーフを保持しているものの）、有意なペルヒドロラーゼ活性を示し、構造的に C E - 7 炭水化物エステラーゼとして分類される。1つの実施態様において、本発明のペルヒドロラーゼとしては、本発明のシグネチャーモチーフを含む酵素であって、配列番号 2 に対して、少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 33 %、より好ましくは少なくとも 40 %、なおより好ましくは少なくとも 42 %、なおより好ましくは少なくとも 50 %、なおより好ましくは少なくとも 60 %、なおより好ましくは少なくとも 70 %、なおより好ましくは少なくとも 80 %、なおより好ましくは少なくとも 90 %、及び最も好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % のアミノ酸同一性を有する酵素が挙げられる。

10

【0231】

全ての本発明のペルヒドロラーゼは、表 3 に示したような上記のシグネチャーモチーフで構成される。

20

【0232】

【表6】

表3. 本発明のペルヒドロラーゼ活性を有する酵素に見られる保存されたモチーフ

ペルヒドロラーゼ配列	R G Q モチーフ ^a (残基番号)	G X S Q G モチーフ ^a (残基番号)	L X D モチーフ ^b (残基番号)	H E モチーフ ^b (残基番号)
配列番号2	1 1 8 - 1 2 0	1 7 9 - 1 8 3	2 6 7 - 2 6 9	2 9 8 - 2 9 9
配列番号4	1 1 8 - 1 2 0	1 7 9 - 1 8 3	2 6 7 - 2 6 9	2 9 8 - 2 9 9
配列番号6	1 1 8 - 1 2 0	1 7 9 - 1 8 3	2 6 7 - 2 6 9	2 9 8 - 2 9 9
配列番号8	1 1 9 - 1 2 1	1 8 0 - 1 8 4	2 6 8 - 2 7 0	2 9 9 - 3 0 0
配列番号10	1 1 8 - 1 2 0	1 7 9 - 1 8 3	2 6 7 - 2 6 9	2 9 8 - 2 9 9
配列番号12	1 1 9 - 1 2 1	1 8 1 - 1 8 5	2 6 9 - 2 7 1	3 0 0 - 3 0 1
配列番号14	1 1 8 - 1 2 0	1 8 6 - 1 9 0	2 7 2 - 2 7 4	3 0 3 - 3 0 4
配列番号16	1 1 8 - 1 2 0	1 8 6 - 1 9 0	2 7 2 - 2 7 4	3 0 3 - 3 0 4
配列番号18	1 1 7 - 1 1 9	1 8 0 - 1 8 4	2 7 0 - 2 7 2	3 0 1 - 3 0 2
配列番号20	1 3 3 - 1 3 5	1 9 3 - 1 9 7	2 8 2 - 2 8 4	3 1 3 - 3 1 4
配列番号22	1 1 8 - 1 2 0	1 8 1 - 1 8 5	1 7 1 - 1 7 3	3 0 2 - 3 0 3
配列番号24	1 1 7 - 1 1 9	1 8 0 - 1 8 4	2 7 0 - 2 7 2	3 0 1 - 3 0 2
配列番号30	1 1 8 - 1 2 0	1 7 9 - 1 8 3	2 6 7 - 2 6 9	2 9 8 - 2 9 9
配列番号54	1 1 7 - 1 1 9	1 8 0 - 1 8 4	2 7 0 - 2 7 2	3 0 1 - 3 0 2
配列番号56	1 1 8 - 1 2 0	1 8 6 - 1 9 0	2 7 2 - 2 7 4	3 0 3 - 3 0 4
配列番号58	1 1 8 - 1 2 0	1 8 6 - 1 9 0	2 7 2 - 2 7 4	3 0 3 - 3 0 4
配列番号60	1 1 8 - 1 2 0	1 8 6 - 1 9 0	2 7 2 - 2 7 4	3 0 3 - 3 0 4
配列番号62	1 1 9 - 1 2 1	1 8 7 - 1 9 1	2 7 3 - 2 7 5	3 0 4 - 3 0 5

^a=シグネチャーモチーフを定義するために用いた、Vincent ら（上記）によって定義された、保存されたモチーフ。

^b=Vincent ら（上記）によって定義されたシグネチャーモチーフを更に定義するのに有用な、本明細書で同定された更なるモチーフ。

【0233】

或いは、4種の保存されたモチーフ（R G Q、G X S Q G、L X D、及びH E；配列番号2のアミノ酸残基118～299）を含む連続したシグネチャーモチーフ（配列番号53）も、C E - 7炭水化物エステラーゼを同定するための連続したシグネチャーモチーフとして使用できる。そのようなものとして、好適な酵素はペルヒドロラーゼ活性を有することが予想され、更に、配列番号53に対して、少なくとも30%、好ましくは少なくとも33%、より好ましくは少なくとも40%、なより好ましくは少なくとも42%、なより好ましくは少なくとも50%、なより好ましくは少なくとも60%、なより好ましくは少なくとも70%、なより好ましくは少なくとも80%、なより好ましくは少なくとも90%、及び最も好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有すると同定されたものでもよい（C E - 7炭水化物エステラーゼに見出される4種の保存されたモチーフは、下線で表示される）。

10

20

30

40

【化9】

RGQQSSEDT S I S LHGHALGWMTKG I LDKDTYYYRGVYL
DAVRALEVISSFDEVDETRIGVTGGSQGGGLTIAAAAL
SDIPKAAVADYPYLSNFERAIDVALEQPYLEINSFFRR
NGS PETEVQAMKTLSYFDIMNLADRVKVPVLMSIGLID
KVTPPSTVFAAYNHLETEKELKVYRYFGHE (配列番号53)

10

【0234】

表4に、連続したシグネチャー配列を用いた、本発明のペルヒドロラーゼ活性を有するCE-7エステラーゼとの対比を示す。

【0235】

【表7】

表4：ペルヒドロラーゼ活性を有する各種のCE-7エステラーゼの連続したシグネチャー配列(配列番号53)に対するパーセントアミノ酸同一性

ペルヒドロラーゼ 配列	BLASTPを用いた パーセント同一性	E-スコア (推定)	
配列番号2	100	3e-92	20
配列番号4	98	6e-91	
配列番号6	98	4e-98	
配列番号8	78	1e-78	
配列番号10	80	3e-76	
配列番号12	63	2e-56	
配列番号14	51	1e-41	
配列番号16	50	6e-35	
配列番号24	36	7e-21	30
配列番号30	99	2e-90	
配列番号54	40	2e-26	
配列番号56	40	3e-30	
配列番号58	46	6e-35	
配列番号61	46	6e-35	
配列番号62	48	9e-36	

【0236】

或いは、1種又はそれ以上の本発明のペルヒドロラーゼの完全長に対するパーセントアミノ酸同一性も使用可能である。従って、好適なペルヒドロラーゼ活性を有する酵素は、配列番号2に対して、少なくとも30%、好ましくは少なくとも33%、より好ましくは少なくとも40%、なにより好ましくは少なくとも42%、なにより好ましくは少なくとも50%、なにより好ましくは少なくとも60%、なにより好ましくは少なくとも70%、なにより好ましくは少なくとも80%、なにより好ましくは少なくとも90%、及び最も好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有する。更なる実施態様において、好適なペルヒドロラーゼ触媒は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号30、配列番号54、配列番号56、配列番号58、
50

配列番号 6 0 、配列番号 6 2 から成るグループから選択されるアミノ酸配列を含む。好ましい実施態様において、ペルヒドロラーゼ活性を有し、配列番号 2 、又は配列番号 1 0 、又は配列番号 1 4 、又は配列番号 1 6 に対して、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、少なくとも 9 2 % 、少なくとも 9 3 % 、少なくとも 9 4 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、又は少なくとも 9 9 % のアミノ酸同一性を有する好適な酵素は、使用することができる。

【 0 2 3 7 】

また、好適なペルヒドロラーゼ酵素は、本発明のペルヒドロラーゼ酵素（例えば、配列番号 2 , 1 0 , 1 4 、及び 1 6 ）の 1 つに 1 個又はそれ以上の欠失、置換及び／又は挿入を有する酵素を含んでいてもよい。表 2 に示されるように、ペルヒドロラーゼ活性を有する C E - 7 炭水化物エステラーゼは、わずか 3 2 % の総体的なアミノ酸同一性しか共有しない。本発明の実施例で提供されたデータに基づけば、C E - 7 炭水化物エステラーゼファミリーに属するペルヒドロラーゼ活性を有する追加の酵素は、酵素が保存されたシグネチャー モチーフを保持してさえいれば、それより低いパーセント同一性しか有さないものでもよい。そのようなものとして、酵素内の相対的な位置に保存されたシグネチャー モチーフ（表 3 を参照）が認められさえすれば、欠失、置換、及び／又は挿入の数は変化してもよい。

【 0 2 3 8 】

本明細書に提供された 1 つ又はそれ以上の本発明の配列から誘導されたアミノ酸配列を有する変異酵素を含む酵素触媒も、また、本発明の方法に使用することができる。DiCosimo への米国仮出願第 6 1 / 1 0 2 5 2 0 号（参照することによって本明細書に組み込まれている）は、改善されたペルヒドロリシス活性を有する酵素触媒について説明している。より具体的には、DiCosimo は、数種のサーモトガアセチルキシランエステラーゼ内に存在する重要なシステイン残基に対する特定のアミノ酸置換（アラニン、バリン、セリン、又はスレオニン）が、野生型のアセチルキシランエステラーゼと比較した場合、いかに変異酵素のペルヒドロリシス活性が増加するかを教えている。サーモトガ属のアセチルキシランエステラーゼ間の高い相同性のため、いかなるサーモトガ属におけるシステイン残基へのアラニン、バリン、セリン又はスレオニンによる置換も、同様の結果をもたらすことが推定される。

【 0 2 3 9 】

1 つの実施態様において、本発明の方法は、ペアワイズアラインメントのデフォルトパラメーターとして K T U P L E = 1 、 G A P P E N A L T Y = 3 、 W I N D O W = 5 及び D I A G O N A L S S A V E D = 5 を用いた C L U S T A L のアラインメント法（例えば、 C L U S T A L W ）に基づき、配列番号 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 又は 7 3 のアミノ酸 2 7 7 への置換が、セリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるという前提で、配列番号 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 又は 7 3 と比較した場合、少なくとも 9 5 % の配列同一性（又は、種々の実施態様において、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % あるいは 9 9 % の配列同一性）を有する変異型サーモトガ由来酵素を用いることができる。

【 0 2 4 0 】

より具体的な実施態様では、本発明の方法は、アミノ酸残基 2 7 7 がセリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるなら、配列番号 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 及び 7 3 から成るグループから選択されるアミノ酸配列を含む変異型サーモトガ酵素を用いてもよい。

【 0 2 4 1 】

更なる具体的な実施態様では、本発明の方法は、アミノ酸残基 2 7 7 がセリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるアミノ酸で置換された、配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む変異型サーモトガ・ネアポリタナ酵素を用いてもよい。

【 0 2 4 2 】

更なる具体的な実施態様では、本発明の方法は、アミノ酸残基 2 7 7 がセリン、スレオニン、バリン及びアラニンから成るグループから選択されるアミノ酸で置換された、配列

10

20

30

40

50

番号 70 のアミノ酸配列を含む変異型サー・モトガ・マリチマ酵素を用いてもよい。

【 0 2 4 3 】

加えて、それに対応する核酸配列内で見出された構造的な類似性に従って好適な酵素を同定することは、十分に当業者の技術的範囲内である。ハイブリダイゼーション技術を用いて、類似した遺伝子配列を同定することができる。従って、本発明の好適なペルヒドロラーゼ触媒は、ストリンジエントな条件下で、配列番号 1 ；配列番号 3 ；配列番号 5 ；配列番号 7 ；配列番号 9 ；配列番号 11 ；配列番号 13 ；配列番号 15 ；配列番号 17 ；配列番号 19 ；配列番号 21 ；配列番号 23 ；配列番号 29 ；配列番号 55 ；配列番号 57 ；配列番号 59 ；及び配列番号 61 から成るグループから選択される核酸配列を有する核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によってコードされたアミノ酸配列を含む。

10

【 0 2 4 4 】

別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ触媒は、ストリンジエントな条件下で、配列番号 1 、配列番号 9 、配列番号 13 、及び配列番号 15 から成るグループから選択される核酸配列にハイブリダイズする核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を有する酵素を含む。

【 0 2 4 5 】

本発明の方法によれば、水性の反応条件下で、炭水化物エステラーゼの C E - 7 ファミリーに属する酵素のペルヒドロラーゼ活性を用いて、工業的に有用な、効果的な濃度の過酸がその場生産される。1つの実施態様において、ペルヒドロラーゼ活性を有する酵素は、また、構造的及び機能的にセファロスボリン C デアセチラーゼ (C A H) に分類される。別の実施態様において、ペルヒドロラーゼ活性を有する酵素は、構造的及び機能的にアセチルキシランエステラーゼ (A X E) に分類される。

20

【 0 2 4 6 】

生産された過酸は非常に反応性があり、それは、これらに限定されないが、温度及び pH を含む変動要因に依存して、長時間の経過で濃度が減少する可能性がある。そのようなものとして、特に液体製剤の場合、種々の反応成分を分離した状態に維持することが望ましい。1つの態様では、過酸化水素源は、基質又はペルヒドロラーゼ触媒の何れかから分離されており、好ましくはその両者から分離されている。これは種々な技術を用いて達成することができ、この様な技術としては、これに限定されないが、多数のコンパートメントチャンバーを有するディスペンサーの使用 (米国特許第 4,484,150 号) 、及び使用時にペルヒドロラーゼ触媒と無機過酸化物及び本発明の基質とを物理的に合わせることによって、水性における酵素的なペルヒドロリシス反応を開始させることができ。ペルヒドロラーゼ触媒は、場合により、反応チャンバー本体内に固定されていてもよいし、又は処理の標的となる表面及び / 又は物体と接触させる前に、過酸を含む反応生産物から分離 (例えば、ろ過など) してもよい。ペルヒドロラーゼ触媒は、液体マトリックス中に存在してもよいし、又は固体の形態 (即ち、粉末状、錠剤) でもよいし、又は固体マトリックス内に埋め込まれていてもよく、続いてそれを、酵素的ペルヒドロリシス反応を開始させるために基質と混合する。更なる態様では、ペルヒドロラーゼ触媒を、溶解可能な、又は多孔性のパウチ内に含ませてもよく、それを、酵素的ペルヒドロリシスを開始させるために水性の基質マトリックスに添加してもよい。追加の更なる態様では、酵素触媒を含む粉末を基質 (例えば、トリアセチン) に懸濁して、使用時に水中で過酸素源と混合する。

30

【 0 2 4 7 】

過酸及び過酸化水素の濃度を測定するための H P L C アッセイ法

本発明の方法において、反応物質及び生成物を分析するために、種々な分析方法を用いることができ、そのような方法としては、これらに限定されないが、滴定、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 、ガスクロマトグラフィー (G C) 、マススペクトロスコピー (M S) 、キャピラリー電気泳動 (C E) 、U. Karstら (Anal. Chem., 69(17):3623-3627 (1997)) によって説明されている分析法、及び 2,2'-アジノ-ビス (3 - エチルベンゾタゾリン) - 6 - スルホナート (A B T S) アッセイ (S. Minning, et al., Anal

40

50

ytica Chimica Acta 378:293-298 (1999) 及び国際公開公報第2004/058961号) が挙げられる。

〔 0 2 4 8 〕

過酸の最小殺菌濃度の測定

J. Gabrielsonら (J. Microbiol. Methods 50: 63-73 (2002)) によって説明されている方法が、過酸又は過酸化水素及び酵素基質の最小殺菌濃度 (MBC) を測定するために使用することができる。このアッセイ方法は、XTT還元の阻害に基づいており、ここで、XTT (2,3-ビス[2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル]-5-[フェニルアミノ]カルボニル) - 2H - テトラゾリウム、分子内塩、モノナトリウム塩) は、490 nm 又は 450 nm で測定された光学濃度 (OD) の変化によって微生物の呼吸活性を示す酸化還元色素である。しかし、消毒剤及び防腐剤の活性の試験に利用可能な様々なその他の方法があり、その方法としては、これらに限定されないが、生菌数計数、直接的な顕微鏡計数、乾燥質量、濁度測定、吸光度及び生物発光 (例えば、Brock, Semour S., 「消毒、滅菌、及び保存、第 5 版」 (Disinfection, Sterilization, and Preservation, 5th edition), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA; 2001 を参照) が挙げられる。

[0 2 4 9]

酵素的に製造された過酸組成物の使用

本発明の方法に従って製造した酵素触媒生成の過酸は、様々な硬表面／無生物への用途において、微生物性、真菌性、プリオン関連及びウイルス性の汚染の濃度を減少させるために用いることができ、例えば、医療機器（例えば、内視鏡）、織物（例えば、衣服、カーペット）、食品製品の表面、食品保存及び食品包装器具、食品の包装に用いられる材料、鶏の孵化場、及び飼育施設、動物の囲い、及び微生物及び／又は殺ウイルス活性を有する使用済みのプロセス水の汚染除去に用いることができる。酵素により生成した過酸を、プリオンを不活性化する様に設計された製剤（例えば、所定のプロテアーゼ）に用いて、追加の殺菌活性を提供してもよい。好ましい態様において、本発明の過酸組成物は、特にオートクレーブ不可能な医療機器や食品包装装置のための消毒剤として、有用である。過酸を含む製剤は、G R A S 又は食品グレードの成分（酵素、酵素基質、過酸化水素、及び緩衝液）を用いて調製してもよいために、酵素により生成した過酸は、更に動物の死体、肉、果物及び野菜の汚染除去のために、又は加工食品の汚染除去のために用いてもよい。酵素により生成した過酸は、最終的な形態が粉末、液体、ゲル、フィルム、固体又はエアロゾルである製品に組み込んでもよい。酵素により生成した過酸は、なお有効な汚染除去効果を示すような濃度に希釈してもよい。

[0 2 5 0]

有効な濃度の過酸を含む組成物を用いて、生きた病原性微生物の汚染物質で汚染された（又は、汚染された疑いのある）表面及び／又は物体を、表面又は物体と本発明の方法によって生産された生成物を接触させることによって消毒することができる。本明細書で用いられる「接触させること」は、噴霧すること、処理すること、浸漬すること、フラッシングすること、その上又はその中に流し込むこと、混合すること、組み合わせること、塗装すること、コーティングすること、塗布すること、付着させることによって、及びその他の方法で、有効な濃度の過酸を含む過酸溶液若しくは組成物、又は有効な濃度の過酸を形成する溶液若しくは組成物と、ある濃度の微生物集団で汚染されている疑いのある表面又は無生物が接触することを含む。消毒剤組成物は、洗浄及び消毒作用の両者を提供するために、洗浄用組成物と組み合わせてもよい。或いは、1つの組成物で洗浄及び消毒作用の両者を提供するために、製剤に洗浄剤（例えば、界面活性剤又は洗剤）が組み込まれてもよい。

(0 2 5 1)

有効な濃度の過酸を含む組成物は、少なくとも1種の追加の抗菌剤、プリオン分解プロテアーゼの組合せ、殺ウイルス剤、殺胞子剤又は殺生物剤を含んでいてもよい。これらの薬剤と特許請求された方法によって生産された過酸の組み合わせは、病原微生物、胞子、

ウイルス、真菌及び／又はプリオンで汚染された表面及び／又は物体（又は、汚染された疑いのある）を浄化及び消毒するために用いられる場合、効果の上昇及び／又は相乗効果を提供することができる。好適な抗微生物剤としては、所望の程度の微生物からの保護を提供するのに十分な量のカルボン酸エステル（例えば、p-ヒドロキシアルキルベンゾエート、及びアルキルシンナメート）、スルホン酸（例えば、ドデシルベンゼンスルホン酸）、ヨード化合物若しくは活性なハロゲン化合物（例えば、元素のハロゲン）、ハロゲン酸化物（例えば、NaOC1、HOCl、HOBr、ClO₂）、ヨウ素、インターハロゲン化物（例えば、一塩化ヨウ素、二塩化ヨウ素、三塩化ヨウ素、四塩化ヨウ素、塩化臭素、一臭化ヨウ素、又は二臭化ヨウ素）、ポリハロゲン化物、次亜塩素酸塩、次亜塩素酸、次亜臭素酸塩、次亜臭素酸、クロロ及びプロモヒダントイン、二酸化塩素、及び亜塩素酸ナトリウム）、有機過酸化物、例えば、過酸化ベンゾイル、過酸化アルキルベンゾイル、オゾン、一重項酸素発生剤、及びそれらの混合物、フェノール誘導体、（例えば、o-フェニルフェノール、o-ベンジルp-クロロフェノール及びtert-アミルフェノール、及びC1～C6アルキルヒドロキシベンゾアート）、第四級アンモニウム化合物（例えば、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム、及びそれらの混合物）、及びこのような抗菌剤の混合物が挙げられる。抗菌剤の有効量としては、約0.001質量%～約60質量%の抗菌剤、約0.01質量%～約15質量%の抗菌剤、又は約0.08質量%～約2.5質量%の抗菌剤が挙げられる。10

【0252】

1つの態様において、本発明の方法によって形成された過酸は、ある場所の上及び／又はその地点に適用したとき、生存可能な微生物汚染物質（例えば、生きた微生物集団）の濃度を減少させるために使用することができる。本明細書で用いられるように、「場所」は、消毒又は漂白に好適な標的の表面の一部又は全部を含む。標的の表面としては、潜在的に微生物、ウイルス、胞子、真菌、プリオン又はそれらの組み合わせで汚染される可能性があるあらゆる表面が挙げられる。非限定的な例としては、食品又は飲料産業で見られる器具の表面（例えば、タンク、コンベヤー、床、ドレーン、クーラー、冷凍庫、器具の表面、壁、バルブ、ベルト、パイプ、ドレーン、ジョイント、裂け目、それらの組み合わせなど）；建築物の表面（例えば、壁、床及び窓）；非食料品産業に関連するパイプ及びドレーン、例えば、水処理施設、プール及び温泉場、並びに発酵槽；病院又は動物病院の表面（例えば、壁、床、ベッド、機具（例えば、内視鏡）、病院／動物病院又はその他の医療の場で着用される衣類、例えば衣類、洗浄機具、靴、及びその他の病院又は動物病院の表面）；レストランの表面；浴室の表面；トイレ；衣服、及び靴；家禽、ウシ、乳牛、ヤギ、ウマ及びブタのような家畜のための厩又は家畜小屋の表面；家禽又はエビ用の孵化場；及び薬剤又は生物製剤の表面（例えば、薬剤又は生物製剤の製造器具、薬剤又は生物製剤の成分、薬剤又は生物製剤の賦形剤）が挙げられる。また、更なる硬表面としては、食品、例えば、牛肉、鶏肉、豚肉、野菜、果実、海産食物、それらの組み合わせなども挙げられる。また、水を吸収する材料、例えば、感染したリネン又はその他の布地も挙げられる。また、収穫された植物又は植物製品も挙げられ、例えば、種子、球根、塊茎、果実及び野菜、発芽させた植物、及び特に作物の発芽させた植物、例えば、穀草、葉菜、及びサラダ用作物、根菜、豆類、ベリー系の果物、柑橘系の果物、及び硬い果物が挙げられる。20

【0253】

硬表面を有する材料の非限定的な例は、金属（例えば、鋼、ステンレス鋼、クロム、チタン、鉄、銅、真鍮、アルミニウム及びそれらの合金）、無機物質（例えば、コンクリート）、ポリマー及びプラスチック（例えば、ポリオレフィン、例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ（メタ）アクリラート、ポリアクリロニトリル、ポリブタジエン、ポリ（アクリロニトリル、ブタジエン、スチレン）、ポリ（アクリロニトリル、ブタジエン）、アクリロニトリルブタジエン；ポリエステル、例えば、ポリエチレンテレフタラート；並びにポリアミド、例えば、ナイロン）である。更なる表面としては、レンガ、タイル、セラミック、磁器、木材、ビニル、リノリウム、及びカーペットが挙げ30

られる。

【0254】

過酸は、また、洗剤用途用の漂白組成物を製造するのに有用であることが報告されている（米国特許第3,974,082号；米国特許第5,296,161号；米国特許第5,364,554号）。いくつかの漂白用途では、最適な仕上がりにするために、漂白活性レベルの制御が必要になる可能性がある。更なる態様では、本発明の方法によって形成される過酸は、洗濯物又は織物の漂白に使用することができ、この場合、漂白のために生成される過酸の濃度に対して同様の制限が望ましい。

【0255】

組換え微生物による発現

10

本発明の配列及び遺伝子産物は、異種宿主細胞中で、具体的には微生物宿主の細胞中で生産してもよい。本発明の遺伝子及び核酸分子を発現させるための好ましい異種宿主細胞は、真菌又は細菌ファミリー内に見出すことができ、温度、pH値及び溶媒耐性の広範囲にわたって成長する微生物宿主である。例えば、細菌、酵母及び糸状菌のいずれかが、適切に本発明の核酸分子の発現の宿主になることが想定される。ペルヒドロラーゼは、細胞内、細胞外又は細胞内と細胞外の両者の組み合わせで発現される可能性があり、この場合、細胞内発現によって生産されたタンパク質を回収する方法よりも、細胞外で発現させる方が、発酵産物からの目的タンパク質の回収が容易になる。転写、翻訳及びタンパク質合成装置は、細胞のバイオマスを生成するために用いられる細胞原材料と比較して不变のままである；それにもかかわらず機能的な遺伝子は発現される。宿主株の例としては、これらに限定されないが、細菌、真菌又は酵母の種類、例えば、アスペルギルス属、トリコデルマ属、サッカロミセス属、ピチア属、ファフィア（Phaffia）属、カンジダ、ハンセンヌラ属、ヤロウイア（Yarrowia）属、サルモネラ属、バチルス属、アシネトバクター属、ジモモナス属、アグロバクテリウム属、エリスロバクター属、クロロビウム属、クロマチウム属、フラボバクテリウム属、キトファガ属、ロドバクター属、ロドコッカス属、ストレプトミセス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、デイノコッカス属、エシェリキア属、エルウィニア属、パントエア属、シュードモナス属、スフィンゴモナス属、メチロモナス属、メチロバクター属、メチロコッカス属、メチロシナス（Methylosinus）属、メチロミクロビウム（Methylomicrobium）属、メチロシスティス（Methylocystis）属、アルカリゲネス属、シネコシスティス（Synechocystis）属、シネココッカス（Synechococcus）属、アナベナ属、チオバシラス属、メタノバクテリウム属、クレブシエラ属及びミクソコッカス属が挙げられる。1つの実施態様において、細菌の宿主株としては、エシェリキア属、バチルス属、及びシュードモナス属が挙げられる。好ましい実施態様では、細菌の宿主細胞は、エシェリキア・コリである。

20

【0256】

大規模な微生物の増殖及び機能的な遺伝子の発現には、多様で簡単な若しくは複雑な炭水化物、有機酸、及びアルコール、又はメタンのような飽和炭化水素、又は、例えば、光合成又は化学独立栄養の宿主の場合は、二酸化炭素、窒素、リン、硫黄、酸素、炭素又は低分子の無機物質イオンを含むあらゆる形態及び量の微量栄養素を使用してもよい。増殖速度の調節は、培養に特定の調節分子の添加又は無添加によって影響を受ける可能性があり、これらは、一般的には栄養素又はエネルギー源とは見なさない。

30

【0257】

好適な宿主細胞の形質転換に有用なベクター又はカセットは、当該分野で公知である。典型的には、ベクター又はカセットは、関連する遺伝子の転写及び翻訳を作動させる配列、選択マーカー、及び自律増殖させたり又は染色体を統合させたりする配列を含む。好適なベクターは、転写開始の制御を担う遺伝子の5'領域、及び転写終結を制御するDNAフラグメントの3'領域を含む。両者の制御領域は、形質転換宿主細胞に相同的な遺伝子、及び/又は生産宿主に対して天然型の遺伝子から誘導される場合が最も好ましいが、このような制御領域は必ずしもそのようにして誘導されていなくてもよい。

40

【0258】

50

望ましい宿主細胞中で本発明のセファロスボリン C デアセチラーゼのコード領域を発現させるのに有用な開始制御領域又はプロモーターは多数あり、当業者によく知られている。実質的には、これらの遺伝子を稼働させることができればどのようなプロモーターでも本発明に好適であり、例えば、これらに限定されないが、CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TP1(サッカロミセス属における発現に有用)、AOX1(ピチア属における発現に有用)；及び lac、ara、tet、trp、IPL、IPR、T7、lac 及び trc(エシェリキア・コリにおける発現に有用)、amy、apr、npr プロモーター、及びバチルス属における発現に有用な様々なファージプロモーターが挙げられる。

10

【0259】

終結制御領域も、また、自然から宿主細胞に至る様々な遺伝子から誘導することができる。1つの実施態様において、終結制御領域の含有は任意である。別の実施態様において、キメラ遺伝子は、好ましい宿主細胞由来の終結制御領域を含む。

【0260】

工業的な生産

本発明のペルヒドロラーゼ触媒を生産するために、様々な培養方法を適用することができる。例えば、組換え微生物宿主から過剰発現される特定の遺伝子産物の大規模生産は、バッチ式及び連続培養法のどちらによっても生産することができる。

【0261】

20

古典的なバッチ式培養方法は閉鎖系であり、この場合、培地組成は培養の開始時に設定され、培養工程中に入為的な変更を受けることはない。従って、培養工程の開始時に、培地に目的の生物又は生物群を接種し、系には追加で何も添加することなしに、増殖又は代謝活性を起こすことができる。しかしながら、一般的には、「バッチ式」培養は、炭素源の添加に関してバッチ式なのであって、pH及び酸素濃度のような要因を制御する試みがなされることが多い。バッチ系においては、系の代謝産物及びバイオマス組成は、培養が終了するときまで絶えず変化する。バッチ培養中に、細胞は静止状態のラグフェーズを経て高い対数増殖期になり、最終的に定常期になり、ここで増殖速度は減少するか、又は停止する。処理をしないと、定常期中の細胞は、最終的には死滅すると予想される。処置されない場合、定常期における細胞は、いずれは死滅する。いくつかの系において、対数期中の細胞が、最終産物又は中間体の生産の大部分に関与することが多い。他の系では、静止又は対数期後に生産させることができる。

30

【0262】

標準的なバッチ系の変形は、流加培養系(fed-batch system)である。流加培養法も、また、本発明に好適であり、基質が培養の進行とともに段階的に追加されること以外は、典型的なバッチ系を含む。流加培養系は、異化代謝産物の抑制が細胞の代謝を阻害しやすい場合に有用であり、この場合、限定的な量の基質しか培地中に含まれていないことが望ましい。流加培養系における実際の基質濃度の測定は難しいため、pH、溶存酸素及び排ガス(例えば、CO₂)の分圧などの測定可能な因子の変化に基づいて推定される。バッチ式及び流加培養法は一般的で、当業界で公知であり、Thomas D. Brock in「バイオテクノロジー：工業微生物学教本」(Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology), Second Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989) 及び Deshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol., 36:227 (1992) にその例が見られる。

40

【0263】

また、目的のペルヒドロラーゼ触媒の商業的な生産も、連続培養を用いて達成することができる。連続培養は開放系であり、この場合、確定した培地が連続的にバイオリアクターに添加され、同時に等量の馴化培地が処理するために除かれる。一般的に、連続培養では、細胞は一定した高い液相密度に維持され、そこでは、細胞は主として対数増殖期にある。或いは、固定化細胞を用いて連続培養を実施してもよく、その場合、炭素及び栄養素は連続的に添加され、有用な生成物、副産物又は老廃物は、細胞集団から連続的に除去さ

50

れる。細胞の固定化は、天然及び／又は合成材料で構成される様々な固体の支持体を用いて行うことができる。

【0264】

連続又は半連続培養によって、細胞増殖又は最終産物の濃度に影響を与える1つの因子又は多数の因子調節が可能になる。例えば、1つの方法は、炭素源又は窒素レベルのような制限される栄養素を一定の比率で維持し、その他の全てのパラメーターの調節を可能にする。他の系において、増殖に影響を与える多数の因子を連続的に変更することが可能であり、そのうえ培地の濁度によって測定される細胞濃度は一定に維持される。連続的な系では、定常状態の増殖条件を維持する努力がなされ、従って、培地の抜き取りによる細胞の損失は、培養中の細胞増殖速度とバランスをとらなければならない。連続培養方法のための栄養素及び増殖因子を調節する方法、並びに、生産物形成の速度を最大にする技術は、工業微生物学の業界においてよく知られており、上記の Brock によって様々な方法が説明されている。

【0265】

本発明における発酵培地は、好適な炭素基質を含んでいなければならない。好適な基質としては、これらに限定されないが、グルコース及びフルクトースなどの単糖、乳糖又はショ糖のような二糖、デンプン又はセルロース、又はそれらの混合物のような多糖、及び、例えば、チーズホエー透過物、コーンスティーブリカ、砂糖大根の糖蜜、及び大麦麦芽のような再生可能な原材料由来の未精製の混合物が挙げられる。加えて、炭素基質は、二酸化炭素、メタン又はメタノール（例えば、宿主細胞がメチロトローフ微生物である場合）のような1個の炭素を含む基質であってもよい。同様に、カンジダ属の様々な種は、アラニン又はオレイン酸を代謝することができる（Sulter et al., Arch. Microbiol., 153:485489 (1990)）。従って、本発明で使用される炭素源は、多種多様な炭素含有基質を包含し得ることが考えられ、生物の選択によってのみ限定されることになる。

【0266】

バッチ式若しくは流加培養、又は連続培養からの所望のペルヒドロラーゼ触媒の回収は、当業者が知るいかなる方法によって達成されてもよい。例えば、ペルヒドロラーゼ触媒が細胞内に生産される場合、細胞ペーストは遠心分離又は膜濾過によって培養培地から分離し、場合により、望ましいpHの水又は水性緩衝液で洗浄し、次いで所望のpHの水性緩衝液に懸濁した細胞ペーストをホモジネートして所望のペルヒドロラーゼ触媒を含む細胞抽出物を作る。細胞抽出物は、ペルヒドロラーゼ触媒溶液から不要なタンパク質を沈殿させるための熱処理工程を行う前に、場合により、細胞残屑を除去するためにセライト又はシリカのような適切な濾過助剤を通して濾過してもよい。所望のペルヒドロラーゼ触媒を含有する溶液は、膜濾過又は遠心分離によって沈殿した細胞残屑及びタンパク質から分離し、生じた部分精製されたペルヒドロラーゼ触媒溶液は、追加の膜濾過で濃縮し、次に、場合によって、適切な担体（例えば、マルトデキストリン、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、又はそれらの混合物）と混合し、噴霧乾燥して所望のペルヒドロラーゼ触媒を含む固体粉末を製造することができる。

【0267】

本発明者らは、具体的に引用した全ての参考文献の全内容を本開示に組み込む。更に、量、温度又はその他の値若しくはパラメーターが、範囲、好ましい範囲、又は好ましい上方の値及び好ましい下方の値の表の何れかとして与えられている場合、これは、あらゆる上方の範囲の限界若しくは好ましい値と、あらゆる下方の範囲の限界若しくは好ましい値とのあらゆる対から形成される全ての範囲を、範囲が別々に開示されているかどうかに関係なく、具体的に開示しているものとする。本明細書において各種の数値が列挙されている場合、特に他の指定がない限り、その範囲は、それらの両端の値並びに範囲内の全ての整数及び分数を含むものとする。範囲が定義されている場合、本発明の範囲を列挙された特定の値に限定することは意図していない。

【0268】

一般的な方法

10

20

30

40

50

本発明の好ましい態様を実証するために、以下の実施例を示す。以下の実施例で開示された技術は、本発明者らによって本発明の実施において十分に機能することが発見された技術を示しており、従って、その実施にとって好ましいモードを構成することは、当業者であれば当然理解している。しかし、当業者であれば、本発明の開示に照らして、開示された特定の実施態様に多くの変更を加えることができ、それでもなお本発明の本質及び範囲から逸脱することなく同様の又は類似した結果を得ることを理解している。

【 0 2 6 9 】

全ての試薬及び材料は、他に特に規定がない限り、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD)、TCI America (Portland, OR)、Roche Diagnostic 10 Corporation (Indianapolis, IN) 又はSigma/Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO) から得た。

【 0 2 7 0 】

本明細書に記載の略語は、以下に示すように測定、技術、特性又は化合物の単位に相当する：「sec」又は「s」は、秒を意味し、「min」は、分を意味し、「h」又は「hr」は、時間を意味し、「μL」は、マイクロリットルを意味し、「mL」は、ミリリットルを意味し、「L」は、リットルを意味し、「mM」は、ミリモル濃度を意味し、「M」は、モル濃度を意味し、「mmol」は、ミリモルを意味し、「ppm」は、百万分率を意味し、「wt%」は、質量パーセントを意味し、「g」は、グラムを意味し、「μg」は、マイクログラムを意味し、「ng」は、ナノグラムを意味し、「g」は、重力を意味し、「HPLC」は、高速液体クロマトグラフィーを意味し、「ddH₂O」は、蒸留して脱イオンした水を意味し、「dcw」は、乾燥細胞質量を意味し、「ATCC」又は「ATCC (登録商標)」は、アメリカン・タイプ・カルチャーラー・コレクション (Manassas, VA) を意味し、「U」は、ペルヒドロラーゼの活性単位を意味し、「rpm」は、毎分回転数を意味し、及び「EDTA」は、エチレンジアミン四酢酸を意味する。

【 0 2 7 1 】

〔実施例1〕

k a t G カタラーゼが破壊された E . コリの構築

配列番号39と同定されたPCR産物を作製するために、配列番号37及び配列番号38と同定されたプライマーを用いたPCR (94 °C 0.5分間、55 °C 0.5分間、70 °C 1分間、30サイクル) によって、カナマイシン耐性遺伝子 (kan : 配列番号35) をプラスミドpKD13 (配列番号36) から増幅した。katG核酸配列は配列番号40として示され、それに対応するアミノ酸配列は配列番号41である。E . コリ MG1655 (ATCC (登録商標) 47076 (商標)) を、-レッドリコンビナーゼ遺伝子 (Datsenko and Wanner, 2000, PNAS USA 97:6640-6645) を含む温度感受性プラスミドpKD46 (配列番号42) で形質転換し、LB -ampプレート上で30 °C で24時間選択した。MG1655/pKD46を、PCR産物50 ~ 500ngで電気穿孔法 (BioRad Gene Pulser, 0.2 cm cuvette, 2.5 kV, 200 W, 25 uF) によって形質転換し、LB-kanプレート上で、37 °C で24時間選択培養した。数個のコロニーを、LB-kanプレート上に線状に塗布し、42 °C で一晩インキュベートしてpKD46プラスミドを養生した。コロニーをチェックして、kanR/ampSの表現型を確認した。ゲノムDNAを、PUREGENE (登録商標) DNA精製システムを用いて数個のコロニーから単離し、配列番号43及び配列番号44と同定されたプライマーを用いたPCRによってチェックし、katG遺伝子の破壊を確認した。数種のkatG遺伝子が破壊された株を、FLPリコンビナーゼを含む温度感受性プラスミドpCP20 (配列番号45) で形質転換し、これを用いて、kan遺伝子を切り出し、LB-ampプレート上で、37 °C で24時間選択した。数個のコロニーを、LBプレートに線状に塗布し、42 °C で一晩インキュベートして、pCP20プラスミドを養生した。2つのコロニーをチェックして、kanS/ampSの表現型を確認し、MG1655 KatG1、及びMG1655 KatG2と命名した。

JP 5504268 B2 2014.5.28

10

20

30

40

50

【0272】

〔実施例2〕

k a t E カタラーゼが破壊されたE.コリの構築

配列番号48と同定されたPCR産物を作製するために、配列番号46及び配列番号47と同定されたプライマーを用いたPCR（94で0.5分間、55で0.5分間、70で1分間、30サイクル）によって、カナマイシン耐性遺伝子（配列番号35）をプラスミドpKD13（配列番号36）から増幅した。k a t E核酸配列は、配列番号49として示され、それに対応するアミノ酸配列は配列番号50である。E.コリMG1655（ATCC（登録商標）47076（商標））を、-レッドリコンビナーゼ遺伝子を含む温度感受性プラスミドpKD46（配列番号42）で形質転換し、LB-ampプレート上で、30で24時間選択した。MG1655/pKD46を、PCR産物50～500ngで電気穿孔法（BioRad Gene Pulser, 0.2 cm cuvette, 2.5 kV, 200 W, 25 uF）によって形質転換し、LB-kanプレート上で、37で24時間選択した。数個のコロニーを、LB-kanプレートに線状に塗布し、42で一晩インキュベートしてpKD46プラスミドを養生した。コロニーをチェックして、kanR/ampSの表現型を確認した。ゲノムDNAを、PUREGENE（登録商標）DNA精製システムを用いて数個のコロニーから単離し、配列番号43及び配列番号44と同定されたプライマーを用いたPCRによってチェックし、k a t G遺伝子の破壊を確認した。数種のk a t E遺伝子が破壊された株を、FLPリコンビナーゼを含む温度感受性プラスミドpCP20（配列番号45）で形質転換し、これを用いて、kan遺伝子を切り出し、LB-ampプレート上で、37で24時間選択した。数個のコロニーを、LBプレート上に線状に塗布し、42で一晩インキュベートして、pCP20プラスミドを養生した。2つのコロニーをチェックして、kanS/ampSの表現型を確認し、MG1655KatE1、及びMG1655KatE2と命名した。

【0273】

〔実施例3〕

k a t G カタラーゼ及びk a t E カタラーゼが破壊されたE.コリ株（KLP18）の構築

配列番号48と同定されたPCR産物を作製するために、配列番号46及び配列番号47と同定されたプライマーを用いたPCR（94で0.5分間、55で0.5分間、70で1分間、30サイクル）によって、カナマイシン耐性遺伝子（配列番号35）をプラスミドpKD13（配列番号36）から増幅した。E.コリMG1655KatG1（実施例13）を、-レッドリコンビナーゼ遺伝子を含む温度感受性プラスミドpKD46（配列番号42）で形質転換し、LB-ampプレート上で、30で24時間選択した。MG1655KatG1/pKD46を、PCR産物50～500ngで電気穿孔法（BioRad Gene Pulser, 0.2 cm cuvette, 2.5 kV, 200 W, 25 uF）によって形質転換し、LB-kanプレート上で、37で24時間選択した。数個のコロニーを、LB-kanプレートに線状に塗布し、42で一晩インキュベートしてpKD46プラスミドを養生した。コロニーをチェックして、kanR/ampSの表現型を確認した。ゲノムDNAを、PUREGENE（登録商標）DNA精製システムを用いて数個のコロニーから単離し、配列番号51及び配列番号52と同定されたプライマーを用いたPCRによってチェックし、k a t E遺伝子の破壊を確認した。数種のk a t E遺伝子が破壊された株（katE）を、FLPリコンビナーゼを含む温度感受性プラスミドpCP20（配列番号45）で形質転換し、これを用いて、kan遺伝子を切り出し、LB-ampプレート上で、37で24時間選択した。数個のコロニーを、LBプレート上に線状に塗布し、42で一晩インキュベートして、pCP20プラスミドを養生した。2つのコロニーをチェックして、kanS/ampSの表現型を確認し、MG1655KatG1KatE18.1、及びMG1655KatG1KatE23と命名した。MG1655KatG1KatE18.1をE.コリKLP18と命名した。

【0274】

10

20

30

40

50

〔実施例4〕

サーモトガ・ネアポリタナ由来のペルヒドロラーゼのクローニング及び発現

GENBANK(登録商標)(受託番号U58632)で報告されているようなサーモトガ・ネアポリタナ由来のアセチルキシランエステラーゼをコードする遺伝子を、E.コリ中での発現のために最適化されたコドンを用いて合成した(DNA 2.0、Menlo Park, CA)。続いて、配列番号66及び配列番号67と同定されたプライマーを用いたPCR(94で0.5分間、55で0.5分間、70で1分間、30サイクル)によって、その遺伝子を増幅した。得られた核酸生成物(配列番号68)を、pTrcHis2-TOPO(登録商標)にサブクローニングして、pSW196と同定されたプラスミドを作製した。そのプラスミドpSW196を使用してE.コリを形質転換し、細胞株KLP18/pSW196を作製した。KLP18/pSW196は、LB培地で37で振盪しながらOD600nm=0.4~0.5になるまで増殖させ、その時点でIPTGを、1mMの最終濃度になるように添加し、インキュベートを2~3時間続けた。細胞を遠心分離によって収穫し、SDS-PAGEを行い、総可溶性タンパク質の20~40%のペルヒドロラーゼの発現を確認した。

【0275】

〔実施例5〕

サーモトガ・マリチマMSB8由来のペルヒドロラーゼのクローニング及び発現

GENBANK(登録商標)(受託番号NP_227893.1)で報告されているようなサーモトガ・マリチマMSB8由来のアセチルキシランエステラーゼをコードする遺伝子を合成した(DNA 2.0、Menlo Park, CA)。続いて、その遺伝子を、配列番号63及び配列番号64と同定されたプライマーを用いたPCR(94で0.5分間、55で0.5分間、70で1分間、30サイクル)によって増幅した。得られた核酸生成物(配列番号65)を制限酵素のPstI及びXbaIで切断し、pUC19のPstI及びXbaIサイトの間にサブクローニングして、pSW207と同定されたプラスミドを作製した。そのプラスミドpSW207を使用してE.コリを形質転換し、KLP18/pSW207と同定された細胞株を作製した。KLP18/pSW207をLB培地で37で振盪しながらOD600nm=0.4~0.5になるまで増殖させ、その時点でIPTGを、1mMの最終濃度になるように添加し、インキュベートを2~3時間続けた。細胞を遠心分離によって収穫し、SDS-PAGEを行い、総可溶性タンパク質の20~40%のペルヒドロラーゼの発現を確認した。

【0276】

〔実施例6〕

バチルス・ズブチリスATCC(登録商標)31954(商標)由来のペルヒドロラーゼのクローニング及び発現

ゲノムDNAは、PUREGENE(登録商標)DNA精製システム(Genta Systems, Minneapolis MN)を用いて、バチルス・ズブチリスATCC(登録商標)31954(商標)から単離した。ペルヒドロラーゼ遺伝子は、配列番号3及び配列番号4と同定されたプライマーを用いたPCR(94で0.5分間、55で0.5分間、70で1分間、30サイクル)によって増幅した。得られた核酸生成物(配列番号27)を制限酵素のPstI及びXbaIで切断し、pUC19のPstI及びXbaIサイトの間にサブクローニングして、pSW194と同定されたプラスミドを作製した。そのプラスミドpSW194を使用してE.コリKLP18を形質転換し、KLP18/pSW194と同定された細胞株を作製した。KLP18/pSW194をLB培地で37で振盪しながらOD600nm=0.4~0.5になるまで増殖させ、その時点でIPTGを、1mMの最終濃度になるように添加し、インキュベートを2~3時間続けた。細胞を遠心分離によって収穫し、SDS-PAGEを行い、総可溶性タンパク質の20~40%のペルヒドロラーゼの発現を確認した。

【0277】

〔実施例7〕

10

20

30

40

50

バチルス・ズブチリス B E 1 0 1 0 由来のペルヒドロラーゼのクローニング及び発現

ゲノムDNAは、PURE GENE（登録商標）DNA精製システム（Gentra Systems）を用いて、バチルス・ズブチリス B E 1 0 1 0（Payne and Jackson 1991 J. Bacteriol. 173:2278-2282）から単離した。ペルヒドロラーゼ遺伝子は、配列番号25及び配列番号26と同定されたプライマーを用いたPCR（94度0.5分間、55度0.5分間、70度1分間、30サイクル）によってゲノムDNAから増幅した。得られた核酸生成物（配列番号28）を制限酵素のPst I及びXba Iで切断し、pUC19のPst I及びXba Iサイトの間にサブクローニングして、pSW189と同定されたプラスミドを作製した。そのプラスミドpSW189を使用してE.コリKLP18を形質転換し、KLP18/pSW189と同定された細胞株を作製した。KLP18/pSW189をLB培地で37度振盪しながらOD_{600nm} = 0.4 ~ 0.5になるまで増殖させ、その時点でIPTGを、1mMの最終濃度になるように添加し、インキュベートを2~3時間続けた。細胞を遠心分離によって収穫し、SDS-PAGEを行い、総可溶性タンパク質の20~40%のペルヒドロラーゼの発現を確認した。
10

【0278】

〔実施例8〕

バチルス・ブミルス PS 2 1 3 のペルヒドロラーゼのクローニング及び発現

GENBANK（登録商標）（受託番号AJ1249957）で報告されているようなバチルス・ブミルス PS 2 1 3 由来のアセチルキシランエステラーゼをコードする遺伝子（axe1）は、E.コリにおける発現に最適化されたコドンを使用して合成した（DNA 2.0、Menlo Park, CA）。次いで、その遺伝子を、配列番号33及び配列番号34と同定されたプライマーを用いたPCR（94度0.5分間、55度0.5分間、70度1分間、30サイクル）によって増幅した。得られた核酸生成物（配列番号53）は、pTrcHis2-TOPO（登録商標）（Invitrogen, Carlsbad CA）にサブクローニングして、pSW195と同定されたプラスミドを作製した。そのプラスミドpSW195を使用してE.コリKLP18を形質転換し、KLP18/pSW195と同定された細胞株を作製した。KLP18/pSW195をLB培地で37度振盪しながらOD_{600nm} = 0.4 ~ 0.5になるまで増殖させ、その時点でIPTGを、1mMの最終濃度になるように添加し、インキュベートを2~3時間続けた。細胞を遠心分離によって収穫し、SDS-PAGEを行い、総可溶性タンパク質の20~40%のペルヒドロラーゼの発現を確認した。
20
30

【0279】

〔実施例9〕

バチルス・リケニフォルミス ATCC 14580（商標）由来のペルヒドロラーゼのクローニング及び発現

ゲノムDNAは、PURE GENE（登録商標）DNA精製システム（Gentra Systems）を用いて、バチルス・リケニフォルミス ATCC（登録商標）14580（商標）から単離した。ペルヒドロラーゼ遺伝子は、配列番号31及び配列番号32と同定されたプライマーを用いたPCR（94度0.5分間、55度0.5分間、70度1分間、30サイクル）によって、ゲノムDNAから増幅した。得られた核酸生成物（配列番号7）は、pTrcHis2-TOPO（登録商標）（Invitrogen, Carlsbad CA）にサブクローニングして、pSW191と同定されたプラスミドを作製した。そのプラスミドpSW191を使用してE.コリKLP18を形質転換し、KLP18/pSW191と同定された細胞株を作製した。KLP18/pSW191をLB培地で37度振盪しながらOD_{600nm} = 0.4 ~ 0.5になるまで増殖させ、その時点でIPTGを、1mMの最終濃度になるように添加し、インキュベートを2~3時間続けた。細胞を遠心分離によって収穫し、SDS-PAGEを行い、総可溶性タンパク質の20~40%のペルヒドロラーゼの発現を確認した。
40

【0280】

〔実施例10〕

ペルヒドロラーゼを発現するE.コリKLP18形質転換体の発酵

発酵槽用の種培養は、2 Lの振盪フラスコに、酵母エキス(Amb er x 695、5.0 g/L)、K₂HPO₄(10.0 g/L)、KH₂PO₄(7.0 g/L)、クエン酸ナトリウム二水和物(1.0 g/L)、(NH₄)₂SO₄(4.0 g/L)、MgSO₄七水和物(1.0 g/L)及びクエン酸第二鉄アンモニウム(0.10 g/L)を含む0.5 Lの種培地を入れることによって調製した。培地のpHを6.8に調整し、培地はフラスコ中で滅菌した。滅菌後の添加物は、グルコース(50質量%、10 mL)及びアンピシリンのストック溶液(25 mg/mL)1 mLを含んだ。種培地に、20%グリセリン中のE.コリKLP18/pSW189、E.コリKLP18/pSW191、E.コリKLP18/pSW194、E.コリKLP18/pSW195、E.コリKLP18/pSW196又はE.コリKLP18/pSW207の培養物1 mLを接種し、35¹⁰、及び300 rpmで培養した。種培養は、OD₅₅₀が約1~2になったら、35で、KH₂PO₄(3.50 g/L)、FeSO₄七水和物(0.05 g/L)、MgSO₄七水和物(2.0 g/L)、クエン酸ナトリウム二水和物(1.90 g/L)、酵母エキス(Amb er x 695、5.0 g/L)、Biospumex 153 K消泡剤(0.25 mL/L、Cognis Corporation)、NaCl(1.0 g/L)、CaCl₂二水和物(10 g/L)、及びNIT微量元素溶液(10 mL/L)を含む培地8 Lと共に、14 Lの発酵槽(Braun)に移した。微量元素溶液は、クエン酸一水和物(10 g/L)、MnSO₄水和物(2 g/L)、NaCl(2 g/L)、FeSO₄七水和物(0.5 g/L)、ZnSO₄七水和物(0.2 g/L)、CuSO₄五水和物(0.02 g/L)及びNaMoO₄²⁰二水和物(0.02 g/L)を含んだ。滅菌後の添加物は、グルコース溶液(50質量%、80.0 g)及びアンピシリンのストック溶液(25 mg/mL)(16.00 mL)を含んだ。グルコース溶液(50質量%)は、流加培養に使用した。グルコース濃度が0.5 g/Lにまで低下した時、グルコース供給を、最初は0.31 g/分で開始し、次第に、毎時それぞれ0.36、0.42、0.49、0.57、0.66、0.77、0.90、1.04、1.21、1.41、1.63 g/分に増加させ；その後速度を一定に保った。培地中のグルコース濃度を監視し、濃度が0.1 g/Lを超えた場合、供給速度を低下させるか、又は一時的に停止させた。誘導は、様々な細胞株について、OD₅₅₀=56及びOD₅₅₀=80の間で、IPTG(0.5 M)16 mLを添加することによって開始した。溶存酸素(DO)濃度は、空気飽和の25%にコントロールした。DOは、最初、羽根の攪拌速度(400~1400 rpm)によって、そして後には、通気速度(2~10 s⁻¹)によって制御した。pHは、6.8にコントロールした。NH₄OH(29%、質量/質量)及びH₂SO₄(20%、質量/体積)をpH調整に使用した。ヘッドの圧力は、0.5 barとした。細胞は、IPTG添加後16時間に、遠心分離によって収穫した。³⁰

【0281】

〔実施例11〕

CE-7エステラーゼ/ペルヒドロラーゼの比活性のpH依存性

サーモトガ・ネアポリタナ(KLP18/pSW196)、サーモトガ・マリチマMS B8(KLP18/pSW207)、バチルス・ブミルスPS213(KLP18/pSW195)、バチルス・ズブチリスBE1010(KLP18/pSW189)、バチルス・ズブチリスATCC(登録商標)31954(商標)(KLP18/pSW194)、又はバチルス・リケニフォルミスATCC(登録商標)14580(商標)(KLP18/pSW191)由来のペルヒドロラーゼを発現するE.コリ形質転換体の細胞抽出物は、ジチオスレイトール(1 mM)を含む0.05 Mのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に懸濁した細胞ペースト(20質量%湿細胞質量)の懸濁液を、16,000 psi(~110 MPa)の作動圧力を有するフレンチプレスを2回通すことにより調製した。次に、粗抽出物を、20,000×gで遠心分離して細胞残屑を除き、総可溶性タンパク質をアッセイする清澄な細胞抽出物を作製した(Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich catalog # BCA1-KT)。清澄になったサーモトガ・マリチ⁴⁰

マ M S B 8 又はサーモトガ・ニアポリタナのペルヒドロラーゼを含有する抽出物は、更に 75 で 20 分間加熱し、その後、直ちに氷 / 水浴で 5 に冷却した。得られた混合物は、遠心分離して沈殿したタンパク質を除去し、上清をまとめ、これまでと同様に総可溶性タンパク質をアッセイした。熱処理した上清の S D S - P A G E は、上清に存在する全可溶性タンパク質の少なくとも約 90 % がペルヒドロラーゼで構成されることを示した。

【 0 2 8 2 】

トリアセチン (2 0 0 m M) 及び細胞抽出物の上清 (上記のように調製) を含む反応 (総量 1 0 m L) は、表 5 に示した緩衝液及び緩衝液濃度を用い、25 で、そして 4.5 及び 10.0 の間の pH で実施した。抽出物総タンパク質 (E . コリ由来のタンパク質を変性及び沈殿させるための熱処理の有り又は無しで) の濃度は、30 分間に約 50 m M のトリアセチン濃度の減少をもたらす (典型的には、ペルヒドロラーゼに依存して、0.0 25 m g / m L ~ 0.4 m g / m L の総抽出物タンパク質濃度である) ように選択した。それぞれの反応条件に対する対照反応は、添加した抽出物タンパク質の存在なしで加水分解されるトリアセチン濃度を測定するために実施した。サンプル (1 0 0 μ L) を所定の時間に採取し、直ちに 297 μ L の d d H₂O 及び 3 μ L の 6 N H C l に添加した。得られた溶液を混合し、次に 30,000 N M W L フィルター (Millipore) を用い、マイクロ遠心機を使用して 12,000 r p m で 2 分間濾過した。濾液の一定量 (1 0 0 μ L) を、0.417 m M の N , N - ジエチルメタトルアミドのアセトニトリル溶液 (外部標準) 150 μ L に添加し、得られた溶液のトリアセチンを、スペルコ・ディスカバリー (Supelco Discovery) C 8 カラム (2 5 c m \times 4.0 m m , 5 μ m ; Supelco # 59353-U40) 及び 1 m L / 分の流速で、40 % アセトニトリル / 60 % 蒸留水のアイソクラチック移動相を使用した H P L C によって分析した。トリアセチンは、225 n m における U V 検出によって測定した。

それぞれのペルヒドロラーゼの比活性の pH 依存性を表 6 に示す。

【 0 2 8 3 】

【 表 8 】

表 5 : C E - 7 エステラーゼ / ペルヒドロラーゼの比活性の pH 依存性を測定するためには緩衝液及び緩衝液濃度

pH	緩衝液	緩衝液濃度 (M)
5.0	酢酸ナトリウム	0.15
5.5	酢酸ナトリウム	0.15
6.0	クエン酸ナトリウム	0.15
6.5	クエン酸ナトリウム	0.15
7.0	リン酸カリウム	0.15
7.5	リン酸カリウム	0.15
8.0	リン酸カリウム	0.20
8.5	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.20
9.0	トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.20
9.5	グリシン	0.20
10.0	グリシン	0.20

【 0 2 8 4 】

【表9】

表6: 200 mMのトリアセチン及び0.050~0.40 mg/mLの細胞抽出物
総タンパク質を用いた、E. コリKLP18の形質転換体で発現されるペル
ヒドロラーゼのトリアセチン加水分解に対する比活性 (mmolトリアセチ
ン/分/mg総抽出物タンパク質) のpH依存性 (ND=未測定)

pH	比活性 (mmolトリアセチン/分/mg総抽出物タンパク質)					
	サーモトガ・ ネオポリタナ	サーモト ガ・マリチマ MSB8	バチルス・ プミルス	バチルス・ ズブチ リスATCC [®] 31954 TM	バチルス・ リケニフォ ルミス	
10.0	0	ND	ND	ND	0	ND
9.5	12.0	21.6	71.1	ND	193	ND
9.0	12.5	57.1	80.4	ND	239	ND
8.5	11.3	38.8	72.4	ND	217	ND
8.0	5.8	28.7	53.9	ND	221	ND
7.5	5.3	19.8	33.7	61.0	205	62.4
7.0	3.3	16.0	30.5	37.7	120	56.3
6.5	1.7	10.3	11.6	18.6	78.0	23.8
6.0	0.4	4.3	4.2	7.4	24.0	12.3
5.5	0	1.4	3.5	0	17.6	4.7
5.0		ND	1.8		7.6	ND
4.5			ND		0.5	

【0285】

〔実施例12〕

緩衝液の濃度を用いたサーモトガ・ネアポリタナのペルヒドロラーゼによる過酢酸生産の制御

サーモトガ・ネアポリタナ由来のペルヒドロラーゼを発現するE.コリの形質転換体 (KLP18/pSW196) の細胞抽出物は、ジチオスレイトール (1 mM) を含む0.05 Mのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した細胞ペースト (20質量%湿細胞質量) の懸濁液を、16,000 psi (~110 MPa) の作動圧力を有するフレンチプレスを2回通すことにより調製した。次に、粗抽出物を、20,000×gで遠心分離して細胞残屑を除き、総可溶性タンパク質をアッセイする清澄な細胞抽出物を作製した (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich catalog # BCA1-KT)。清澄になった抽出物は、75で20分間加熱し、その後、直ちに氷/水浴で冷却した。得られた混合物は、遠心分離して沈澱したタンパク質を除去し、上清をまとめ、これまでと同様に総可溶性タンパク質をアッセイした。上清の SDS-PAGEにより、ペルヒドロラーゼは少なくとも90%純粋であることが示された。上清は、ドライアイスで凍結させ、-80で保存した。

【0286】

トリアセチン、過酸化水素及び加熱処理した細胞抽出物の上清 (上記のように調製) を含む反応 (総体積10 mL) は、表7及び8に示した重炭酸ナトリウム緩衝液濃度を用い、25で実施した。それぞれの反応条件に対する対照反応を実施し、添加した抽出物タンパク質の存在なしで、過酸化水素によるトリアセチンの化学的ペルヒドロリシスによって生成される過酢酸の濃度を測定した。反応混合物中の過酢酸の濃度の測定は、Karstら (上記) によって説明された方法に従って行った。反応混合物の一定量 (0.040 mL) を所定の時間に採取し、0.960 mLの5 mMリン酸水溶液と混合し；希釈したサンプルのpHをpH 4以下に調整することによって、反応を直ちに停止させた。得られた溶液を、ULTRAFREE (登録商標) MCフィルタユニット (30,000標準分子

10

20

30

40

50

量限界 (N MWL)、Millipore cat # UFC3LKT 00) を用い、12,000 rpm で 2 分間の遠心分離によって濾過した。得られた濾液の一定量 (0.100 mL) を、0.300 mL の脱イオン水の入った 1.5 mL のスクリューキャップ付き HPLC バイアル (Agilent Technologies, Palo Alto, CA; #5182-0715) に入れ、次に 20 mM の MTS (メチル-p-トリル-スルフィド) のアセトニトリル溶液を 0.100 mL 添加し、バイアルに蓋をして内容物を軽く混ぜ合わせた後、暗所にて約 25 で 10 分間インキュベートした。次に、それぞれのバイアルに、0.400 mL のアセトニトリル及びトリフェニルホスフィン (TPP, 40 mM) のアセトニトリル溶液を 0.100 mL 添加し、バイアルに再度蓋をし、できた溶液を混合して、暗所にて約 25 で 30 分間インキュベートした。次に、それぞれのバイアルに、10 mM の N,N-ジエチル-m-トルアミド (DET; HPLC 外部標準) を 0.100 mL 添加し、得られた溶液は、下記で説明する様に HPLC によって分析した。

【0287】

HPLC の方法 :

スペルコ・ディスカバリー (Supelco Discovery) C8 カラム (10 cm × 4.0 mm、5 (m) (cat. #569422-U) w / プレカラムのスペルコ・スペルガード・ディスカバリー (Supelco Supelguard Discovery) C8 (Sigma-Aldrich; cat # 59590-U) ; 10 マイクロリットルの注入体積 ; CH₃CN (Sigma-Aldrich; # 270717) 及び脱イオン水を 1.0 mL / 分及び環境温度で用いたグラジエント法 :

【表 10】

時間 (分 : 秒)	(% CH ₃ CN)
0 : 00	40
3 : 00	40
3 : 10	100
4 : 00	100
4 : 10	40
7 : 00 (停止)	40

【0288】

それぞれ 250 mM 又は 100 mM の過酸化水素を使用した場合の、1 分、5 分及び 30 分間に生産される過酢酸濃度を、それぞれ表 7 及び表 8 に示す。

【0289】

10

20

30

【表11】

表7: 100 mMのトリアセチン、250 mMの過酸化水素及び50 μg/mLのサモトガ・ネアポリタナのペルヒドロラーゼを含有するE. コリKLP18/pSW196の加熱処理抽出物総タンパク質を用いた場合の、過酢酸(PAA)濃度の重炭酸緩衝液の濃度への依存性

加熱抽出物 総タンパク質 (μgタンパク質/mL)	NaHCO ₃ 緩衝液 (mM)	初期 pH	PAA (ppm)		pH		PAA (ppm)		pH	
			1分	1分	5分	5分	30分	30分	10分	20分
0	2.5	8.1	139	8.0	385	7.5	610	7.2		
50	2.5	8.1	1037	6.8	2655	6.0	3503	5.8		
0	1.0	7.5	88	7.5	206	7.5	453	7.0		
50	1.0	7.0	1042	7.0	2334	5.5	2384	5.0		
0	5.0	6.5	84	6.5	163	6.5	296	6.0		
50	5.0	6.5	866	6.5	1894	5.5	1931	5.0		
0	2.5	6.5	48	5.5	129	5.5	210	5.5		
50	2.5	6.5	718	5.5	1242	5.0	1179	5.0		
0	1.0	6.0	15	6.0	115	6.0	194	5.5		
50	1.0	6.0	511	5.0	610	5.0	608	5.0		
0	0	5.0	41	5.0	63	5.0	79	5.0		
50	0	5.0	161	5.0	152	5.0	180	5.0		

【0290】

【表12】

表8: 100 mMのトリアセチン、100 mMの過酸化水素及び50 μg/mLのサモトガ・ネアポリタナのペルヒドロラーゼを含有するE. コリKLP18/pSW196の加熱処理抽出物総タンパク質を用いた場合の、過酢酸(PAA)濃度の重炭酸緩衝液の濃度への依存性

加熱抽出物 総タンパク質 (μgタンパク質/mL)	NaHCO ₃ 緩衝液 (mM)	初期 pH	PAA (ppm)		pH		PAA (ppm)		pH	
			1分	1分	5分	5分	30分	30分	30分	40分
0	2.5	8.1	74	8.0	220	7.8	383	7.5		
50	2.5	8.1	497	7.5	1319	6.5	2095	6.0		
0	1.0	8.1	55	7.5	122	7.0	226	7.0		
50	1.0	8.1	418	6.2	1035	6.0	1633	5.3		
0	5.0	6.5	36	6.5	119	6.5	126	6.0		
50	5.0	6.5	377	6.0	955	5.5	989	5.0		
0	2.5	6.5	20	6.3	33	6.0	73	6.0		
50	2.5	6.5	291	5.5	510	5.3	488	5.0		
0	1.0	6.0	2	6.0	15	5.8	103	5.5		
50	1.0	6.0	167	5.0	152	5.0	176	5.0		
0	0	5.0	0	5.0	15	5.0	31	5.0		
50	0	5.0	0	5.0	29	5.0	11	5.0		

【0291】

【実施例 13】

緩衝液の濃度を用いたサーモトガ・マリチマMSB8のペルヒドロラーゼによる過酢酸生産の制御

サーモトガ・マリチマMSB8由来のペルヒドロラーゼを発現する形質転換体 (KLP 18/pSW207) の細胞抽出物は、ジチオスレイトール (1 mM) を含む 0.05 M のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した細胞ペースト (20 質量% 湿細胞質量) の懸濁液を、16,000 psi (~110 MPa) の作動圧力を有するフレンチプレスを 2 回通すことにより調製した。次に、粗抽出物を、20,000 × g で遠心分離して細胞残屑を除き、総可溶性タンパク質をアッセイする清澄な細胞抽出物を作製した (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich catalog # BCA1-KT) 10

。清澄になった抽出物は、75 で 20 分間加熱し、その後、直ちに氷 / 水浴で冷却した。得られた混合物は、遠心分離して沈澱したタンパク質を除去し、上清をまとめ、これまでと同様に総可溶性タンパク質をアッセイした。上清の SDS-PAGE により、ペルヒドロラーゼは少なくとも 85 ~ 90 % 純粋であることが示された。上清はドライアイスで凍結させ、-80 で保存した。

【0292】

トリアセチン、過酸化水素及び加熱処理し、遠心分離した細胞抽出物の上清 (上記のように調製) を含む反応 (総量 2 mL) は、表 9 及び 10 に示した重炭酸ナトリウム緩衝液濃度を用い、25 で実施した。それぞれの反応条件に対する対照反応を実施し、添加された抽出物タンパク質の非存在下で、過酸化水素によるトリアセチンの化学的ペルヒドロリシスによって生成される過酢酸の濃度を測定した。反応混合物中の過酢酸の濃度の測定は、Karstら (上記) によって説明された方法に従って行った。それぞれ 250 mM 又は 100 mM の過酸化水素を使用した場合の、1 分、5 分及び 30 分間に生産される過酢酸濃度を、それぞれ表 9 及び表 10 に示す。 20

【0293】

【表 13】

表 9 : 100 mM のトリアセチン、250 mM の過酸化水素及び 50 μg/mL のサーモトガ・マリチマMSB8 のペルヒドロラーゼを含有する E. コリ KLP18/pSW207 の加熱処理抽出物総タンパク質を用いた場合の、過酢酸 (PAA) 濃度の重炭酸緩衝液の濃度への依存性 30

加熱抽出物 総タンパク質 (μgタンパク質 /mL)	NaHCO ₃ 緩衝液 (mM)	初期 pH	PAA (ppm)		PAA (ppm)		PAA (ppm)	
			1分	1分	5分	5分	30分	30分
0	25	8.1	144	8.0	324	8.0	759	7.2
50	25	8.1	848	7.0	2342	6.5	3251	6.0
0	10	7.5	182	7.0	194	7.0	454	6.5
50	10	7.0	804	6.3	1951	5.5	2698	5.0
0	5.0	6.5	84	6.5	163	6.5	296	6.0
50	5.0	6.5	735	6.0	1825	5.7	2222	5.0
0	2.5	6.5	48	5.5	129	5.5	210	5.5
50	2.5	6.5	817	5.5	1758	5.3	1748	5.0
0	1.0	6.0	15	6.0	115	6.0	194	5.5
50	1.0	6.0	690	5.0	980	5.0	981	5.0
0	0	5.0	0	5.0	75	5.0	63	5.0
50	0	5.0	233	5.0	290	5.0	289	5.0

【0294】

10

20

30

40

50

【表14】

表10: 100 mMのトリアセチン、100 mMの過酸化水素及び50 μg/mLのサーモトガ・マリチマMSB8のペルヒドロラーゼを含有するE.コリKLP18/pSW207の加熱処理抽出物総タンパク質を用いた場合の、過酢酸(PAA)濃度の重炭酸緩衝液の濃度への依存性

加熱抽出物 総タンパク質 (μgタンパク質 /mL)	NaHCO ₃ 緩衝液 (mM)	初期 pH	PAA	pH	PAA	pH	PAA	pH
			(p p m) 1分	1分	(p p m) 5分	5分	(p p m) 30分	30分
0	2.5	8.1	9.5	8.0	223	8.0	456	7.5
50	2.5	8.1	465	7.5	1369	6.8	2217	6.0
0	1.0	8.1	7.3	7.5	138	7.5	222	7.0
50	1.0	8.1	407	6.5	1075	6.0	1763	5.3
0	5.0	6.5	4.1	6.5	8.3	6.5	174	6.0
50	5.0	6.5	330	6.0	972	5.7	1323	5.0
0	2.5	6.5	2.0	6.3	3.3	6.0	7.3	6.0
50	2.5	6.5	319	5.7	755	5.3	710	5.0
0	1.0	6.0	2	6.0	1.5	5.8	103	5.5
50	1.0	6.0	238	5.0	388	5.0	361	5.0
0	0	5.0	1.2	5.0	1.6	5.0	3.1	5.0
50	0	5.0	125	5.0	121	5.0	105	5.0

【0295】

〔実施例14〕

緩衝液、反応物質及びペルヒドロラーゼ濃度の選択によるサーモトガ・マリチマMSB8ペルヒドロラーゼによる過酢酸生産の制御

トリアセチン(100 mM)、過酸化水素(100 mM又は250 mM)及びサーモトガ・マリチマMSB8由来のペルヒドロラーゼを発現するE.コリ形質転換体(KLP18/pSW207)から調製した細胞抽出物を加熱処理し、遠心分離した細胞抽出物の上清(35~100 μgの総加熱処理抽出物タンパク質/mL、実施例13で説明したように調製)を含む反応(総量10 mL)は、クエン酸ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 6.5)、又は重炭酸ナトリウム緩衝液(1 mM~5 mM、表12に記載したような初期pH)、又は緩衝剤を添加しない水中で、25°Cで実施した。それぞれの反応条件に対する対照反応を実施し、添加された抽出物タンパク質の非存在下で、過酸化水素によるトリアセチンの化学的ペルヒドロリシスによって生成される過酢酸の濃度を測定した。反応混合物中の過酢酸の濃度の測定は、Karstら(上記)によって説明された方法に従って行った。所定の反応時間における生成した過酢酸の濃度を表11に、そしてそれぞれの反応時間に対応する反応pHを表12に示す。

【0296】

10

20

30

40

【表15】

表11：サーモトガ・マリチマMSB8のペルヒドロラーゼを含有するE.コリKLP18/pSW207の加熱処理抽出物総タンパク質由来のペルヒドロラーゼの存在下又は非存在下で、トリアセチル(100mM)及び過酸化水素(100mM又は250mM)を反応させた場合の、経時的な過酢酸(PAA)濃度の、緩衝液、ペルヒドロラーゼ及び過酸化水素の濃度への依存性

緩衝液、濃度	H ₂ O ₂ (mM)	総タンパク質 (μg/mL)	PAA (ppm) 1分	PAA (ppm) 5分	PAA (ppm) 30分	PAA (ppm) 2時間	PAA (ppm) 18時間	
クエン酸、50mM	100	0	155	0	0	119	522	10
クエン酸、50mM	100	50	409	892	2001	2254	1937	
重炭酸、5mM	100	0	64	115	269	369	419	
重炭酸、5mM	100	50	410	1088	1496	1423	1419	
重炭酸、1mM	250	0	0	22	229	280	258	
重炭酸、1mM	250	50	624	1060	1090	1063	1021	
重炭酸、1mM	250	0	18	105	236	275	149	20
重炭酸、1mM	250	35	467	1047	1041	1014	917	
重炭酸、2.5mM	100	0	54	38	156	293	346	
重炭酸、2.5mM	100	50	256	722	976	887	855	
重炭酸、1mM	100	0	28	78	141	204	164	
重炭酸、1mM	100	75	434	494	608	673	576	
重炭酸、1mM	100	100	449	667	643	703	613	
水(緩衝剤不含)	250	0	13	71	71	33	45	
水(緩衝剤不含)	250	75	512	535	533	472	448	
水(緩衝剤不含)	250	100	576	668	654	618	543	

30

【0297】

【表16】

表12: サーモトガ・マリチマMSB8のペルヒドロラーゼを含有するE.コリKLP18/pSW207の加熱処理抽出物総タンパク質由来のペルヒドロラーゼの存在下又は非存在下で、トリアセチン(100mM)及び過酸化水素(100mM又は250mM)を反応させた場合の、経時的な反応pHの、緩衝液、ペルヒドロラーゼ及び過酸化水素の濃度への依存性(表11に記載された反応より)

緩衝液、濃度	H ₂ O ₂ (mM)	総タンパク質 (μg/mL)	初期 pH	pH 1分	pH 5分	pH 30分	pH 2時間	pH 18時間	
クエン酸、50mM	100	0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	10
クエン酸、50mM	100	50	6.5	6.5	6.5	6.2	6.0	6.0	
重炭酸、5mM	100	0	6.5	6.5	6.5	6.2	6.0	5.0	
重炭酸、5mM	100	50	6.5	6.0	5.5	5.0	5.0	5.0	
重炭酸、1mM	250	0	6.0	6.0	6.0	5.5	5.0	5.0	
重炭酸、1mM	250	50	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
重炭酸、1mM	250	0	6.0	6.0	6.0	5.5	5.0	5.0	
重炭酸、1mM	250	35	6.0	5.5	5.0	5.0	5.0	5.0	
重炭酸、2.5mM	100	0	6.5	6.5	6.5	6.0	5.5	5.0	20
重炭酸、2.5mM	100	50	6.5	5.7	5.0	5.0	5.0	5.0	
重炭酸、1mM	100	0	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0	4.5	
重炭酸、1mM	100	75	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.5	
重炭酸、1mM	100	100	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.5	
緩衝剤無添加	250	0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.5	
緩衝剤無添加	250	75	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.5	
緩衝剤無添加	250	100	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.5	

【0298】

〔実施例15〕

30

初期反応pHを利用したペルヒドロラーゼによる過酢酸生産の制御

バチルス・プミルスPS213(KLP18/pSW195)、サーモトガ・マリチマMSB8(KLP18/pSW207)、サーモトガ・ネアポリタナ(KLP18/pSW196)、又はバチルス・ズブチリスATCC(登録商標)31954(商標)(KLP18/pSW194)由来のペルヒドロラーゼを発現する形質転換体の細胞抽出物は、ジチオスレイトール(1mM)を含む0.05Mのリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁した細胞ペースト(20質量%湿細胞質量)の懸濁液を、16,000psi(~110Mpa)の作動圧力を有するフレンチプレスを2回通すことにより調製した。次に、粗抽出物を、20,000×gで遠心分離して細胞残屑を除き、総可溶性タンパク質をアッセイする清澄な細胞抽出物を作製した(Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich catalog # BCA1-KT)。上清は、ドライアイスで凍結させ、-80で保存した。

【0299】

トリアセチン、過酸化水素及び遠心分離した細胞抽出物の上清(上記のように調製)の50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(初期pHが7.2又は6.5)中での反応(総体積10mL)は、25で実施した。それぞれの反応条件に対する対照反応を実施し、添加した抽出物タンパク質の存在なしで、過酸化水素によるトリアセチンの化学的ペルヒドロリシスによって生成される過酢酸の濃度を測定した(データの表示はない)。反応混合物中の過酢酸の濃度の測定は、Karstら(上記)によって説明された方法に従って行った。

1分、5分及び30分までに生産された過酢酸の濃度を表13に示す。

40

50

【0300】

【表17】

表13: E. コリKLP18/pSW195 (バチルス・ブミルスPS213のペルヒドロラーゼ)、E. コリKLP18/pSW207 (サモトガ・マリチマMSB8のペルヒドロラーゼ)、E. コリKLP18/pSW196 (サモトガ・ネアポリタナのペルヒドロラーゼ)、又はE. コリKLP18/pSW194 (バチルス・ズブチリスATCC (登録商標) 31954 (商標) のペルヒドロラーゼ) 由来の抽出物総タンパク質を0.050mg/mLで使用した場合の、25°Cにおける過酢酸 (PAA) 濃度の、クエン酸ナトリウム緩衝液 (50mM、初期pHが7.2又は6.5) 中の初期反応pHへの依存性

10

ペルヒドロラーゼ	初期pH	トリアセチン (mM)	H ₂ O ₂ (mM)	PAA 1分 (ppm)	PAA 5分 (ppm)	PAA 30分 (ppm)
B. ブミルスPS213	7.2	100	250	465	1170	2525
B. ブミルスPS213	6.5	100	250	281	652	1984
B. ブミルスPS213	7.2	100	100	160	322	1010
B. ブミルスPS213	6.5	100	100	170	310	830
T. ネアポリタナ	7.2	100	250	1790	2860	3820
T. ネアポリタナ	6.5	100	250	434	1260	2016
T. ネアポリタナ	7.2	100	100	798	1748	2500
T. ネアポリタナ	6.5	100	100	221	607	1925
T. マリチマMSB8	7.2	100	250	635	1725	3565
T. マリチマMSB8	6.5	100	250	95	742	2446
T. マリチマMSB8	7.2	100	100	210	610	1995
T. マリチマMSB8	6.5	100	100	53	279	1540
B. ズブチリスATCC 31954	7.2	100	250	2430	2820	4400
B. ズブチリスATCC 31954	6.5	100	250	1725	2570	3712
B. ズブチリスATCC 31954	7.2	100	100	1040	1240	2395
B. ズブチリスATCC 31954	6.5	100	100	691	1286	1880

20

30

【配列表】

0005504268000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ロバート・ディコージモ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19317-9720. チャップズフォード. マスターズウェイ 1
607

(72)発明者 マーク・スコット・ペイン

アメリカ合衆国デラウェア州 19808. ウィルミントン. オールドリンデンヒルロード 4617

(72)発明者 ユージニア・コスター・ハン

アメリカ合衆国ニュージャージー州 08069. カーニーズポイント. ハーディングハイウェイ 2
67

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 國際公開第 2007/106293 (WO, A1)

米国特許出願公開第 2008/0176299 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 P 7/40

A 23 L 3/3508

C 11 D 3/00

C 12 N 15/09

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

BIOSIS / MEDLINE / WPIDS / WPIX (STN)