

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-526253
(P2014-526253A)

(43) 公表日 平成26年10月6日(2014.10.6)

(51) Int.Cl.

C 12 P 19/04 (2006.01)

F 1

C 12 P 19/04

テーマコード(参考)

4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2014-529959 (P2014-529959)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月10日 (2012.9.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月4日 (2014.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/054521
 (87) 国際公開番号 WO2013/036968
 (87) 国際公開日 平成25年3月14日 (2013.3.14)
 (31) 優先権主張番号 61/532,714
 (32) 優先日 平成23年9月9日 (2011.9.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 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】ポリ(α1, 3グルカン)の高力価產生

(57) 【要約】

スクロースからのポリ(1, 3グルカン)の酵素による調製のための方法が、開示される。唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)由来のグルコシルトランスフェラーゼ酵素(gt f J)は、スクロースをフルクトースおよびポリ(1, 3グルカン)に変換するために使用される。gt f 酵素の副産物であるフルクトースを絶え間なく除去し、したがって、ポリ(1, 3グルカン)リットルを増加させる半透膜の適用が、開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

半透膜によって分離される 2 つのチャンバーを含む反応系において、ポリ(1,3 グルカン)を产生するための方法であって、

a) 第 1 のチャンバーが、

i) スクロースと、

i i) 少なくとも 1 つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素と
を含む酵素反応溶液を含み、

b) 第 2 のチャンバーが、前記酵素反応溶液に接する半透膜によって、前記第 1 のチャンバーから分離され、前記半透膜が、フルクトースに対して透過性であるが、ポリ(1,3 グルカン)に対して不透過性であり、前記第 1 のチャンバー内部に、ポリ(1,3 グルカン)および前記少なくとも 1 つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素を保持しながら、フルクトースおよび他の低分子量成分の絶え間ない除去を促進する、方法。
10

【請求項 2】

前記酵素反応溶液が、20 ~ 25 の温度で維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 つのプライマーをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記半透膜が、1 リットル当たり 30 グラム ~ 1 リットル当たり 200 グラムの範囲にわたる濃度まで、ポリ(1,3 グルカン)の蓄積を促進する、請求項 1 に記載の方法。
20

【請求項 5】

前記半透膜が、12,000 ~ 100,000 ダルトンの分画分子量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記半透膜が、透析チューブである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素が、連鎖球菌に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素が、gtfJ、gtfB、gtfC、および gtfI からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。
30

【請求項 9】

前記グルコシルトランスフェラーゼ酵素が、唾液連鎖球菌 (Streptococcus salivarius) 由来のものである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

唾液連鎖球菌 (Streptococcus salivarius) の前記グルコシルトランスフェラーゼ酵素が、gtfJ である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つのプライマーが、デキストランである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 12】

前記グルコシルトランスフェラーゼ酵素が、プライマー非依存性の酵素である、請求項 1 に記載の方法。
40

【請求項 13】

前記グルコシルトランスフェラーゼ酵素が、プライマー依存性の酵素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

1 つを超えるグルコシルトランスフェラーゼ酵素が、前記酵素反応溶液中に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つを超えるグルコシルトランスフェラーゼ酵素が、少なくとも 1 つのプライマー
50

依存性の酵素および少なくとも 1 つのプライマー非依存性の酵素の混合物を含む、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、構造多糖の產生の分野に関する。詳細には、本発明は、酵素反応を介しての、ポリ(1,3グルカン)の產生に関する。より詳細には、本発明は、酵素反応の間に形成されるポリ(1,3グルカン)の力価を増加させることに関する。

【背景技術】

【0002】

自然のプロセスによって(1,4)グリコシド連結を介してグルコースから形成される多糖であるセルロース(非特許文献1)は、それに由来する有用な産物が多くあることの結果として、纖維として商業的に有名になった。特に、天然に存在するセルロースの高純度形態である綿は、纖維素材への応用におけるその有益な特質についてよく知られている。

【0003】

セルロースは、溶液中で十分な鎖伸長および骨格剛性を示し、液状の結晶性の溶液を形成する(特許文献1)。しかしながら、十分な多糖鎖伸長は、主として、(1,4)連結多糖においてこれまで実現してきた。グルカン多糖ファミリーにおけるその骨格幾何学的配置からのあらゆる著しいずれは、規則正しいリオトロピック(lyotropic)相の形成に必要とされる比未満に、分子のアスペクト比を低下させる。そのうえ、綿およびレーヨンなどの重要な市販のセルロース系纖維は、土地利用および環境上の痕跡に関して、持続性についての問題をますます提起していることがよく知られている。

【0004】

そのため、再生可能な資源から低成本の構造材料を產生することが現在、主として重要視されているという理由で、フィルム、纖維、および樹脂において実用性を有する、他のグルコースベースの多糖を発見することは、非常に望ましいことである。そのうえ、そのようなポリマーは、それらの全ライフサイクルを通じて、環境上やさしい材料を提供する。

【0005】

(1,3)グリコシド連結を有することによって特徴付けられるグルカンポリマーであるポリ(1,3グルカン)は、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)から単離されたグルコシルトランスフェラーゼ(gtfJ)酵素とスクロースの水溶液を接触させることによって単離された(非特許文献2)。グルカンは、グリコシド結合によって連結されたD-グルコース単量体から構成される多糖を指す。ポリ(1,3グルカン)から調製されるフィルムは、150までの温度に耐え、(1,4)連結多糖から得られるポリマーにまさる利点をもたらした(非特許文献3)。

【0006】

特許文献2は、ヘキソース単位を含む多糖纖維の調製を開示し、ポリマー内のヘキソース単位の少なくとも50%は、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)のグルコシルトランスフェラーゼ酵素gtfJを使用して、(1,3)グリコシド連結を介して連結された。開示されるポリマーは、それが、溶媒または溶媒を含む混合物中で臨界濃度超で溶解された場合、液状の結晶性の溶液を形成した。この溶液から、纖維素材において使用するに非常に適した、切れ目がなく、強く、綿様の纖維が、糸され、誘導体化形態でまたは非誘導体化(再生)形態のいずれかとして使用された。特許文献2におけるポリ(1,3グルカン)は、バッヂプロセスにおいて作製され、ポリ(1,3グルカン)力価は、典型的に、1リットルの反応器容積当たり、25グラム未満のポリ(1,3グルカン)であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【0007】

【特許文献1】米国特許第4,501,886号明細書

【特許文献2】米国特許第7,000,000号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Applied Fiber Science, F. Happy, Ed., Chapter 8, E. Atkins, Academic Press, New York, 1979

【非特許文献2】Simpson et al., Microbiology, 141: 1451-1460, 1995

10

【非特許文献3】Ogawa et al., Fiber Differentiation Methods, 47: 353-362, 1980

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

酵素反応によって形成されるポリ(1,3グルカン)の力価を増加させるための方法を開発することは、望ましいものとなり得る。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、繊維、フィルム、およびパルプにおいて応用するための、再生可能な原材料からのポリ(1,3グルカン)の产生のための方法である。ポリマーは、触媒としての組換えグルコシルトランスフェラーゼ(gtfJ)酵素および基質としてのスクロースを使用して、ワンステップ酵素反応において直接作製される。

20

【0011】

一態様において、開示される本発明が、半透膜によって分離される2つのチャンバーを含む反応系において、ポリ(1,3グルカン)を产生するための方法であって、

a) 第1のチャンバーが、

i) スクロースと、

ii) 少なくとも1つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素と
を含む酵素反応溶液を含み、

30

b) 第2のチャンバーが、酵素反応溶液に接する半透膜によって、第1のチャンバーから分離され、半透膜が、フルクトースおよび他の低分子量成分に対して透過性であるが、ポリ(1,3グルカン)に対して不透過性であり、第1のチャンバー内部に、ポリ(1,3グルカン)および少なくとも1つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素を保持しながら、フルクトースおよび他の低分子量成分の絶え間ない除去を容易にする、方法である。

【0012】

他の態様において、開示される本発明は、1リットル当たり30~200グラムの力価のポリ(1,3グルカン)が、少なくとも1つのグルコシルトランスフェラーゼ酵素によってスクロースから產生される方法である。

40

【0013】

DNA配列の説明

配列番号1は、大腸菌における発現のためにコドン最適化された、成熟グルコシルトランスフェラーゼの合成遺伝子の配列である。

【0014】

配列番号2は、プラスミドpMP52についてのDNA配列である。

【0015】

配列番号3は、唾液連鎖球菌(Streptococcus salivarius)(ATCC 25975)由来の成熟グルコシルトランスフェラーゼ(gtfJ酵素; EC 2.4.1.5; GENBANK(登録商標)AAA26896.1)のDNA配列

50

である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

ポリ(1,3グルカン)は、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)のgtfJ酵素を使用して、スクロースなどのような再生可能な資源から酵素により产生することができる、低コストになり得るポリマーである。(1,3)グリコシド連結を有するヘキソース単位を含む、選択されたポリマーは、ポリマーがある条件下で溶媒中に溶解された場合に、規則正しい液状の結晶性の溶液を形成することができる事が示された。(米国特許第7,000,000号明細書)。さらに、そのような溶液は、紡糸され、切れ目がなく高強度の綿様の纖維にすることができる。米国特許第7,000,000号明細書において、バッヂ酵素反応は、gtfJによる、スクロースの、ポリ(1,3グルカン)への変換のために用いられ、副産物であるフルクトースおよびロイクロースが、反応器中に蓄積した。蓄積されたフルクトースは、酵素反応の間にグルコシル成分と競合する事が知られているので、ポリ(1,3グルカン)への利用可能なグルコースの変換は、その結果として妨げられ、したがって、単位反応器容積(unit reactor volume)当たりの所望の産物の最終力値を制限してしまう。

【0017】

本明細書において使用される用語「ロイクロース」は、(1,5)結合によって連結された、グルコースおよびフルクトースからなる二糖を指す。

【0018】

本明細書において使用される用語「グルコシルトランスフェラーゼ(gtf)酵素」は、ポリ(1,3グルカン)を合成するためにスクロースのグリコシド結合の高自由エネルギーを利用する、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)などのような口腔ストレプトコッカスによって分泌される酵素を指す。グリコシド結合は、2つの単糖をつないで、二糖を形成することができる。グリコシド結合は、または立体配置をとることができ、たとえば、(1,2)、(1,3)、(1,4)、(1,6)、(1,2)、(1,3)、(1,4)、または(1,6)連結を生成することができる。本明細書において使用される用語「(1,3)グリコシド連結」は、隣接するグルコース環どうしの環炭素1および3を通してグルコース分子を互いにつなぐ一種の共有結合を指す。

【0019】

本明細書において使用される用語「ポリ(1,3グルカン)」は、(1,3)グリコシド連結を介してグルコース単位を連結することから結果として生じる多糖分子から得られる高分子量線状高分子を指す。

【0020】

本発明は、1つまたは複数のgtf酵素を使用する酵素反応においてスクロースから産生される多糖、ポリ(1,3グルカン)の力値を増加させるための方法に関する。用語「酵素反応」は、gtf酵素によって実行される反応を指す。本発明の「酵素反応溶液」は、一般に、スクロースをポリ(1,3グルカン)に変換するために、スクロースおよび場合により1つまたは複数のプライマーを含むバッファー溶液中に少なくとも1つのgtf酵素を含む反応混合物を指す。

【0021】

本発明において使用されるグルコシルトランスフェラーゼ酵素は、任意のgtf酵素とすることができます。使用されるgtf酵素は、任意の連鎖球菌由来ものとすることができます。適したgtf酵素は、たとえば、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)のgtfJ、ミュータンス菌(*Streptococcus mutans*)由来のgtfBおよびgtfC、ならびにストレプトコッカス・ダウネイ(*Streptococcus downeii*)由来のgtfIとすることができます。特に、ストレプトコッカスは、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)とすることができます。より詳細には、gtf酵素は、唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)とすることができます。

10

20

30

40

50

c o c c u s s a l i v a r i u s) の g t f J (E . C . 2 . 4 . 1 . 5) 酵素とすることができる。

【 0 0 2 2 】

一実施形態において、酵素反応溶液が、本明細書において記載される 1 つの g t f 酵素のみを含むことができる。他の実施形態において、酵素反応溶液が、1 種類を超える g t f 酵素の組み合わせを含むことができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の目的のために、十分な量の g t f J 酵素は、実施例において記載されるように、g t f J の產生のために組換え大腸菌株を使用して產生することができる。コドン最適化遺伝子の設計および大腸菌における発現のための方法は、当技術分野においてよく知られている。

10

【 0 0 2 4 】

組換え微生物の増殖のための方法は、当技術分野においてよく知られている。本発明の反応を実行するための、所望の g t f 酵素を発現する組換え微生物は、たとえば、くぼみ (i n d e n t a t i o n) ありおよびなしの様々な種類のフラスコ、密閉し、かつ温度をコントロールすることができる任意のオートクレーブ可能な容器、または任意の種類の発酵槽などのような、任意の容器中で増殖させることができる。一実施形態において、本発明におけるポリ (1 , 3 グルカン) 產生のための g t f J 酵素の產生が、発酵槽において、g t f J 酵素を発現する組換え大腸菌 MG 1655 / p M P 52 を増殖させることによって実現することができる。

20

【 0 0 2 5 】

本発明において、スクロースの、ポリ (1 , 3 グルカン) への変換のために触媒として使用される唾液連鎖球菌 (*S t r e p t o c o c c u s s a l i v a r i u s*) の g t f J 酵素は、プライマー依存性の g t f 酵素である。本出願において言及されるプライマー依存性の g t f 酵素は、ポリ (1 , 3 グルカン) 合成の間に酵素のためのプライマーとして作用するための、酵素反応溶液中の開始分子の存在を必要とする g t f 酵素を指す。したがって、「プライマー」は、用語が本明細書において使用されるように、プライマー依存性のグルコシルトランスフェラーゼのためのイニシエータとして作用することができる任意の分子を指す。他の多くのグルコシルトランスフェラーゼは、プライマー非依存性の酵素である。プライマー非依存性の酵素は、反応を実行するためにプライマーの存在を必要としない。本発明の目的のために、プライマー非依存性の酵素および / またはプライマー依存性の g t f 酵素のいずれかまたは両方は、ポリ (1 , 3 グルカン) 合成の間に同じ酵素反応系において使用することができる。

30

【 0 0 2 6 】

g t f J は、プライマー依存性の酵素である。本発明において、複雑な分岐グルカンであるデキストランを、g t f J 酵素のためのプライマーとして使用した。g t f J は、プライマー依存性の酵素であるが、この酵素による、スクロースの、ポリ (1 , 3 グルカン) への変換はまた、プライマーの非存在下においても行うことができる。

【 0 0 2 7 】

唾液連鎖球菌 (*S t r e p t o c o c c u s s a l i v a r i u s*) の g t f J 酵素による、ポリ (1 , 3 グルカン) の產生は、その副産物であるフルクトースによって阻害される。フルクトースが、酵素反応溶液中に蓄積すると、フルクトースは、おそらく、利用可能なグルコシル成分と競合することによって、酵素によるポリ (1 , 3 グルカン) の產生を阻害し得、これは、二糖であるロイクロースの形成をもたらす。本発明において、フルクトースの g t f J に対する影響を低下させるために、酵素反応溶液中のフルクトースは、絶え間なく除去し、酵素反応溶液において阻害性のレベルまでそれが蓄積するのを予防することができる。本発明の目的のために、反応系は、1 つまたは複数の g t f 酵素、1 つまたは複数のプライマー、およびスクロースを含む、第 1 のチャンバー中に含有される酵素反応溶液を、第 2 のチャンバー中に含有される、包囲バッファーから分離する半透膜を含むことができる。本明細書において使用される用語「チャンバー」は、酵素

40

50

反応溶液または酵素反応溶液の産物を保持することができる任意の容器を指す。チャンバーは、ガラス、プラスチック、金属、フィルム、膜、または酵素反応溶液を保持することができる任意の他の種類の不活性材料から作製することができる。本明細書において使用される用語「半透膜」は、いくつかの他の分子を保持しながら、拡散によって、ある分子またはイオンの通過を可能にするであろう膜を指す。本質的に、酵素およびポリ(1,3グルカン)を保持しながら、フルクトースおよび他の低分子量成分が通過するのを可能にするであろう、12,000~100,000ダルトンの分子カットオフを有する任意の半透膜は、本発明における使用に適し得る。本明細書において使用される用語「他の低分子量成分」は、酵素反応溶液中に存在し得る、1000ダルトン未満の分子量を有する様々な化合物を指す。第1のチャンバー中に含有される酵素反応溶液からの副産物フルクトースの除去により、ロイクロース形成を低下させることができる。本発明の一実施形態において、透析チューブが、酵素反応溶液から副産物フルクトースを除去するために半透膜として使用することができる。

10

【0028】

本発明については、酵素反応溶液は、20~25に維持することができる。

【0029】

本発明は、繊維、フィルム、およびパルプを含む、様々な応用のために、容易に再生可能なスクロース原材料から経済的に得ることができる低コスト材料としてのポリ(1,3グルカン)の產生を提供する。特に、ポリ(1,3グルカン)繊維は、たとえば、綿および再生セルロース繊維の実用的な代わりになり、前述の在任者(*incumbent*)と比較して、最小限の環境に対する打撃しか有さず、かつ優れた持続性を有する、新しい織物用繊維がもたらされるであろうということが期待される。

20

【実施例】

【0030】

本明細書において開示される組成物および方法の有利な特質および効果は、下記に記載される実施例から、より十分に評価することができる。実施例が基礎を置く方法の実施形態は、代表的なものに過ぎず、本発明を例証するためのそれらの実施形態の選択は、これらの実施例において記載されない材料、構成成分、反応物、条件、仕様、ステップ、もしくは技術が、これらの方法の実施に適さないということまたはこれらの実施例において記載されない主題が、添付される請求項およびその均等物の範囲から除外されるということを示すものではない。

30

【0031】

材料

透析チューブ(Spectrapor 25225-226、12000分子量カットオフ)は、VWR(Radnor, PA)から購入した。

【0032】

デキストランおよびエタノールは、Sigma Aldrichから購入した。スクロースは、VWRから購入した。

【0033】

Suppressor 7153消泡剤は、Cognis Corporation(Cincinnati, OH)から購入した。

40

【0034】

他のすべての化学物質は、そのような化学物質について、一般に利用されている供給者から購入した。

【0035】

シード培地

発酵槽のためのスターター培養物を増殖させるために使用するシード培地は、酵母抽出物(Amberlyx 695、1リットル当たり5.0グラム(g/L))、K₂HPO₄(10.0g/L)、KH₂PO₄(7.0g/L)、クエン酸ナトリウム二水和物(1.0g/L)、(NH₄)₂SO₄(4.0g/L)、MgSO₄七水和物(1.0g/L)

50

L)、およびクエン酸鉄アンモニウム(0.10g/L)を含有した。培地のpHは、5N NaOHまたはH₂SO₄を使用して、6.8に調節し、培地は、フラスコ中で滅菌した。滅菌後、添加物として、グルコース(50%w/w溶液の20mL/L)およびアンピシリン(25mg/mL原液の4mL/L)を含んだ。

【0036】

発酵槽培地

発酵槽において使用する増殖培地は、KH₂PO₄(3.50g/L)、FeSO₄七水和物(0.05g/L)、MgSO₄七水和物(2.0g/L)、クエン酸ナトリウム二水和物(1.90g/L)、酵母抽出物(Ambrex 695, 5.0g/L)、Suppressor 7153消泡剤(1リットル当たり0.25ミリリットル(mL/L))、NaCl(1.0g/L)、CaCl₂二水和物(10g/L)、およびNIT微量元素溶液(10mL/L)を含有した。NIT微量元素溶液は、クエン酸一水和物(10g/L)、MnSO₄水和物(2g/L)、NaCl(2g/L)、FeSO₄七水和物(0.5g/L)、ZnSO₄七水和物(0.2g/L)、CuSO₄五水和物(0.02g/L)、およびNaMoO₄二水和物(0.02g/L)を含有した。滅菌後、添加物として、グルコース(50%w/w溶液の12.5g/L)およびアンピシリン(25mg/mL原液の4mL/L)を含んだ。

【0037】

実施例1

グルコシルトランスフェラーゼ(gt f J)酵素発現株の構築

GENBANK(登録商標)(受入M64111.1)において報告される唾液連鎖球菌(*Streptococcus salivarius*)(ATCC 25975)由来の成熟グルコシルトランスフェラーゼ酵素(gt f J; EC 2.4.1.5)をコードする遺伝子は、大腸菌における発現のために最適化したコドンを使用して合成した(DNA 2.0, Menlo Park, CA)。その核酸産物(配列番号:1)は、pJ express 404(登録商標)(DNA 2.0, Menlo Park CA)の中にサブクローニングし、pMP52(配列番号:2)として同定されるプラスミドが生成された。プラスミドpMP52は、大腸菌MG1655(ATCC 47076^T)を形質転換するために使用し、MG1655/pMP52として同定される株が生成された。グルコシルトランスフェラーゼ酵素発現株の構築に使用される手順はすべて、当技術分野においてよく知られており、過度の実験作業を伴わないで当業者らによって実行することができる。

【0038】

実施例2

発酵における組換えgt f Jの产生

発酵槽における組換えgt f J酵素の产生は、実施例1において記載されるように構築した、gt f J酵素を発現する大腸菌株MG1655/pMP52のプレシード培養物を調製することによって開始した。10mL一定分量のシード培地は、125mL使い捨てバッフル付きフラスコの中に追加し、20%グリセロール中、大腸菌MG1655/pMP52の1.0mL培養物を接種した。この培養物は、3時間、300毎分回転数(rpm)で振盪しながら、37で増殖させた。

【0039】

発酵槽を始動させるためのシード培養物は、2L振盪フラスコに0.5Lのシード培地を装填することによって調製した。1.0mLのプレシード培養物は、フラスコ中0.5Lシード培地の中に無菌的に移し、5時間、37および300rpmで培養した。シード培養物は、光学濃度550nm(OD₅₅₀)>2で、37の、上記に記載される8Lの発酵槽培地を含有する14L発酵槽(Braun, Perth Amboy, NJ)に移した。

【0040】

大腸菌MG1655/pMP52の細胞を発酵槽において増殖させ、培地中のグルコ-

10

20

30

40

50

ス濃度が 0.5 g / L まで減少したら、グルコース供給 (1% w / w MgSO₄ · 7H₂O を含有する 50% w / w グルコース溶液) を開始した。供給は、毎分 0.36 グラムの供給量 (g 供給量 / 分) で始め、毎時、それぞれ、0.42、0.49、0.57、0.66、0.77、0.90、1.04、1.21、1.41、1.63、1.92、2.2 g 供給量 / 分まで次第に増加させた。速度は、その後一定のままとした。培地中のグルコース濃度は、YSI グルコース分析装置 (YSI, Yellow Springs, Ohio) を使用してモニターした。グルコース濃度が 0.1 g / L を超過した場合、供給速度を一時的に減少させたまたは供給を止めた。細胞が 70 の O D₅₅₀ に達したとき、グルコシルトランスフェラーゼ酵素活性の誘発を、9 mL の 0.5 M IPTG (イソプロピル -D-1-チオガラクト - ピラノシド) の追加により開始した。溶存酸素 (DO) 濃度は、25% の空気飽和度にコントロールした。DO は、最初、羽根による攪拌速度 (400 ~ 1200 rpm) によって、また、その後、エアレーション速度 (標準状態での 1 分あたりの流量 2 ~ 10 リットル (slpm)) によってコントロールした。pH は、6.8 にコントロールした。NH₄OH (14.5% 重量 / 容積 (w / v)) および H₂SO₄ (20% w / v) を、pH のコントロールに使用した。背圧は、0.5 バールで維持した。様々な間隔 (20、25、および 30 時間) で、5 mL の Suppress or 7153 消泡剤を、泡立を抑制するために発酵槽の中に追加した。細胞は、IPTG 追加の 8 時間後に、遠心分離によって収集し、細胞のペーストとして -80 で保存した。

10

20

【0041】

実施例 3

細胞のペーストからの GTFJ 粗酵素抽出物の調製

上記得られた細胞ペーストは、50 mM リン酸カリウムバッファー pH 7.2 中に 150 g / L で懸濁し、スラリーを調製した。スラリーは、12,000 psi でホモジナイズし (Rannie 型のマシン、APV-1000 または APV 16.56)、ホモジネートは、4 まで冷却した。ほどよく力強くかき混ぜながら、細胞ホモジネート 1 リットル当たりに、50 g のフロック (floc) 溶液 (Aldrich no. 409138、50 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.0 中 5%) を追加した。攪拌は、弱めて、15 分間、軽くかき混ぜた。次いで、細胞ホモジネートは、5 ~ 10 で、3 時間、4500 rpm での遠心分離によって浄化した。粗 gtfJ 酵素抽出物を含有する上清は、30 キロダルトン (kDa) カットオフ膜により濃縮した (およそ 5 倍)。gtfJ 酵素溶液中のタンパク質の濃度は、ビシンコニン酸 (BCA) タンパク質アッセイ (Sigma Aldrich) によって、4 ~ 8 g / L であることが決定された。

30

【0042】

実施例 4

半透膜を使用することによる、ポリ(1,3 グルカン)の力価の改善

本実施例は、スクロースの、ポリ(1,3 グルカン)への変換の間に形成される副産物フルクトースの除去および / または希釈が、ポリ(1,3 グルカン)力価を増加させることを実証する。透析チューブは、それが、チューブの内部から透析チューブの外部までの、酵素反応の間に形成される副産物フルクトースの通過を可能にするので、本実施例における半透膜として使用した。

40

【0043】

本実施例における酵素反応溶液は、8 L のスクロース原液 (表 1)、プライマーとして 24 g のデキストラント -10、および 1.0 容積% の gtf 酵素を含有した。

【0044】

【表1】

表1
スクロース原液

材料	濃度
スクロース	1200 g
KH ₂ PO ₄	
バッファー (pH6.8~7.0)	50 mM
10% KOH溶液	pH7に調節するのに必要なだけ
エタノール	800 mL
脱イオン水	8リットルまで

10

20

30

40

【0045】

4つの個々の透析チューブ(50mL容量)を、試験サンプルとして使用し、50mLの酵素反応溶液を装填し、密閉した。次いで、個々の透析チューブは、包囲バッファーとして様々な容積のスクロース原液(表1)を保持するポリエチレンバケット中につるした。次いで、これらのポリエチレンバケットは、磁性かき混ぜプレート上に置き、72時間、20~25でかき混ぜた。コントロールサンプルは、試験サンプルと同じ割合の、50mLの酵素反応溶液からなる、蓋の付いた遠心分離管中で調製し、かき混ぜなしで、72時間、20~25の温度で置いておいた。コントロールサンプルは、透析チューブ中にも包囲バッファー中にも置かなかった。

【0046】

72時間後、透析チューブ中の試験サンプルを、包囲バッファーから取り出し、チューブを切り開き、ポリ(1,3グルカン)の固体を、40マイクロメートルのろ紙にわたる325メッシュスクリーンを使用してブフナー漏斗上で収集した。ろ過ケーキは、脱イオン水中に再懸濁し、上記のようにさらに2回以上ろ過し、残存しているスクロース、フルクトース、および他の低分子量で可溶性の副産物を除去した。最後に、メタノールによるさらなる2回の洗浄を実行した。ろ過ケーキは、漏斗上で徹底的に押し固め、室温で真空下で乾燥させた。コントロールサンプルにおいて形成されたポリ(1,3グルカン)もまた、単離し、重さを量った。試験およびコントロールサンプル中のポリ(1,3グルカン)の形成は、公的に入手可能な情報を使用して確認した(Nakamura, T. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 68: 868-872, 2004)。試験およびコントロールサンプルから、gtfJ酵素による、スクロースの、ポリ(1,3グルカン)への変換後に得られるポリ(1,3グルカン)の結果として生じる乾燥重量を、表2に示す。

【0047】

【表2】

表2

半透膜の存在下および非存在下において形成されたポリ(α1, 3グルカン)の比較

15%スクロース溶液 (包囲バッファー) の容積	ポリ(α1, 3グルカン) (g)
5 L	1.395g
2.5 L	1.515g
250 mL	1.132g
250 mL	1.114g
コントロール	0.696g

10

20

30

【0048】

上記の結果は、酵素反応溶液を透析チューブ中に置き、かつ透析チューブの内部から外部への、副産物フルクトースの絶え間ない通過を可能にし、したがって、チューブの内部で、酵素によって形成されるフルクトースの濃度を希釈する包囲バッファー中に置いた場合に、ポリ(1, 3グルカン)の力価が、有意に増強されたことを明確に示す。最高のポリマー力価は、副産物フルクトースのより高度な希釈をもたらすことができる、より大きな容積の包囲バッファーで得られた。

【0049】

実施例5

定期間隔で形成されるポリ(1, 3グルカン)の量の決定

3 Lのスクロース原液(表1)に、プライマーとして9 gのデキストランT-10および2.0%容積%のg t fを追加し、酵素反応溶液を調製した。

【0050】

7つの個々の透析チューブを試験サンプルとして使用し、50 mLの酵素反応溶液を装填し、密閉した。次いで、個々の透析チューブは、包囲バッファーとして3 Lのスクロース原液を含有するポリエチレンバケット中につるした。バケットは、磁性かき混ぜプレート上に置き、72時間、20~25℃でかき混ぜた。個々の透析チューブは、表3に示す定期間隔で取り出した。実施例4において記載されるように、コントロールサンプルにおいて形成されるポリ(1, 3グルカン)の力価が、72時間後に変わらずに約0.6 gであったので、コントロールサンプルは、本実験において使用しなかった。

【0051】

各定期間隔で、透析チューブ中に形成されたポリ(1, 3グルカン)の固体は、実施例4において記載されるように単離した。様々な時間間隔で酵素反応溶液から得られたポリ(1, 3グルカン)の結果として生じる乾燥重量を、表3に示す。

【0052】

40

【表3】

表3

様々な定期間隔で形成されたポリ(α 1, 3グルカン)の重量

時間(時)	ポリ(α 1, 3グルカン)(g)
6	0.48
21	1.21
28	1.33
36	1.52
48	1.71
60	2.07
72	2.50

【0053】

10

20

上記の結果は、酵素反応がより長い期間(たとえば72時間)、進行するのを可能にしたので、ポリ(α 1, 3グルカン)の產生が、有意に増強されたことを明確に示した。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/054521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P19/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/40217 A1 (NEOSE TECHNOLOGIES INC [US]) 12 August 1999 (1999-08-12) page 4, paragraph 9 - page 5, paragraph 1 page 8, paragraph 2-4 page 9, paragraph 2-5 page 11, paragraph 3-6 page 12, paragraph 1 page 15, last paragraph - page 17, paragraph 2; figure 3 claims 13-20	1,2,5,7, 12,14 8-15
Y	----- -/-	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

20 November 2012

28/11/2012

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/054521

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SIMPSON C ET AL: "Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL, and GtfM from <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 25975", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, CENTER FOR ACADEMIC PUBLICATIONS JAPAN , JP, vol. 141, no. 6, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 1451-1460, XP002082272, ISSN: 0385-5600 cited in the application abstract page 1454, left-hand column, paragraph 4 - page 1457, left-hand column, paragraph 2; table 2 -----	8-15
Y	US 7 000 000 B1 (O'BRIEN JOHN P [US]) 14 February 2006 (2006-02-14) cited in the application column 2, line 58 - column 3, line 2 column 6, line 55 - column 8, line 5 -----	8-11
Y	WO 2010/024887 A1 (CORNING INC [US]; MARTIN GREGORY R [US]; TANNER ALLISON J [US]) 4 March 2010 (2010-03-04) paragraph [0008] paragraph [0059] figures 1,14 -----	6
Y	LINARDOS T I ET AL: "MONOClonal ANTIBODY PRODUCTION IN DIALYZED CONTINUOUS SUSPENSION CULTURE", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 39, no. 5, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 504-510, XP002443305, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.260390505 abstract page 504, right-hand column, paragraph 3 - page 505, left-hand column, paragraph 1 -----	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/054521

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9940217	A1 12-08-1999	AR	015226 A1	18-04-2001
		AR	024034 A2	04-09-2002
		AR	024035 A2	04-09-2002
		AU	762500 B2	26-06-2003
		AU	2566199 A	23-08-1999
		BR	9904774 A	08-03-2000
		CA	2286256 A1	12-08-1999
		CN	1255947 A	07-06-2000
		EP	0973931 A1	26-01-2000
		HU	0002415 A2	28-11-2000
		JP	2001520525 A	30-10-2001
		NZ	337701 A	28-01-2000
		TW	1243209 B	11-11-2005
		US	5952205 A	14-09-1999
		US	6242225 B1	05-06-2001
		US	2001055793 A1	27-12-2001
		WO	9940217 A1	12-08-1999
		ZA	9900932 A	05-08-1999
<hr/>				
US 7000000	B1 14-02-2006	AU	2509700 A	07-08-2000
		DE	60009886 D1	19-05-2004
		DE	60009886 T2	31-03-2005
		EP	1165867 A1	02-01-2002
		JP	2002535501 A	22-10-2002
		TW	504525 B	01-10-2002
		US	7000000 B1	14-02-2006
		WO	0043580 A1	27-07-2000
<hr/>				
WO 2010024887	A1 04-03-2010	EP	2324107 A1	25-05-2011
		JP	2012501176 A	19-01-2012
		US	2010055764 A1	04-03-2010
		WO	2010024887 A1	04-03-2010
<hr/>				

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 ジョン・ピー・オブライエン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19363. オックスフォード. サジナウロード 871

(72)発明者 マーク・エス・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

F ターム(参考) 4B064 AF12 CA21 DA16