



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 1/16, 1/20, 5/00, 9/00, 11/08, 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO00/05340</b></p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月3日(03.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03782</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月13日(13.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/205622 1998年7月21日(21.07.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 関西化学機械製作株式会社 (KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD.)[JP/JP] 〒660-0053 兵庫県尼崎市南七松町2丁目9番7号 Hyogo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 福田秀樹(FUKUDA, Hideki)[JP/JP] 〒655-0871 兵庫県神戸市垂水区松風台1丁目8番13号 Hyogo, (JP) 近藤昭彦(KONDO, Akihiko)[JP/JP] 〒657-0015 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1丁目1番 2-806号 Hyogo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 南條博道(NANJO, Hiromichi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番4号 大三ビル3階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (CH, DE, DK, FR, GB, IT, NL)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: <b>METHOD FOR ENHANCING CATALYTIC ACTIVITY OF CELLS</b></p> <p>(54)発明の名称 細胞の触媒活性を高める方法</p> <p>(57) Abstract Cells showing a reaction rate 350 to 600 times higher than untreated cells can be obtained by treating the cells with a lower alcohol. Namely, cells which have a higher activity than a cell extract and can be recycled can be obtained merely by treating the cells with a low alcohol.</p>		

(57)要約

細胞を低級アルコールで処理することにより、該処理された細胞の反応速度が、該低級アルコール処理しない細胞の反応速度よりも350倍～600倍も高い細胞が提供される。すなわち、細胞を低級アルコール処理するという簡単な操作だけで、細胞抽出液よりも活性が高く、リサイクル可能な触媒が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストラリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BH	バーレーン	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 細胞の触媒活性を高める方法

## 5 技術分野

本発明は、細胞を触媒として用いて、目的物を生産する方法に関する。さらに詳しくは、低級アルコールで処理して得られる細胞を触媒として用いて目的物を生産する方法に関する。

## 10 背景技術

細胞をそのまま触媒として、生物学的プロセスに用いる試みがなされている。細胞の触媒活性を増大させるためには、細胞壁あるいは細胞膜などの透過性バリアーを低下させる必要がある。微生物の透過性バリアーを低下させ、透過性を高める試みは多数報告されている (Felixら、*Ana. Biochem.* 120: 211-234(1982)) 。

15

例えば、酵母に関しては、膜透過性を高めるために、トルエンとエタノールの混合液 (Serrano *Eur. J. Biochem.* 34: 479-482 (1973))、臭化セチルトリメチルアンモニウム (Gowdaら、*Enzyme Micro. Technol.* 13: 154-157 (1991))、エチルエーテル (SeipおよびCosimoら、*Biotechnol. Bioeng.* 40: 638-642(1992))、アルコール類 (Fentonら、*Enzyme Micro. Technol.* 4: 229-232 (1982))、ジギトニン (Joshiら、*Enzyme Micro. Technol.* 11: 439-444 (1989))、Triton X-100 (Vlachら、*J. Mol. Catal.* 26: 173-185 (1984)) およびヘキサメチレンジアミン (Inoueら、*Process biochem.* 29: 271-275 (1994)) で処理した研究結果が発表されている。

20

25 しかしながら、これらの透過性に関する研究は、細胞内酵素活性の *in situ* での決定を目的としたものであり、工業的に使用することを目的とするも

のではなかった (Felixら、前出)。

他方で、この数年、遺伝子組換え技術は格段の進歩をとげ、優れた遺伝子発現システムが開発されている。例えば、酵母に関して、Romanosら、Yeast 8:423-488 (1992)には、種々の遺伝子発現系が記載されている。これらの  
5 遺伝子発現系では、細胞内に過剰に酵素が生産され、蓄積されるため、細胞自体が有効な触媒となり得る。

また、例えば、細胞表層、ペリプラズム、あるいは細胞膜に存在する酵素、例えば、リパーゼも、細胞表層などに保持されているので、これらの酵素をそのまま用いて、あるいは遺伝子操作で発現させれば、細胞自体が有効な触  
10 媒となり得る。

しかしながら、これらの細胞内に蓄積された酵素、あるいは細胞表層、ペリプラズム、あるいは細胞膜に保持される酵素を利用するには、上記のような細胞壁あるいは細胞膜などのバリアーを低下させる必要がある。しかし、透過性バリアー低下の有効な手段がないため、細胞を破碎する工程を必要とする。さらに、酵素の失活を防ぐための厳重な温度管理や、精製などの工程  
15 を必要とするために煩雑であり、またコストも高くなるという欠点があった。

そこで、細胞の破碎、酵素の抽出、および精製が不要でかつ、操作が極めて簡単でかつ低コストの触媒を提供する技術、すなわち、細胞の透過性バリアーを低下させ、細胞自体を触媒として用いる技術が望まれていた。

20

#### 発明の開示

本発明は、上記課題を解決するためになされたものである。すなわち、本発明は、低級アルコールで処理して得られる細胞であって、該処理された細胞の反応速度が、低級アルコール処理しない細胞の反応速度よりも50倍またはそれ以上高い細胞に関する。

25

好ましい実施態様においては、前記細胞が酵母または糸状菌であり、前記

細胞が担体に固定化されている。

また、好ましい実施態様においては、前記低級アルコールが、メタノール、エタノール、プロパノールおよびイソプロパノールから選択される。

そして、好ましい実施態様においては、前記細胞が乾燥されている。

- 5       また、好ましい実施態様においては、前記細胞が低級アルコール処理に対して耐性を有する酵素を含有する細胞である。

そして、好ましい実施態様においては、前記酵素がグリオキサラーゼ I (glyoxalase I) またはリパーゼである。

- 10       さらに好ましい実施態様においては、前記酵素が組換え遺伝子で発現された酵素である。

本発明は、また、低級アルコールで処理して得られる細胞からなる触媒であって、該触媒の反応速度が、低級アルコールで処理しない細胞からなる触媒の反応速度よりも 50 倍またはそれ以上高い触媒に関する。

好ましい実施態様においては、前記細胞が酵母または糸状菌である。

- 15       本発明は、さらに、細胞を低級アルコールで処理する工程を含む、細胞の反応速度を未処理の場合の 50 倍またはそれ以上に増大させる方法に関する。

好ましい実施態様においては、前記細胞が酵母または糸状菌である。

- 20       さらに、本発明は、細胞と基質とを反応させて目的物を生産する方法であって、低級アルコールで処理された細胞の反応速度が未処理の細胞の反応速度よりも 50 倍またはそれ以上高い細胞と該酵素に対する基質とを反応させる工程を含む方法に関する。

好ましい実施態様においては、前記細胞が酵母または糸状菌であり、好ましくは、担体に固定化されている。

- 25       また好ましい実施態様においては、前記細胞が低級アルコール処理に対して耐性を有する酵素を含有する細胞である。

そして、好ましい実施態様においては、前記酵素がグリオキサラーゼ I で

あり、前記目的物がS-ラクトイルグルタチオン (S-lactoylglutathione) である。

また、好ましい実施態様においては、記酵素がリパーゼであり、前記目的物が脂肪酸エステルである。

5       そして、好ましい実施態様においては、前記グリオキサラーゼ I またはリパーゼが組換え遺伝子で発現されている。

また、好ましい実施態様においては、前記細胞が担体に固定化されており、カラムに充填されている。

10       さらに、本発明は、低級アルコールで処理して得られる細胞であって、該処理された細胞の反応速度が、低級アルコールで処理しない細胞の反応速度よりも50倍またはそれ以上高い細胞を有するセンサーに関する。

好ましい実施態様においては、前記細胞が酵母または糸状菌である。

15       本発明により、上記問題点が解決される。すなわち、細胞を低級アルコールで処理することにより、細胞の反応速度が、未処理の場合に比較して、少なくとも50倍以上、好ましい場合には、200倍から600倍にもなる。これは、低級アルコール処理により、細胞壁あるいは細胞膜の透過性バリアーが低下した結果と考えられる。本発明においては、低級アルコールで処理した遊離細胞は、そのまま、触媒として用いられる。固定化された細胞もまた、低級アルコールで処理され、そのまま触媒として用いられる。低級アルコール処理した細胞または固定化細胞は、さらに乾燥されて用いられる。このように、本発明により、極めて簡単な方法で作製され、繰り返し使用できる、触媒活性に優れた細胞が提供される。

20       さらに、本発明は、低級アルコールで処理した細胞を触媒として、目的の物質を生産するために使用する方法を提供する。

25

図面の簡単な説明

図1は、低級アルコール処理した酵母がリサイクル可能であることを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

5 本発明で、細胞とは、大腸菌などのグラム陰性細菌、枯草菌などのグラム陽性細菌、糸状菌、酵母などの真核細胞、動物細胞、植物細胞などを含む。特に、遺伝子組換えなどの宿主として、物質生産に用いられる大腸菌、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属に属する酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、キャンディダ (*Candida*) 属に属する酵母 (*Candida antractica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*) が好適に用いられるが、これらに限定されない。また、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、リゾプス (*Rizopus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属に属する糸状菌も好ましく用いられる。

10 本発明で、細胞の処理に用いられる低級アルコールとしては、炭素数1～11の水溶性アルコールが好ましい。また、アルコールは、一価、二価または三価でもよく、さらに、メタノール、エタノールなどの第一級アルコール、イソプロパノールなどの第二級アルコール、*t*-ブタノールなどの第三級アルコール等も用いられる。好適には、メタノール、エタノール、およびイソプロパノールが用いられる。アルコールは、単独で用いてもよく、2以上を組  
15  
20 合せて用いてもよい。

細胞を処理するアルコールの濃度は、用いるアルコールにより異なるが、約10%～100%である。好ましくは、約20～100%、より好ましくは約40～80%、最も好ましくは約40～60%である。なお、アルコール濃度をいうときは、V/V%である。

25 アルコール処理の時間は、5分以上であれば特に制限されない。好ましくは10分以上である。アルコールの種類により、処理時間を変えればよい。

酵素にもよるが、メタノール、エタノールは処理時間が長くなっても酵素活性にほとんど影響はないが、イソプロパノールは、長時間処理で、酵素活性が若干低下する傾向にある。

アルコール処理の温度は、特に限定されないが、目的とする酵素が失活しない温度であればよい。従って、熱に弱い酵素であれば低温で処理すればよく、耐熱性の酵素、例えば耐熱性のリパーゼであれば高温で処理すればよい。超好熱始原菌の場合は、100℃以上にもなり得る。一般的には、4℃～40℃である。

本発明で、低級アルコール処理に対して耐性を有する酵素とは、メタノール、エタノールあるいはプロパノール処理で失活しない（活性がなくならない）酵素をいう。このような酵素として、グリオキサラーゼ I、リパーゼ、ホスホリパーゼなどが挙げられる。

本発明で、反応速度は、例えば、一定時間における生成物の量あるいは基質の減少量を測定する方法などの適切な測定系を用いて、測定できる。本発明でいう反応速度は酵素学でいう初速度に相当する。

本発明においては、低級アルコールで処理した細胞は死滅する場合が多いにもかかわらず、細胞内酵素は低級アルコール処理に対して耐性であるので低級アルコール処理でも失活せず、そのうえ細胞壁あるいは細胞膜の透過性バリアーが低下しているので、細胞自体を触媒として繰り返して利用できる。反応速度は少なくとも50倍は高くなり、通常、約100倍以上である。好ましい条件、例えば、約40～60%の低級アルコールで処理した場合、活性は300倍から600倍以上となる。

触媒としてリサイクルすることを考慮すると、細胞は担体に固定化されている方が好ましい。担体に固定化された後に処理されることが好ましく、必要に応じて乾燥されてもよい。乾燥は酵素が失活しないような乾燥方法、例えば、真空乾燥、凍結乾燥などで行い得る。

細胞の固定化には、例えば、担体結合法、架橋法および包括法等の公知の方法が適用できるが、取り扱いなどを考慮すると、担体結合法が最適である。担体結合法には、イオン交換性の樹脂に吸着させる化学的吸着法あるいは物理的吸着法が含まれる。本発明においては、多孔質の担体を用いる物理的吸着法が最適である。物理的吸着には特別な手段は必要ない。細胞と担体（例えば、前記多孔質あるいは発泡体）とを単に混合して培養することにより、細胞が担体の開口部に入りこみ、担体に付着する。これにより、固定化された細胞が得られる。

本発明において、「担体」とは、細胞を固定化することができる物質を意味し、好ましくは、水またはある特定の溶媒に対して不溶性の物質である。本発明に用いる担体の材質としては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリウレタンフォーム、ポリスチレンフォーム、ポリアクリルアミド、ポリビニルフォルマール樹脂多孔質体、シリコンフォーム、セルロース多孔質体等の発泡体あるいは樹脂が好ましい。多孔質体あるいは発泡体の開口部の大きさは、固定化する細胞によっても異なるが、細胞が十分に入り込めて、増殖できる大きさが適当である。大腸菌、枯草菌などのバクテリアの場合は、約  $10\ \mu\text{m}$  ~  $500\ \mu\text{m}$ 、糸状菌、酵母、真菌並びに植物細胞の場合は  $50\ \mu\text{m}$  ~  $1,000\ \mu\text{m}$ 、動物細胞の場合は  $30\ \mu\text{m}$  ~  $250\ \mu\text{m}$  が好適であるが、これに限定されない。

また、担体の形状は問わない。担体の強度、培養効率等を考慮すると、球状あるいは立方体状で、大きさは、球状の場合、直径が  $2\ \text{mm}$  ~  $50\ \text{mm}$ 、立方体状の場合、 $2\ \text{mm}$  ~  $50\ \text{mm}$  角が好ましい。

上記のように、菌体と担体とを混合するだけで菌体は担体に固定化され、そのまま、低級アルコールで処理される。

このようにして得られる固定化された細胞は、浮遊状態で反応に用いられるか、カラム等に充填されて、いわゆるバイオリアクターとして用いること

ができる。連続的にあるいはバッチで繰り返し反応させることができる。

本発明の細胞（触媒）は、医薬品、食品等に用いられる蛋白質（酵素、抗体等）、アミノ酸類の生産はもちろん、環境汚染物質の除去などの用途に用いられる。さらに、光学活性体の分離などにも用いられる。

- 5 本発明においては、有機溶媒に対して耐性を有する酵素は、遺伝子組換えで発現されていてもよい。細胞に目的の遺伝子を導入して、目的の酵素（タンパク質）を発現させることは、当業者に公知である。目的の遺伝子の導入とは、細胞の中に遺伝子を導入し、発現させることを意味し、その方法は問
- 10 わない。バクテリア、酵母、糸状菌、真菌、植物、あるいは動物細胞に対して、形質転換、形質導入、トランスフェクション、コトランスフェクション、
- 15 エレクトロポレーション等の方法を用い、プラスミドの形態で、あるいは宿主の遺伝子に挿入して、あるいは宿主の遺伝子と相同組換えを起こすこと等により、形質を発現させることを意味する。

- 得られた組換え細胞は、目的の酵素（タンパク質）を多量に菌体内に蓄積
- 15 できる。従って、本発明の方法で細胞壁あるいは細胞膜のバリアーを低下させて、基質を透過させやすくすると、基質と酵素との接触が大きくなり、酵素反応が一段と早く進行するという効果が得られる。

- 本発明の細胞あるいは触媒は、また、センサーとしても用いられる。例えば、細胞内の酸化還元酵素を用いて、BODを測定することができる。センサー
- 20 ーとしては、酸素電極、過酸化水素電極などのトランスデューサーを含む。用いる酵素（触媒）と測定すべき物質等を考慮して、トランスデューサーを決定すれば良い。本発明のバイオセンサーは、透過性バリアーが低下している
- 25 るので、基質の透過性がよく、感度が高く、繰り返し使用できるという利点を有している。

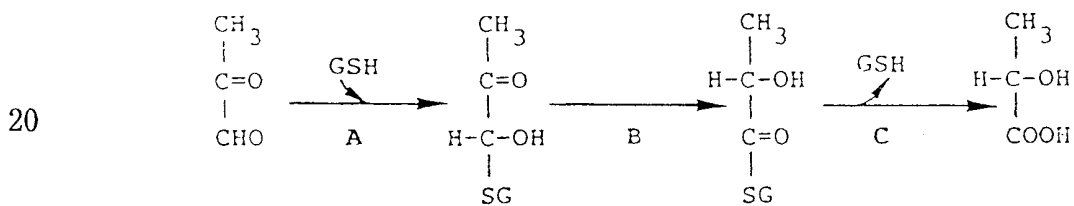
- 本発明で用いられる細胞がリパーゼを生産する場合、細胞を低級アルコール
- 25 処理し、これを触媒として、エステル交換反応に用いることができる。す

なわち、当業者に周知のように、基質として脂肪酸のグリセロールエステル（例えば、トリエステル）を用いて、低級アルコール存在下、低級アルコール処理細胞と反応させると、脂肪酸エステルが得られる。脂肪酸エステルはバイオディーゼルとして有用である。

5 (実施例)

以下、細胞として酵母*Saccharomyces cerevisiae*を、および低級アルコール処理に対して耐性を有する酵素としてグリオキサラーゼ I を用いて、メチルグリオキサール (methylglyoxal) から S-ラクトイルグルタチオン (以下、S-LG と略することがある) を製造するプロセス、および細胞として糸状菌リゾプス・オリゼを用い、酵素としてリパーゼを用いる脂肪酸エステルの生産を例にあげて本発明を説明するが、本発明がこの例示に限られないことはいうまでもない。

なお、グリオキサラーゼ I は、以下に示すように、メチルグリオキサールから乳酸を生成する反応経路中のヘミメルカプタール(hemimercaptal)から S-LG への反応 (ステップ B) を触媒する。なお、GSH は、グルタチオンを意味する。



メチルグリオキサール   ヘミメルカプタール   S-ラクトイルグルタチオン   乳酸  
(S-LG)

ステップA: 非酵素的   ステップB: グリオキサラーゼ I   ステップC: グリオキサラーゼ II

反応生成物である S-LG は、いくつかの生理学的機能を有する化合物であり (Gillespieら、Nature 227: 135-136 (1975) ; Kosugiら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 263-267 (1988) および、Thornalleyら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 145:769-774 (1979))、その生理学的機能の解析と  
5 応用のために、大量生産が望まれている物質である。

(酵母の調製例：グリオキサラーゼ I を大量に発現する酵母の調製)

グリオキサラーゼ I 遺伝子を有するプラスミド pE24GL01 は、京都大学食糧科学研究所の木村光教授より寄贈を受けた。このプラスミド pE24GL01 は、Inoue および kimura ら、J. Biol. Chem. 271:25958-25965 (1996) に記載されて  
10 いるように、グリオキサラーゼ I 遺伝子 (GLO1 遺伝子) のオープンリーディングフレーム含む 2500bp のフラグメントをマルチコピープラスミド Yep24 (Ura3) に組み込んだプラスミドである。このプラスミド pE24GL01 を、酢酸リチウム法を用いて酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (*trp*<sup>-</sup>、*leu*<sup>-</sup>、*lys*<sup>-</sup>、*ade*<sup>-</sup>、*ura3-52*) に導入した。形質転換株は、*trp*、*Leu*、*Lys* および *ade* を  
15 それぞれ 40、60、30、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含む SD 最少培地 (グルコース (20g/l)、Difco yeast nitrogen base w/o amino acids (6.7g/l)) を含む寒天培地で生育する株として得られた。

得られた形質転換株を上記組成の SD 液体培地で、30°C、16 時間培養して、後述の細胞抽出法で細胞抽出液を得てグリオキサラーゼ I の活性を測定した。  
20 この形質転換体 (組換え酵母) は、非形質転換体と比べて、菌体内にグリオキサラーゼ I を大量に蓄積していた。

なお、グリオキサラーゼ I の活性は、50mM のメチルグリオキサールおよび 50mM のグルタチオンを含む 100mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) に細胞抽出液あるいは処理酵母を懸濁し、30°C で振盪して、一定時間経過後、240nm の  
25 吸光度を測定し、モル吸光係数を  $3300\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$  として、S-LG の生成量を測定して求めた。単位時間、単位湿潤酵母重量当たりの生成量 ( $\mu\text{mol}/$

min/g-湿潤酵母) を反応速度とした。

(実施例 1 および比較例 1)

(酵母の低級アルコールおよび有機溶剤処理)

上記得られた酵母を、SD最少培地で30℃、16時間前培養し、フレッシュな  
5 SD培地に植菌して、さらに30℃で培養し、 $OD_{610}$ が1.0となったところで培養  
を止めた。5,000rpm、5分間、遠心分離して酵母菌体を回収した。回収した  
細胞ペレットを0.85%のNaClで洗浄して、有機溶媒処理に用いた。

湿潤重量で0.1gの酵母のペレットに、低級アルコールとして各種濃度のメ  
タノール、エタノールおよびイソプロパノールを、比較の有機溶媒として、  
10 アセトン、酢酸エチルおよびジエチルエーテルをそれぞれ、1.0ml加えて、  
酵母を懸濁させ、4℃または25℃で、所望の時間、有機溶剤処理した。処理  
後、5,000rpm、5分間、遠心分離して処理酵母菌体を回収した。回収した細  
胞ペレットを0.85%のNaClで洗浄して、酵素(触媒)として用いた。

また、比較として、湿潤重量で0.1gの酵母のペレットに、1%のTriton X  
15 -100あるいは80mMのヘキサメチレンジアミン(HMDA)を含有する350mMの  
リン酸カリウム緩衝液、pH 7.0を1ml添加し、4℃で、10分間、反応させた。  
処理後、5,000rpm、5分間、遠心分離して処理酵母菌体を回収した。回収し  
た細胞ペレットを0.85%のNaClで洗浄して、酵素(触媒)として用いた。

さらに、比較として、上記培養、洗浄して得られた組換え酵母を100mM  
20 のリン酸カリウム緩衝液、pH 7.0に再懸濁して、ガラスビーズを加えて、30  
秒間のボルテックスと1分の氷冷を15サイクル繰り返して、破碎した。ホモ  
ジネートを10,000g、20分、4℃で遠心分離し、上清を細胞抽出液として用  
いた。

また、Inoueら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 569-472 (1992)の方法  
25 に基づいて、酢酸エチル抽出法で細胞抽出液を調製した。すなわち、上記培  
養、洗浄して得られた組換え酵母0.1g(湿潤重量)を2mlの100mMのリン

酸カリウム緩衝液、pH 7.0に再懸濁し、これに酢酸エチル 2 mlを加えて、30°C、10時間インキュベートした後、5,000rpm、5分間、4°Cで遠心分離し、水相を細胞抽出液として用いた。

(処理酵母を用いるS-LGの生成)

- 5 得られた処理酵母0.1g (湿潤重量) あるいは同量の細胞からの抽出液を、50mMのメチルグリオキサールおよび50mMのグルタチオン (GSH) を含む100mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、30°Cで振盪して、上記方法でS-LGの生成量を測定し、その生成初速度を求めた。表1は、25°Cで、種々の濃度の低級アルコールで、種々の時間処理した結果を示す。なお、表
- 10 1中、NDはnot doneを意味する

表1

有機溶媒濃度(%)	処理時間(分)	S-ラクトイルグルタチオンの生成速度(μmol/分/g-湿重量)					
		メタノール	エタノール	イソプロパノール	アセトン	酢酸エチル	ジエチルエーテル
0	0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
20	120	ND	18	280			
	240	18	30	380			
40	10	280	400	550			
	120	280	368	280			
	240	260	340	180			
60	10	300	296	296			
	120	280	188	188			
	240	280	160	128			
100	10	220	360	398	304	377	337
	120	120	360	420	ND	ND	ND
	240	100	280	360	ND	ND	ND

(25°Cで処理)

25 表1の結果は、低級アルコール処理により、細胞の反応性(初速度)が20倍~550倍と驚異的に増加すること(すなわち、細胞の透過性バリアーが小さくなり、反応が進行したこと)、低級アルコールの種類により細胞に対す

る処理効果が異なること、並びに濃度40%以上のアルコールを用いて10分処理した場合でも初速度は200倍以上になることを示す。低級アルコールの中でも、イソプロパノールは、メタノールおよびエタノールよりも比較的低い濃度で透過性バリアーを低下させることがわかった。いずれのアルコールの場合にも、処理時間は短い方がよいという傾向にある。

ジエチルエーテル、酢酸エチル、アセトン処理では、低級アルコールと同様に酵母の反応性を上げることはできるが、細胞からのタンパク質のもれが大きくなる点が問題である。

次に、4℃で、種々の濃度の低級アルコールで、種々の時間処理した結果を表2に示す。

表2

有機溶媒濃度(%)	処理時間(分)	S-ラクトイルグルタチオンの生成速度(μmol/分/g-湿重量)						
		メタノール	エタノール	イソプロパノール	1% Triton X-100	80mM HMDA	細胞抽出液	酵母抽出細胞液
0	0	1.1	1.1	1.1	10	15	109	260
20	120	ND	ND	10				
	240	ND	ND	10				
40	10	180	400	640				
	120	180	340	500				
	240	160	320	300				
60	10	340	300	300				
	120	302	387	300				
100	10	390	428	460				
	120	345	326	340				

(4℃で処理)

4℃での処理効果は、25℃とほぼ同じであったが、アルコール濃度が高くなるほど、低温で処理する方が好ましく、25℃よりも高い効果を示すことがわかった。

また、Triton X-100処理、80mMヘキサメチレンジアミン (HMDA) 処理では、初速度の増加は10~15倍であり、低級アルコールの処理の方がはるかに大き

い効果（少なくとも200倍以上）であることを示した。

さらに、ガラスビーズで酵母を破碎、抽出した液、酢酸エチル抽出した酵素は、それぞれ、無処理酵母の109倍、260倍の反応初速度を示した。しかし、本発明の低級アルコール処理酵母は、これらの酵素抽出液に比べてはるかに  
5 調製が容易であり、かつ、反応速度も大きい。さらに、次の実施例2に示されるようなリサイクルが可能であるという点で優れている。

（実施例2）

実施例1で用いた、40%のメタノール、エタノールおよびプロパノールで、4℃、10分間処理した酵母菌体を再度用いて、S-LGの生成量を測定した。  
10 結果を図1に示す。図中、a)は40%メタノール、b)は40%エタノール、c)は40%プロパノールで処理した酵母をそれぞれ用いた場合を示し、○は2回目、▲は3回目、◇は4回目の使用を示す。この結果は、若干活性が低下するが、リサイクル可能であることを示している。この結果はまた、低級アルコール処理酵母には、酵素が保持されており、触媒反応中における  
15 酵素の細胞外への漏れも少ないことを示唆している。

（実施例3）

リパーゼ生産培地（1L中にポリペプトン 70g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g、 $\text{NaNO}_3$  1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g、およびオレイン酸 20gを含む）100mlを含むシェーカーフラスコに、固定化用担  
20 体として6mm角のポリウレタンフォーム（BSPs）を100個入れ、リゾプス・オリゼ（*Rhizopus oryzae*）IFO 4697を植菌し、4日間、30℃で培養した。培養中に菌体はBSPsに固定された。培養終了後、菌体が固定されたBSPsを回収し、80%のアルコールで、25℃、10分処理した。処理菌体のリパーゼを利用して、大豆油とメタノールをモル比  
25 1：1の割合で混合した混合物を添加し、30℃、130振盪/分で浸透しながら2日間、反応させて、脂肪酸エステル合成反応を行った。得られた脂

脂肪酸エステルの量は、DB-5キャピラリーカラムを用い、トリカプリリンを内部標準とするガスクロマトグラフィーで定量した。なお、比較としてアセトン処理したBSPs菌体を、コントロールとして無処理のBSPs菌体を用いた。結果を表3に示す。

5 表3

処 理	変換率(%)
メタノール	9.6
エタノール	10.0
イソプロパノール	18.0
アセトン	3.8
無処理	0.1

10

この結果、糸状菌においても、アルコール処理、とりわけイソプロパノール処理の効果が大きく、無処理の場合、ほとんど活性はなかった。

#### 産業上の利用可能性

本発明の、低級アルコールで処理された細胞は、簡便な操作で、未処理の細胞よりも数百倍も活性が高い、リサイクル可能な触媒として用いることができる。すなわち、細胞を低級アルコールで処理するだけで、細胞中の有機溶媒に対する耐性を有する酵素の反応速度が、低級アルコール処理しない細胞の反応速度よりも600倍にも達する。細胞内、細胞表層、ペリプラズムなどに保持されている酵素活性が、細胞膜、細胞壁などの透過性バリアーを低下させることにより、飛躍的に増大することが期待される。

15

20

## 請求の範囲

1. 低級アルコールで処理して得られる細胞であって、該処理された細胞の反応速度が、低級アルコールで処理しない細胞の反応速度よりも50倍またはそれ以上高い、細胞。  
5
2. 前記細胞が酵母または糸状菌である、請求項1に記載の細胞。
3. 前記細胞が担体に固定化されている、請求項1または2に記載の細胞。  
10
4. 前記低級アルコールが、メタノール、エタノール、プロパノールおよびイソプロパノールから選択される、請求項1ないし3いずれかの項に記載の細胞。
5. 前記細胞が乾燥されている、請求項1ないし4いずれかの項に記載の細胞。  
15
6. 前記細胞が低級アルコール処理に対して耐性を有する酵素を含有する細胞である、請求項1ないし5いずれかの項に記載の細胞。  
20
7. 前記酵素がグリオキサラーゼIまたはリパーゼである、請求項6に記載の細胞。
8. 前記酵素が組換え遺伝子で発現された酵素である、請求項6または7いずれかの項に記載の細胞。  
25

9. 低級アルコールで処理して得られる細胞からなる触媒であって、該触媒の反応速度が、該低級アルコールで処理しない細胞からなる触媒の反応速度よりも50倍またはそれ以上高い、触媒。

5 10. 前記細胞が酵母または糸状菌である、請求項9に記載の触媒。

11. 細胞を低級アルコールで処理する工程を含む、細胞の反応速度を未処理の場合の50倍またはそれ以上に増大させる方法。

10 12. 細胞と基質とを反応させて目的物を生産する方法であって、該方法は、低級アルコールで処理された細胞の反応速度が未処理の細胞の反応速度よりも50倍またはそれ以上高い細胞と該酵素に対する基質とを反応させる工程を含む、方法。

15 13. 前記酵素がグリオキサラーゼIであり、前記目的物がS-ラクトイルグルタチオンである、請求項12に記載の方法。

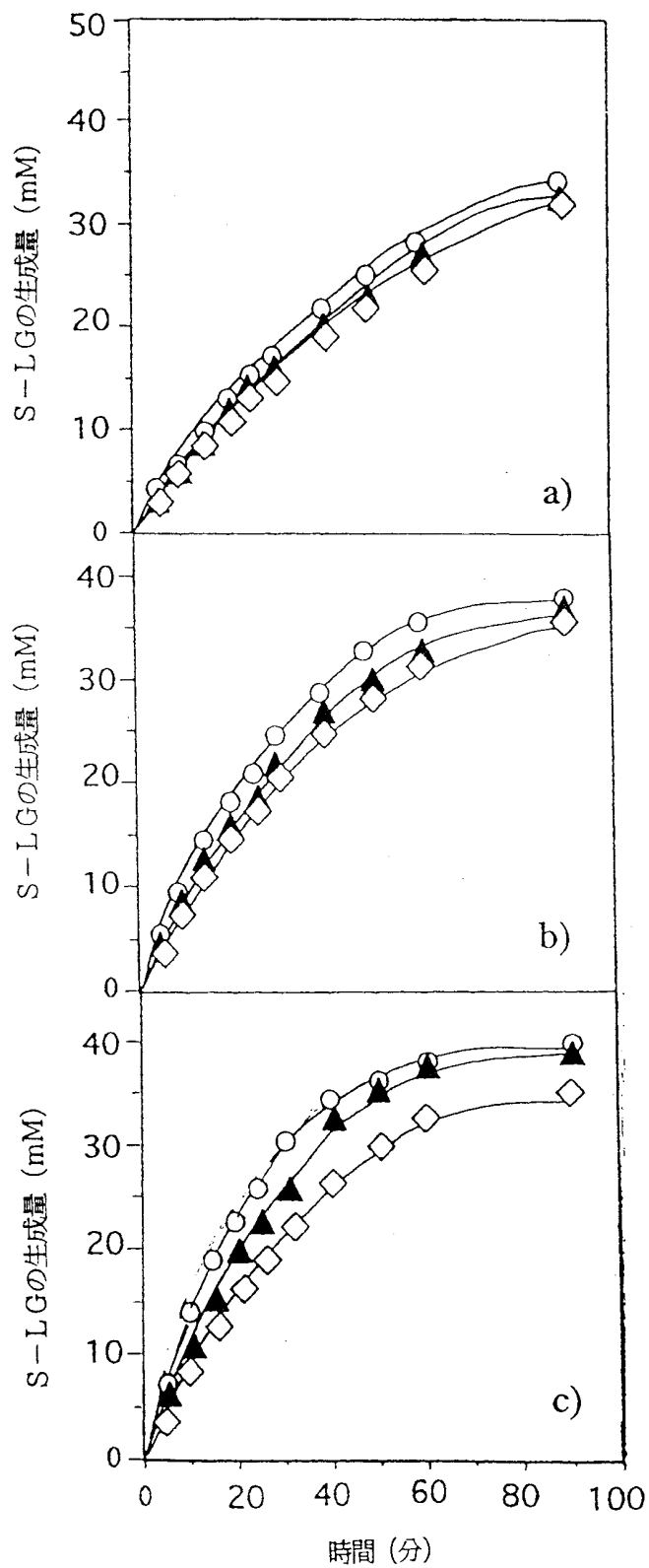
14. 前記酵素がリパーゼであり、目的物が脂肪酸エステルである、請求項12に記載の方法。

20

15. 前記酵素が組換え遺伝子で発現された酵素である、請求項13または14に記載の方法。

25 16. 前記細胞が担体に固定化されており、カラムに充填されている、請求項13ないし15いずれかの項に記載の方法。

第1図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03782

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N1/16, 1/20, 5/00, 9/00, 11/08, 15/00

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)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N1/16, 1/20, 5/00, 9/00, 11/08, 15/00

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)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Liu, Yan et al., "Production of S-lactoylgultathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant Saccharomyces cerevisiae with alcohols." Biotechnol. Bioeng., Vol. 64(1), p.54-60 (1999)	1-15
A	JP, 2-97394, A (Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.), 9 April, 1990 (09. 04. 90), Refer to Claims, etc. (Family: none)	1-16
A	JP, 7-227276, A (Cosmo Research Institute), 29 August, 1995 (29. 08. 95), Refer to Claims, etc. (Family: none)	1-16
A	JP, 7-231788, A (Toyobo Co., Ltd.), 29 August, 1995 (29. 08. 95), Refer to Claims, etc. (Family: none)	1-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search  
5 October, 1999 (05. 10. 99)Date of mailing of the international search report  
19 October, 1999 (19. 10. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/03782

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 1-98487, A (Yuugen Kaisha Nonogawa Shoji), 17 April, 1989 (17. 04. 89), Refer to Claims, etc. (Family: none)	1-16
A	JP, 1-30584, A (Nippon Glass Co., Ltd.), 1 February, 1989 (01. 02. 89), Refer to Claims, etc. (Family: none)	16
A	JP, 4-335892, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 24 November, 1992 (24. 11. 92), Refer to Claims, etc. (Family: none)	16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C12N1/16, 1/20, 5/00, 9/00, 11/08, 15/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C12N1/16, 1/20, 5/00, 9/00, 11/08, 15/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Liu, Yan et al., "Production of S-lactoylgultathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant Saccharomyces cerevisiae with alcohols." Biotechnol. Bioeng., Vol. 64(1), p. 54-60 (1999)	1-15
A	JP, 2-97394, A (三菱油化株式会社), 9. 4月. 1990 (09. 04. 90), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	1-16
A	JP, 7-227276, A (株式会社コスモ総合研究所), 29. 8月. 1995 (29. 08. 95), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	1-16
A	JP, 7-231788, A (東洋紡績株式会社), 29. 8月. 1995 (29. 08. 95), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	05. 10. 99	国際調査報告の発送日
		19.10.99
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4N 9451
日本国特許庁 (ISA/J P)	坂崎 恵美子 印	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3488
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 1-98487, A(有限会社野々川商事), 17. 4月. 1989(17. 04. 89), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	1-16
A	JP, 1-30584, A(日本硝子株式会社), 1. 2月. 1989(01. 02. 89), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	16
A	JP, 4-335892, A(旭化成株式会社), 24. 11月. 1992(24. 11. 92), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	16