

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5829603号

(P5829603)

(45) 発行日 平成27年12月9日 (2015. 12. 9)

(24) 登録日 平成27年10月30日 (2015. 10. 30)

(51) Int. Cl.	F 1
A 2 3 K 1/165 (2006. 01)	A 2 3 K 1/165 Z N A C
C 1 2 N 9/20 (2006. 01)	C 1 2 N 9/20
C 1 2 N 9/14 (2006. 01)	C 1 2 N 9/14 1 0 1

請求項の数 24 (全 88 頁)

(21) 出願番号	特願2012-506630 (P2012-506630)	(73) 特許権者	500457852
(86) (22) 出願日	平成22年4月23日 (2010. 4. 23)		デュポン ニュートリション バイオサイ
(65) 公表番号	特表2012-524538 (P2012-524538A)		エンシズ アンパーツゼルスカブ
(43) 公表日	平成24年10月18日 (2012. 10. 18)		デンマーク国, デーコー 1 0 0 1 コペ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2010/051804		ンハーゲン コー, ペー, オー, ボックス
(87) 国際公開番号	W02010/122532		1 7, ランエプロガーデ 1
(87) 国際公開日	平成22年10月28日 (2010. 10. 28)	(74) 代理人	100127926
審査請求日	平成25年4月11日 (2013. 4. 11)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	61/172, 272	(74) 代理人	100140132
(32) 優先日	平成21年4月24日 (2009. 4. 24)		弁理士 竹林 則幸
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マイ・ファルショウ・イサクセン
(31) 優先権主張番号	0908770.1		デンマーク国デーコー 8 2 2 0 プラパン
(32) 優先日	平成21年5月20日 (2009. 5. 20)		ト, エトヴィンラルスヴェーイ 3 8
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 飼料用サプリメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フィターゼと脂肪分解酵素とを含む飼料用サプリメントであって、前記脂肪分解酵素が、pH 1.5～pH 3.5の範囲のpHでリパーゼ活性を有する、飼料用サプリメント。

【請求項 2】

前記脂肪分解酵素が、配列番号7または配列番号8の配列を有するポリペプチドまたはこれに対する同一性が少なくとも70%であるポリペプチドを含むか；または配列番号9または10の配列；または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号9または10とは異なる配列；または配列番号9または10に対する同一性が少なくとも70%である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生されるポリペプチドを含み、そしてここで前記フィターゼが、配列番号13の配列を有する大腸菌 (E. coli) フィターゼおよび／または配列番号1～6のいずれか1つの配列を有するブティアウクセラ (Buttiauxella) フィターゼまたはこれに対する同一性が少なくとも70%であるポリペプチドを含むか、または配列番号11あるいは、配列番号14のヌクレオチド253～1483の配列、または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号11あるいは、配列番号14のヌクレオチド253～1483とは異なる配列；または配列番号11あるいは、配列番号14のヌクレオチド253～1483に対する同一性が少なくとも70%である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生されるポリペプチドを含む、請求項1に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 3】

前記脂肪分解酵素が、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞で産生される、請求項 1 または 2 に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 4】

前記フィターゼが、pH 2.5～pH 5.5 の範囲の pH でフィターゼ活性を有する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 5】

前記フィターゼの比活性レベルが少なくとも 100 FTU/mg である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 6】

前記脂肪分解酵素の比活性レベルが少なくとも 100 LIU/mg である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメント。

10

【請求項 7】

脂肪分解酵素対フィターゼの比が 1:3～12:1 の範囲にある、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 8】

少なくとも 1 種類の生理学的に許容されるキャリアをさらに含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 9】

前記生理学的に許容されるキャリアが、マルトデキストリン、石灰石（炭酸カルシウム）、シクロデキストリン、コムギまたはコムギ成分、スクロース、デンプン、アンチフォーム、 Na_2SO_4 、タルク、PVA およびこれらの混合物のうちの少なくとも 1 つから選択される、請求項 8 に記載の飼料用サプリメント。

20

【請求項 10】

前記飼料用サプリメントが少なくとも 1 種類の別の酵素を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 種類の別の飼料酵素が、デンプン代謝、繊維の分解、脂質代謝に関するもの、グリコーゲン代謝に関する酵素、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルカンリアーゼ、エンドグルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコシダーゼ（ β グルコシダーゼを含む）、グルクロニダーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポリメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、プロテアーゼ、ラムノーガラクトツロナーゼ、リボヌクレアーゼ、トランスフェラーゼ、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ（D-ヘキソース： O_2 -オキシドレダクターゼ、EC 1.1.3.5） β -グルカナーゼ、 α -アミラーゼ、ペクチナーゼ、セロビオヒドロラーゼおよび／または酸性ホスファターゼまたはこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 10 に記載の飼料用サプリメント。

30

40

【請求項 12】

少なくとも 1 種類のキシラナーゼおよび／または少なくとも 1 種類のアミラーゼを含む、請求項 10 または 11 に記載の飼料用サプリメント。

【請求項 13】

請求項 1～12 のいずれか一項に記載の飼料用サプリメントを含む、飼料原料。

【請求項 14】

以下の (a)～(e)

〔(a) 小粒穀物（コムギ、オオムギ、ライムギ、カラスムギおよびこれらの組み合わせ

50

せなど) および／またはトウモロコシまたはソルガムなどの大粒型穀物などの穀類；

(b) コーングルテンミール、トウモロコシ蒸留粕 (Distillers Dried Grain Solubles) (DDGS)、コムギフスマ、コムギミドリング、コムギシヨーツ、米糠、粃殻、カラスムギ外皮、パーム核、シトラスパルプなどの穀類からの副産物；

(c) ダイズ、ヒマワリ、ラッカセイ、ルピナス、エンドウマメ、ソラマメ、ワタ、セイヨウアブラナ、魚粉、乾燥血漿タンパク質、肉および骨粉、ジャガイモタンパク質、ホエー、コブラ、ゴマなどの起源から得られるタンパク質；

(d) 野菜および動物起源から得られる油および脂肪；

(e) ミネラルおよびビタミン]

10

の飼料材料を含む群から選択される1種又はそれ以上の飼料材料を含む、請求項13に記載の飼料原料。

【請求項15】

低繊維食品を提供するために、トウモロコシ、コムギ、動物副産物粉またはダイズおよび／または少なくとも1種類の低繊維飼料材料の少なくとも1種類の副産物からなる群から選択される少なくとも1種類の低繊維飼料材料を含む、請求項13に記載の飼料原料。

【請求項16】

200FTU/kg～15,000FTU/kgのレベルでフィターゼを含む、請求項13～15のいずれか1項に記載の飼料原料。

【請求項17】

20

125LIPU/kg～45,000LIPU/kgのレベルで脂肪分解酵素を含む、請求項13～16のいずれか1項に記載の飼料原料。

【請求項18】

請求項1～12のいずれか1項に記載の飼料用サプリメントを飼料材料に添加することを含む、請求項13～17のいずれか1項に記載の飼料原料を生成する方法。

【請求項19】

少なくとも1種類の脂肪分解酵素と少なくとも1種類のフィターゼとを混合することを含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の飼料用サプリメントを生成する方法。

【請求項20】

請求項1～12のいずれか1項に記載の飼料用サプリメントを飼料材料に添加することを含む、飼料材料からの少なくとも1種類の食餌用栄養塩の利用率を増加および／または見かけの代謝エネルギー (AME) を増加させるための方法。

30

【請求項21】

請求項13～17のいずれか1項に記載の飼料原料の有効量を動物に給餌することを含む、動物の成長率を高める方法。

【請求項22】

飼料原料を製造するにあたって、飼料材料からの少なくとも1種類の栄養塩の利用率を高めるおよび／または利用可能な代謝エネルギーを増やすために少なくとも1種類のフィターゼおよび少なくとも1種類のリパーゼを含む飼料用サプリメントを用いる使用法であって、

40

ここで前記脂肪分解酵素が、pH1.5～pH3.5の範囲のpHでリパーゼ活性を有し、そして

前記使用法が、前記飼料用サプリメントを飼料材料に添加する工程を含む、

前記使用法。

【請求項23】

前記少なくとも1種類の栄養塩が、亜リン酸、カルシウム、アミノ酸、脂肪および／またはデンプンから選択される、請求項22に記載の使用法。

【請求項24】

少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼを含む飼料原料であって、前記脂肪分解酵素が、pH1.5～pH3.5の範囲のpHでリパーゼ活性を有

50

する、飼料原料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、飼料用サプリメントに関する。特に、本発明は、動物用飼料原料の消化促進に使用可能なフィターゼおよび脂肪分解酵素を含む飼料用サプリメントならびに、この飼料用サプリメントを含む飼料原料に関する。

【背景技術】

【0002】

穀類およびマメ科植物におけるリンの主要な貯蔵形態に、フィチン酸塩がある。しかしながら、ブタ、家禽類、魚などの単胃動物はフィチン酸塩（またはフィチン酸）を代謝または吸収できないため、これがそのまま排泄され、家畜生産が盛んな地域での亜リン酸汚染につながっている。さらに、フィチン酸は、カルシウム、銅、亜鉛などの金属物質との間でキレートを形成して、単胃動物における反栄養物質としても作用する。

【0003】

これらの動物が成長して健康でいられるだけのリン酸塩を提供するために、食餌に無機リン酸塩を添加している。このような添加には、コストがかさみ、汚染の問題をさらに大きくする可能性がある。

【0004】

通常、フィチン酸塩はフィターゼの作用によって加水分解され、これより低級のイノシトールリン酸塩と無機リン酸塩になる。フィターゼは、動物用飼料への添加剤として有用であり、動物に対する有機リンの利用率を高めて環境のリン酸塩汚染を低減する（非特許文献1）。

【0005】

フィターゼをブロイラーの飼料に添加すると、見かけの代謝エネルギー（AME）、窒素およびアミノ酸の利用率が増加することが示されている（非特許文献2）。

【0006】

真菌（非特許文献3～5）および細菌（非特許文献6～11）由来の多数のフィターゼが、文献に記載されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Wodzinski RJ, Ullah AH. Adv Appl Microbiol. 42, 263～302 (1996)

【非特許文献2】Ravindran, V. et al, Brit. Poultry Sci. 41, 193～200 (2000)

【非特許文献3】Wyss M. et al. Appl. Environ. Microbiol. 65 (2), 367～373 (1999)

【非特許文献4】Berka R. M. et al. Appl. Environ. Microbiol. 64 (11), 4423～4427 (1998)

【非特許文献5】Lassen S. et al. Appl. Environ. Microbiol. 67 (10), 4701～4707 (2001)

【非特許文献6】Greiner R. et al Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107～113 (1993)

【非特許文献7】Kerovuo et al. Appl. Environ. Microbiol. 64 (6), 2079～2085 (1998)

【非特許文献8】Kim H. W. et al. Biotechnol. Lett. 25, 1231～1234 (2003)

【非特許文献9】Greiner R. et al. Arch. Biochem. Biophys. 341 (2), 201～206 (1997)

10

20

30

40

50

【非特許文献10】Yoon S. J. et al. Enzyme and microbial technol. 18, 449~454 (1996)

【非特許文献11】Zinin N. V. et al. FEMS Microbiol. Lett. 236, 283~290 (2004)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、真菌のフィターゼがタンパク質分解的に不安定になりがち (Igbas an F. A. et al. Arch. Anim. Nutr. 53, 353~373 (2000)) で分解されやすいのに対し、いくつかの細菌のフィターゼはフィチン酸塩だけに狭い基質特異性を持ち、リン酸化の中間過程であるリン酸イノシトールをほとんど分解しない (Greiner R. et al., Arch. Biochem. Biophys. 303 (1), 107~113 (1993); Kerovuo J et al, Biochem. J. 352, 623~628 (2000))。

10

【0009】

さらに、Ca-フィチン酸錯体を形成するためのカルシウムとフィチン酸塩との相互作用が、フィターゼ活性に有害であることも周知である (Selle, P. H. et al, Livestock Science. 124, 126~141 (2009))。これらのCa-フィチン酸錯体のカルシウムは、フィターゼでは対処できないフィチン酸塩を形成するか、酵素の活性部位に対して非錯体フィチン酸塩と競合すると仮定されている (Long, C., Phytase, Biochemists Handbook, Princeton, NY, Van Nostrand-Reinhold (1961); Wise, A., Nutrition Abstracts & Reviews, 53, 791~806 (1983))。

20

【0010】

フィターゼを添加すると、高フィチン酸食餌のAMEが増加することが示された。また、カルシウムフィチン酸錯体は脂肪酸と反応して腸管内腔で不溶性の石鹸を形成するため、脂肪の消化率が下がることを、Ravindranらが示唆している (Br. Poult. Sci., 2000, 41, 193~200)。フィターゼを添加すると、これらの石鹸の濃度が低下する旨が示唆されている。この仮説の裏付けとして、トウモロコシにおけるフィチン酸塩と脂質との相互作用を示す証拠がある (Cosgrove, 1966, Rev. Pure App. Chem. 16:209~224)。これらの「リポフィチン」は、Ca/Mg-フィチン酸塩と脂質とペプチドとの複合体として説明されている (Cosgrove, 1966, Rev. Pure App. Chem. 16:209~224)。他の報告でも、食餌におけるCa、脂肪、フィチン酸塩の相互作用が示唆されている。たとえば、Matykaら (1990) (Anim. Feed. Sci. Technol. 31:223~230) が、食餌用獣脂によって若齢ニワトリでのフィチン酸塩Pの利用が減り、石鹸脂肪酸として排泄される脂肪の割合が増加することを見出した。

30

40

【0011】

外来性のリパーゼを添加する方法では、脂質およびミネラルの消化改善という観点での成功率に限度がある。しかしながら、これは、Caおよびフィチン酸塩に結合する遊離脂肪酸の複合体が形成され (Cosgrove, 1966, 上掲)、それが胃腸管内で不溶性で、ほとんど吸収されない (Matyka et al. 1990, 上掲) がゆえの限界の可能性はある。

【0012】

動物用飼料に外来性のリパーゼを用いることは、動物による脂肪の消化を改善する目的で以前から提案されている。リパーゼは、それが無い場合よりも短時間で、吸収可能な遊離脂肪酸 (FFA) を遊離するため、リパーゼが消化を改善するのではないかとする仮説

50

がある。しかしながら、外来性のリパーゼを用いて動物の能力または消化率の改善を示そうとする試みは、せいぜいよくても矛盾しており、リパーゼが作用していないことを示すものも多い。DierickおよびDecuyper (2004) (J. Sci. Food Agric. 84:1443~1450) が、微生物のリパーゼをブタの食餌に添加しても脂肪消化率に改善は見られないことを示した。また、Hurtadoら (2000) (Rev. Bras. Zootec. 29:794~802) が、外来性のリパーゼを仔ブタに用いることによる体重増加、飼料効率、エネルギー消化率の増大を検出しようとして失敗した。彼らは、このようなリパーゼをアミラーゼやプロテアーゼと組み合わせても、前述のパラメータのいずれにも何ら別の効果はないことも報告した。Officer (1995) (Anim. Feed Sci. Technol. 56:55~65) の報告では、彼らがリパーゼ、プロテイナーゼ、B-グルカナーゼ、アミラーゼ、セルロースと、リパーゼ、B-グルカナーゼ、ヘミセルラーゼ、ペントサナーゼ、セルロース、アミラーゼ、プロテイナーゼであると説明している外来性の酵素の2つの組み合わせを用いることで、仔ブタの飼料摂取の体重増加に有意な変化は認められなかった。

【0013】

ブロイラー鶏では、Mengら (2004) (Poult. Sci. 83:1718~1727) が、コムギを主成分とする食餌に細菌のリパーゼを用いた場合に、脂肪、デンプン、窒素およびNSPの見かけの消化率ならびにAMEに対するリパーゼの作用を検出しようとして失敗した。また、彼らは、カルボヒドラーゼ (キシラナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼを含む) をリパーゼにのせて組み合わせると、消化管内容物の粘度が下がって脂肪の消化と吸収が増し、栄養塩消化率に対するリパーゼの作用が高まるという仮説を否定した。

【0014】

Al-MarzooqiおよびLeeson (1999) は、動物由来のリパーゼと臓腑抽出物とを試験した。彼らは、これらの添加剤を食餌に用いた場合の糞便レベルでの脂肪消化率の改善と石鹼濃度の低下を示すことはできたが、食欲不振の作用 (飼料摂取量の低下) も報告し、それについてこのタイプの抽出物にコレシストキニンが混入している可能性がゆえのことではないかと説明していた。この事実によって、その動物用飼料での利用と、動物の成長または動物における飼料効率の改善の可能性が制限されることになる。

【0015】

本発明の一目的は、飼料材料からの少なくとも1種類の栄養塩の利用率を改善あるいは見かけの代謝エネルギーを改善する、飼料用サプリメントを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、少なくとも1種類の特定の脂肪分解酵素と少なくとも1種類の特定のフィターゼとを含む飼料用サプリメントを飼料原料に添加すると、この酵素を個々に用いる場合と比較して、少なくとも1種類の栄養塩およびまたはミネラルの取り込みが改善されるという、驚くべき発見に基づくものである。

【0017】

本発明の最も広い態様によれば、

- i. 少なくとも1種類の脂肪分解酵素と、
- ii. 少なくとも1種類のフィターゼと、

を含む、飼料用サプリメントが得られる。

【0018】

本発明者らは、驚くべきことに、既存の報告 (Mulyantini, N. G. A. et al Aust. Poult. Sci. Symp, 17, 305~307 (2005)) とは逆に、少なくとも1種類の特定のフィターゼと少なくとも1種類の特定の脂肪分解酵素とを含む飼料用サプリメントを飼料材料に添加して飼料原料を生成すると、少なくとも1種類の栄養塩の利用率の増加および／または見かけの代謝エネルギー

(AME)の増加が生じることを発見した。

【0019】

理論に拘泥されることを望むものではないが、本発明者らは、この驚くべき発見が、pHが酸性である消化の早い段階で遊離脂肪酸（FFA）を遊離する脂肪分解酵素の作用によるものではないかという仮説を立てた。これらのFFAは、余分なカルシウムと結合して腸管に石鹸を形成することがある。その結果、フィチン酸塩との結合に利用できる遊離カルシウムが減り、それによって、フィチン酸およびカルシウムがフィターゼ耐性錯体を形成しやすい胃腸管（GIT）領域でのフィターゼ活性が促進される。これは、リン酸塩の遊離および吸収量の増加につながる。遊離脂肪酸カルシウム錯体のほうがGITで後から溶解されるため、脂肪およびカルシウムの吸収が増加および／またはAMEが増加する。

10

【0020】

本発明のもうひとつの態様によれば、少なくとも1種類の脂肪分解酵素と少なくとも1種類のフィターゼとを混合することを含む、飼料用サプリメントを生成する方法が得られる。

【0021】

本発明のもうひとつの態様によれば、飼料材料と、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼとを含む、飼料原料が得られる。

【0022】

本発明の別の態様によれば、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼを、飼料材料に添加することを含む、飼料原料を生成する方法が得られる。

20

【0023】

本発明の別の態様によれば、少なくとも1種類の脂肪分解酵素と少なくとも1種類のフィターゼとの組み合わせを含む飼料用サプリメントを飼料材料に添加するか、あるいは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼを飼料材料に添加することを含む、飼料材料からの少なくとも1種類の食餌用栄養塩の利用率を増加および／または見かけの代謝エネルギー（AME）を増加させるための方法が得られる。

【0024】

本発明の別の態様によれば、本発明による飼料原料の有効量を動物に給餌することを含む、動物の成長率を高める方法が得られる。

30

【0025】

本発明の別の態様によれば、飼料原料を製造するにあたって、飼料材料からの少なくとも1種類の栄養塩の利用率を高めるおよび／または利用可能な代謝エネルギーを増やすために少なくとも1種類のフィターゼおよび少なくとも1種類のリパーゼを用いる、使用法が得られる。

【0026】

本明細書に開示した好ましい特徴のいずれも、そうでないことを明示的に示した場合を除いて、上述した態様のいずれに対しても等しく適用可能であるとみなされることは理解できよう。好ましい特徴はいずれも、本明細書で開示した他の好ましい特徴との組み合わせで開示されるともみなされる。

40

【0027】

動物用飼料用の酵素添加剤として効率的にするために、フィターゼは多数の異なる特性を兼ね備えたものでなければならない。フィチン酸を動物の胃の酸性環境で分解できるようにするには、低いpH、好ましくは広い範囲のpH値で活性でなければならない。また、高い比活性を持つものでなければならない、好ましくは、飼料ペレットなどの飼料原料の調製で一般に用いられる高温にタンパク質が耐えられるだけの高い熱安定性を持つ。

【0028】

また、酵素がフィチン酸塩だけでなく、五リン酸イノシトール、四リン酸イノシトール

50

および三リン酸イノシトールなどのフィチン酸塩分解の中間生成物も加水分解できるように、酵素が広い基質特異性を持つことも重要である。ブタにおけるフィチン酸塩の分解に関する研究で、これらのオリゴリン酸イノシトールは、ほとんどが小腸および大腸で不溶性のまま残り、腸管ミクロフローラおよび動物が産生するアルカリホスファターゼを利用できないことがわかっている (Schlemmer U. et al. Arch. Anim. Nutr. 55, 255~280 (2001))。異なる酵素の基質特異性の特性のばらつきも同定した。たとえば、フィターゼによってバチルス・サブティリス (B. subtilis) から生成した三リン酸イノシトールは、基本的にこの酵素によるさらなる加水分解に対して耐性である [Kerovuo J. et al. Biochem J. 352, 623~628 (2000)]。

10

【0029】

好ましい実施形態では、フィターゼが、好ましくは Danisco A/S から Phyzyme XP (商標) の名称で販売されている大腸菌 (E. coli) フィターゼである。あるいは、フィターゼは、国際公開第 2006/043178 号パンフレット、同第 2008/097619 号パンフレット、同第 2008/092901 号パンフレット、国際特許出願 PCT/US2009/41011 号 (いずれも本明細書に援用する) に教示されたフィターゼ酵素などのブチアウクセラ (Buttiauxella) フィターゼであってもよい。

【0030】

最も好ましい実施形態では、フィターゼが、大腸菌 (E. coli) フィターゼおよび/またはブチアウクセラ (Buttiauxella) sp. フィターゼを含む。一層好ましくは、フィターゼが、配列番号 1~6 または配列番号 13 のうちのいずれか 1 つに示すようなアミノ酸配列を含むポリペプチド；または配列番号 1~6 または配列番号 13 のうちのいずれか 1 つと比較した場合に 1 つまたは複数のアミノ酸付加、欠失および/または置換を含むポリペプチド；または配列番号 1~6 または配列番号 13 のうちのいずれか 1 つに対する同一性が少なくとも 70%、80%、90%、95%、98% または 99% であるポリペプチドを含むか；または配列番号 11；あるいは配列番号 14 のヌクレオチド 253~1483 の配列または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号 11 あるいは、配列番号 14 のヌクレオチド 253~1483 とは異なる配列；または配列番号 11；あるいは配列番号 14 のヌクレオチド 253~1483 の配列と比較した場合に 1 つまたは複数のヌクレオチド付加、欠失および/または置換を含む配列；または配列番号 11 あるいは、配列番号 14 のヌクレオチド 253~1483 に対する同一性が少なくとも 70%、80%、90%、95%、98% または 99% である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生されるポリペプチドを含む。

20

30

【0031】

好ましい一実施形態では、フィターゼが、少なくとも pH 約 2.5~pH 約 5.5 の範囲の pH でフィターゼ活性を有する。一層好ましくは、フィターゼが、下記の材料および方法のセクションに開示するフィターゼアッセイで測定した場合に少なくとも pH 約 2.5~pH 約 3.5 の範囲、また pH 約 5~pH 約 5.5 の範囲の pH で、フィターゼ活性を有する。

40

【0032】

好ましくは、フィターゼの比活性レベルが、少なくとも酵素 100 FTU/mg である。一層好ましくは、少なくとも、200、300、400、500、700、1000 FTU/mg である。

【0033】

本明細書で使用する場合、1 FTU (フィターゼ単位) とは、本明細書の材料および方法のセクションに記載の pH 5.5 でのフィターゼアッセイで定義する反応条件下で、1 分間に 1 μ mol の無機オルトリン酸塩を基質から放出するのに必要な酵素の量として定義される点は理解できよう。

【0034】

50

好ましい実施形態では、本発明で使用するフィターゼは、pH範囲2.0～5.5の最大活性の少なくとも50%を保持するおよび／または300FTU/mgを超える比活性を有するpH最適値がpH2～5.5、好ましくは4.0～4.5の範囲である。

【0035】

好ましくは、本発明で使用する脂肪分解酵素は、下記の材料および方法のセクションに記載のリパーゼアッセイで測定した場合に、pH約1.5～pH約5.5の範囲のpHでリパーゼ活性を有する。一層好ましくは、脂肪分解酵素は、pH約1.5～pH約3.5またはpH約2.0～pH約3.5の範囲のpHでリパーゼ活性を有する。

【0036】

本発明で使用する脂肪分解酵素は、本明細書で定義するアッセイを使用して、脂肪分解酵素活性を示す好適な脂肪分解酵素であれば、どのようなものであってもよいことは理解できよう。好ましくは、脂肪分解酵素は、活性レベルが少なくとも酵素100LIU/mgである。一層好ましくは、少なくとも、200、300、400、500、700、1000LIU/mgである。

【0037】

本明細書で使用する場合、1LIU（リパーゼ単位）とは、後述の材料および方法のセクションに記載のリパーゼアッセイで説明する条件下で、1分間に1μmolのH⁺を放出する酵素の量として定義される。

【0038】

好ましい一実施形態では、本発明で使用する脂肪分解酵素は、国際公開第98/45453号パンフレットに記載されているような糸状菌類である、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 由来のものである。

【0039】

好ましくは、脂肪分解酵素が、配列番号7または8に示すようなアミノ酸配列を含むポリペプチド；または配列番号7または8と比較した場合に1つまたは複数のアミノ酸付加、欠失および／または置換を含むポリペプチド；またはこれに対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%であるポリペプチドを含むか；または配列番号9または10の配列；または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号9または10とは異なる配列；または配列番号9または10の配列と比較した場合に1つまたは複数のヌクレオチド付加、欠失および／または置換を含む配列または配列番号9または10に対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生されるポリペプチドを含む。

【0040】

あるいは、リパーゼは、シュードモナス・ゲッサードイ (*Pseudomonas gessardii*) 由来の酸性リパーゼ (Raman, K. et al, J Ind Microbiol Biotechnol (2010) 37:531～535)、リゾプス・アリズス (*Rhizopus arrhizus*) 由来の酸性リパーゼ (Kumar, KK. et al, Hindustan Antibiot Bull. 1993 Feb-May; 35 (1-2): 33～42) (配列番号32、33)、ペニシリウム・シンプリシシム (*Penicillium simplicissimum*) 由来の酸性リパーゼ (Gutarra M. L. E. et al, Bioresource Technology 100 (2009) 5249～5254)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) NCIM 1207由来の酸性リパーゼ (Mhetras N. C. et al, Bioresource Technology 100 (2009) 1486～1490, Pel, H. J., et al, Nat. Biotechnol. 25 (2), 221～231 (2007)) (配列番号27)、たとえばヒト (配列番号17、18)、ウシ (配列番号19、20)、マウス (配列番号21、22)、ラット (配列番号23、24)、イヌ (配列番号25、26) 由来の哺乳類胃リパーゼ (Chahinian, H. et al, Biochemistry 2006, 45, 993～1001)

10

20

30

40

50

、トウゴマ由来の酸リパーゼ (Eastmond, P. J. The Journal of Biological Chemistry, 279 (2004); 45540~45545) (配列番号28、29)、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 由来のLIP2リパーゼ (Aloulou, A. et al, Biochimica et Biophysica Acta 1771 (2007) 228~237) (配列番号30、31) からなる群から選択されるものであってもよい。

【0041】

上述したように、本発明者らは、本発明による飼料用サプリメントの性能改善が、消化の早い段階で遊離脂肪酸 (FFA) を遊離する脂肪分解酵素の作用によるものであることを発見した。これによってカルシウム石鹸が形成され、それに伴い、カルシウム-フィチン酸錯体が低減される。

10

【0042】

別の好ましい実施形態では、本発明で使用する脂肪分解酵素が、たとえば、トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 宿主細胞における配列番号9または配列番号10の配列を有するヌクレオチドの発現によって、トリコデルマ・リーセイ (Trichoderma reesei) 細胞で産生される。

【0043】

別の好ましい実施形態では、本発明による飼料用サプリメントが、

i) 以下の特徴すなわち、

20

a) 本明細書で開示するリパーゼアッセイで測定した場合に、pH約1.5~pH約3.5の範囲のpHでリパーゼ活性を有する脂肪分解酵素、

b) 配列番号7または8に示すようなアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはこれに対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%であるポリペプチドを含む脂肪分解酵素、

c) 配列番号9または10の配列；または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号9または10とは異なる配列；または配列番号9または10に対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生される脂肪分解酵素、

のうちの少なくとも1つを特徴とする脂肪分解酵素である脂肪分解酵素と、

30

ii) 以下の特徴すなわち

d) 細菌のフィターゼ、

e) pH約2.5~pH約3.5の範囲のpHで、本明細書で後述するフィターゼアッセイで測定した場合に、フィターゼ活性を有するフィターゼ、

f) 配列番号1~6または配列番号13のいずれか1つに示すようなアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはこれに対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%であるポリペプチドを含むフィターゼ、

g) 配列番号11あるいは、配列番号14のヌクレオチド253~1483の配列；または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号11あるいは、配列番号14のヌクレオチド253~1483とは異なる配列；または配列番号11、あるいは配列番号14のヌクレオチド253~1483に対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生されるフィターゼのうちの少なくとも1つを特徴とするフィターゼと、を含む。

40

【0044】

別の好ましい実施形態では、飼料用サプリメントが、脂肪分解酵素と、リパーゼ活性 (リパーゼ単位 (LIPU) として測定) 対フィターゼ活性 (フィターゼ単位 (FTU) として測定) の比が、本明細書において後述するようなpH5.5でのリパーゼアッセイおよびフィターゼアッセイで定義した場合に、約1:5~約12:1の範囲、好ましくは約1:3~約3:1の比、一層好ましくは約1:1~約3:1の比にあるフィターゼとを含む。

50

【0045】

好ましくは、利用率が高まる少なくとも1種類の食餌用栄養塩が、亜リン酸；カルシウム；アミノ酸、脂肪および／またはデンプンを含む群から選択される。好ましくは、利用率がともに回腸および／または全胃腸管で改善される。

【0046】

本発明で用いられる脂肪分解酵素およびフィターゼが、液体または固体／粒状組成物として独立に提供できるものであることは、当業者であれば理解できよう。

【0047】

好ましくは、前記酵素が液体形態の場合、前記酵素は当該酵素を含む細胞の培養後に前記酵素が分泌された培地中にある。好ましくは、前記培地が無細胞（すなわち、細胞が培地から分離されている）である。好ましくは、前記培地が濃縮されている。培地を顆粒化して固体の酵素組成物を提供可能であることは理解できよう。

10

【0048】

さらに、用途および／または適用モードおよび／または投与モードに応じて、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼを、溶液の形態または固体として提供してもよい旨は理解できよう。

【0049】

一実施形態では、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼが、消費に適した液体配合物であり、好ましくはこのような液体組成物が、緩衝液、塩、ソルビトールおよび／またはグリセロールのいずれかを含有する。

20

【0050】

別の実施形態では、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼを、前記脂肪分解酵素および／またはフィターゼを含む1つ以上の細胞として提供してもよい。

【0051】

一実施形態では、飼料用サプリメントが、顆粒化または他の酵素と同時顆粒化される。

【0052】

好ましくは、飼料用サプリメントが、少なくとも1種類の生理学的に許容されるキャリアをさらに含む。

30

【0053】

生理学的に許容されるキャリアは、好ましくは、マルトデキストリン、石灰石（炭酸カルシウム）、シクロデキストリン、コムギまたはコムギ成分、スクロース、デンプン、アンチフォーム、 Na_2SO_4 、タルク、PVAおよびこれらの混合物のうちの少なくとも1つから選択される。

【0054】

一実施形態では、フィターゼおよび／または脂肪分解酵素を、生理学的に許容されるキャリアで乾燥させる。

【0055】

好ましい実施形態では、飼料用サプリメントが、少なくとも1種類の別の酵素を含むものであってもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1種類の別の飼料酵素が、デンプン代謝、繊維の分解、脂質代謝に関与するもの、グリコーゲン代謝に関与するタンパク質または酵素、アセチルエステラーゼ、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キモシン、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エピメラーゼ、エステラーゼ、ーガラクトシダーゼ、ーグルカナーゼ、グルカンリサーゼ、エンドーグルカナーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ーグルコシダーゼ（ β グルコシダーゼを含む）、グルクロニダーゼ、ヘミセルラーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、ヒドロラーゼ、インベルターゼ、イソメラーゼ、ラッカーゼ、リアーゼ、マンノシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチンデポ

40

50

リメラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチン分解酵素、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ポリガラクトナーゼ、プロテアーゼ、ラムノーガラクトナーゼ、リボヌクレアーゼ、タウマチン、トランスフェラーゼ、輸送タンパク質、トランスグルタミナーゼ、キシラナーゼ、ヘキソースオキシダーゼ（D-ヘキソース： O_2 -オキシドレダクターゼ、EC 1.1.3.5） β -グルカナーゼ、 α -アミラーゼ、ペクチナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、酸性ホスファターゼおよび／または他のものまたはこれらの組み合わせからなる群から選択される。これには、たとえば、飼料の粘度を調節する酵素を含む。

【0056】

一層好ましい実施形態では、飼料用サプリメントが、フィターゼ、脂肪分解酵素、キシランゼおよび／またはアミラーゼを含む。最も好ましい実施形態では、飼料用サプリメントが、フィターゼ、脂肪分解酵素、キシランゼおよびアミラーゼを含む。

10

【0057】

好ましくは、アミラーゼが、飼料 $10\text{ U/kg} \sim 10000\text{ U/kg}$ 、一層好ましくは、 $100\text{ U/kg} \sim 7500\text{ U/kg}$ 、なお一層好ましくは、 $500\text{ U/kg} \sim 5000\text{ U/kg}$ の範囲で存在する。1 アミラーゼ U とは、pH 6.5 および 37°C で水不溶性の架橋デンプンポリマー基質から 1 分あたり 1 mmol のグルコシドリンケージを放出する酵素の量である旨は、理解できよう。

【0058】

好ましくは、キシランゼが、飼料 $100\text{ U/kg} \sim 10000\text{ U/kg}$ 、一層好ましくは、 $250\text{ U/kg} \sim 7500\text{ U/kg}$ 、なお一層好ましくは、 $500\text{ U/kg} \sim 5000\text{ U/kg}$ の範囲で存在する。1 キシランゼ U とは、pH 5.3 および 50°C でオート麦スペルトキシラン基質から 1 分あたり $0.5\text{ }\mu\text{mol}$ の還元糖等価物（DNS [4] によるキシロースとして）還元糖方法を放出する酵素の量である旨は、理解できよう。（Bailey, M. J. Biely, P. and Poutanen, K., Journal of Biotechnology, Volume 23, (3), May 1992, 257~270）。

20

【0059】

飼料用サプリメントは、どのような好適な動物用であってもよい旨は理解できよう。好ましくは、動物が、単胃動物、たとえば家禽類またはブタである。

30

【0060】

飼料用サプリメントは、少なくとも 1 種類のフィターゼおよび少なくとも 1 種類の脂肪分解酵素を、どのような好適な量で含有するものであってもよいことは、明らかであろう。好ましくは、飼料用サプリメントが、個々にまたは合計のパーセンテージとして、少なくとも 0.1 重量%の脂肪分解酵素およびフィターゼを含有する。一層好ましくは、飼料用サプリメントが、個々にまたは合計のパーセンテージとして、少なくとも 0.5 重量%；少なくとも 1 重量%；少なくとも 2 重量%；少なくとも 3 重量%；または少なくとも 4、5、6、7、8、9 または 10 重量%の脂肪分解酵素およびフィターゼを含むものであってもよい。

【0061】

本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも 1 種類の脂肪分解酵素および少なくとも 1 種類のフィターゼは、安定化剤および／またはバルク剤および／または他の酵素などの他の成分を含むものであってもよいことは、当業者には自明であろう。

40

【0062】

好ましくは、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも 1 種類の脂肪分解酵素および少なくとも 1 種類のフィターゼが、最大約 70°C ；最大約 85°C ；または最大約 95°C の熱処理に対して熱的に安定することになる。この熱処理については、最大約 1 分間；最大約 5 分間；最大約 10 分間；最大約 30 分間；最大約 60 分間実施すればよい。熱的に安定したという表現は、指定温度への加熱前に添加剤中に存在した／活性であった酵素成分の少なくとも約 75% が、これを室温まで冷却した後にも依然として存在する／活

50

性であることを意味する。好ましくは、指定温度への加熱前に添加剤中に存在し、活性であった酵素成分の少なくとも約80%が、これを室温まで冷却した後にも依然として存在し、活性である。

【0063】

本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼは、保存寿命が約30週間を超える；約40週間を超える；約50週間を超える；約1年間を超える；約1.5年間を超える。保存寿命とは、調製時に添加剤中に存在し、活性であった酵素成分の少なくとも約80%が、依然として存在し、活性であることを意味する。

【0064】

好ましくは、本発明による飼料用サプリメントを生成する方法が、少なくとも1種類のフィターゼおよび少なくとも1種類の脂肪分解酵素を、任意に少なくとも1種類の生理学的に許容されるキャリアと混合することを含む混合ステップを含む。

【0065】

特に好ましい実施形態では、飼料用サプリメントを均質化して、粉末を生成する。

【0066】

別の好ましい実施形態では、国際公開第2007/044968号パンフレットに記載されているように、飼料用サプリメントを顆粒に配合する（TP T顆粒と呼ぶ）。

【0067】

もうひとつの好ましい実施形態では、飼料用サプリメントを顆粒に配合する場合、この顆粒が、タンパク質コアに被覆された水和したバリア塩を含む。このような塩コーティングの利点として、熱許容性の改善、保存安定性の改善ならびに、これがなければ酵素に有害な作用を持つ他の飼料添加剤に対する保護がある。

【0068】

好ましくは、塩コーティングに用いられる塩は、20℃で水分活性が0.25超または恒湿が60%超である。

【0069】

好ましくは、塩コーティングが Na_2SO_4 を含む。

【0070】

飼料用サプリメントを調製する方法は、粉末をペレット化する別のステップを含むものであってもよい。この粉末を、従来技術において周知の他の成分と混合してもよい。この粉末、あるいはこの粉末を含む混合物を強制的にダイに通し、得られるストランドを、さまざまな長さの好適なペレットに切断してもよい。

【0071】

任意に、ペレット化するステップが、ペレットの形成前に、スチーム処理またはコンディショニング段階を含むものであってもよい。この粉末を含む混合物を、水蒸気圧入でミキサなどのコンディショナに入れてもよい。混合物をコンディショナ内で、60～100℃などの指定温度まで加熱するが、一般的な温度は70℃、85℃、90℃または95℃であろう。滞留時間については、数秒から数分、さらには数時間にすらも可変にできる。5秒間、10秒間、15秒間、30秒間、1分間2分間、5分間、10分間、15分間、30分間、1時間など。

【0072】

本発明による飼料用サプリメントが、適当な任意の飼料材料への添加に適していることは、理解できよう。

【0073】

本明細書で使用する場合、飼料材料という用語は、動物が消費する基本的な飼料材料を示す。これには、たとえば、少なくとも1種類以上の未加工穀物粒および／または大豆粕または骨粉などの加工植物および／または動物材料を含んでもよいことは、さらに理解できよう。

【0074】

いくつかの実施形態では、飼料材料が、以下の成分すなわち、a) 小穀物（コムギ、オオムギ、ライムギ、カラスムギおよびこれらの組み合わせなど）および／またはトウモロコシ（maize）またはソルガムなどの大型穀物などの穀類；b) コーングルテンミール、トウモロコシ蒸留粕（Distillers Dried Grain Solubles）（DDGS）、コムギフスマ、コムギミドリング、コムギ小ブスマ、米糠、粳穀、カラスムギ外皮、パーム核、柑橘パルプなどの穀類からの副産物；c) ダイズ、ヒマワリ、ラッカセイ、ルピナス、エンドウマメ、ソラマメ、ワタ、セイヨウアブラナ、魚粉、乾燥血漿タンパク質、肉および骨粉、ジャガイモタンパク質、ホエー、コブラ、ゴマなどの起源から得られるタンパク質；d) 野菜および動物起源から得られる油および脂肪；e) ミネラルおよびビタミンのうちの1種類以上を含むことになる。

10

【0075】

本発明による飼料用サプリメントが、高フィチン酸塩飼料材料に添加すると特に好都合であることは、さらに明らかであろう。

【0076】

本明細書で使用する場合、飼料原料という用語は、1種類以上の飼料用サプリメントが添加された飼料材料を示す。

【0077】

動物が異なれば必要な飼料原料が異なり、同じ動物であってもその動物の肥育目的に応じて異なる飼料原料を必要とする場合もあることは、当業者であれば理解できよう。開始時の飼料材料に応じて、飼料原料が高繊維飼料原料であっても低繊維飼料原料であってもよいことも、さらに理解できよう。

20

【0078】

好ましくは、飼料原料が、トウモロコシ（maize）またはトウモロコシ（corn）、コムギ、オオムギ、ライコムギ、ライムギ、コメ、タピオカ、ソルガム、および／または副産物のいずれかならびに、大豆粕、ナタネ種子粕、ナタネ粕、綿実油粕、ヒマワリ種子粕、動物副産物粉などのタンパク質を豊富に含む成分、これらの混合物を含む飼料材料を含むものであってもよい。一層好ましくは、飼料原料が、動物脂肪および／または野菜油を含むものであってもよい。

【0079】

任意に、飼料原料は、たとえば、カルシウムなどの別のミネラルおよび／または別のビタミンを含有するものであってもよい。

30

【0080】

本発明による飼料用サプリメントが、カルシウム含有量の多い飼料原料に用いると特に有益になることは、当業者には明らかであろう。特に、カルシウム含有量が高くフィチン酸塩含有量も高い飼料原料。

【0081】

高カルシウム食餌を示すカルシウムのレベルが動物のタイプに応じて、なおかつ動物を肥育する用途にすらも応じて変化してもよいことは、当業者には明らかであろう。たとえば、産卵鶏の場合、>3%の食餌で高Ca食餌となろう。ブロイラーおよびすべてのシチメンチョウでは、>1%Caの食餌で高Ca食餌となろう。本発明の目的で、高カルシウム食餌は、少なくとも1~2%のカルシウムを含む食餌とみなされる。

40

【0082】

高フィチン酸塩食餌が、重量で>0.90%のフィチン酸を含む食餌であることは、当業者にはさらに明らかであろう。

【0083】

本明細書で定義するように、低繊維飼料原料は、水不溶性細胞壁の最大含有量約25%および／または可溶性非デンプン多糖の最大含有量約4%を含有する、1種類以上の飼料材料を含む飼料原料である。一層好ましくは、水不溶性細胞壁の最大含有量約22.5%、約20%、約17.5%、約15%、約12.5%；および／または可溶性非デンプン多糖の最大含有量約3%、約2.5%、約2%、約1.75%、約1.5%、約1.25

50

%。

【0084】

好ましい実施形態では、本発明による飼料用サプリメントまたは少なくとも1種類の脂肪分解酵素および少なくとも1種類のフィターゼを、少なくとも1種類の低繊維飼料材料、たとえば、トウモロコシ (c o r n)、コムギ、動物副産物粉またはダイズおよび／または副産物のいずれかと混合し、低繊維飼料原料を提供する。

【0085】

好ましくは、飼料原料がトウモロコシ (c o r n) と大豆粕とのミックスである。

【0086】

好ましくは、飼料材料が脱脂米糠ではない。

10

【0087】

好ましい実施形態では、飼料原料が、飼料原料約250FTU/kg〜約15,000FTU/kg (250〜10,000FTU/kg、400〜7,500FTU/kg、また500〜5000FTU/kgなど) のレベルでフィターゼを含む。

【0088】

別の好ましい実施形態では、飼料原料が、飼料原料約125LIPU/kg〜約45,000LIPU/kg (500〜30,000LIPU/kg、1000〜20000LIPU/kg、また3000〜10000LIPU/kgなど) のレベルで脂肪分解酵素を含む。

【0089】

20

権利請求した利点を本発明による飼料用サプリメントで提供するには、飼料材料または飼料原料中にフィチン酸塩が存在しなければならないことは、当業者には容易に明らかであろう。また、このフィチン酸塩は、飼料材料の構成成分として自然に存在してもよいし、所望のレベルで別のサプリメントとして添加してもよいものであることも容易に明らかであろう。

【0090】

もうひとつの態様では、飼料原料を生成するための方法が得られる。飼料原料は一般に、原材料をまず好適な粒度まで粉碎した後、適切な添加剤と混合する飼料用ミルで生成される。その後、飼料原料をマッシュまたはペレットとして生成してもよい。後者の場合は一般に、温度を標的レベルまで上昇させた後、飼料をダイに通して特定サイズのペレットを生成する方法を必要とする。このペレットを、そのまま冷却する。その後、脂肪および酵素などの液体添加剤を加えてもよい。飼料原料の生成には、特に少なくとも蒸気の使用を含んでもよい好適な技術によって、ペレット化の前に押出または膨張を含む追加のステップを伴うこともある。

30

【0091】

飼料原料は、家禽類 (たとえば、ブロイラー、卵を産む鶏、ブロイラー育種業者、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、水鳥)、ブタ (あらゆる年齢カテゴリ)、ペット (たとえばイヌ、ネコ) または魚などの単胃動物用の飼料原料であってもよい。

【0092】

任意に、飼料原料は、別の添加剤を含むものであってもよい。たとえば、飼料原料に、任意の好適な量でカルシウムを添加して、動物の食餌を補うおよび／またはバルク剤としてもよい。カルシウムは、有機 (緑色葉野菜など) 形態であっても無機 (石灰石／炭酸カルシウムなど) カルシウムであってもよい。好ましくは、カルシウムサプリメントの添加後、飼料原料が、少なくとも約0.5%のカルシウムを含む。一層好ましくは、少なくとも約0.8%、少なくとも約1.0%、少なくとも約2.0%、少なくとも約3%のカルシウム。

40

【0093】

飼料原料は、少なくとも0.0001重量%の飼料用サプリメントを含むものであってもよい。好適には、飼料原料は、少なくとも0.0005重量%；少なくとも0.0010重量%；少なくとも0.0020重量%；少なくとも0.0025重量%；少なくとも

50

0.0050重量%；少なくとも0.0100重量%；少なくとも0.020重量%；少なくとも0.100重量%；少なくとも0.200重量%；少なくとも0.250重量%；少なくとも0.500重量%の飼料用サプリメントを含むものであってもよい。

【0094】

別の態様では、飼料原料を製造するにあたって、飼料材料からの少なくとも1種類の栄養塩の利用率を高めるおよび／または利用可能な代謝エネルギーを増やすために少なくとも1種類のフィターゼおよび少なくとも1種類の脂肪分解酵素を用いる使用法が得られる。

【0095】

好ましくは、少なくとも1種類のフィターゼおよび少なくとも1種類の脂肪分解酵素が、飼料用サプリメントとして配合される。一層好ましくは、飼料用サプリメントが、本発明による飼料用サプリメントである。

【0096】

好ましい実施形態では、少なくとも1種類の栄養塩が、亜リン酸、カルシウム、総脂肪および／またはアミノ酸から選択される。

【0097】

本明細書で使用する場合、「少なくとも1種類の栄養塩の利用率を高めるおよび／または利用可能な代謝エネルギーを増やす」という表現は、フィターゼおよび脂肪分解酵素または飼料用サプリメントを加えていない単位重量の飼料材料から得られる栄養塩またはエネルギーの利用率と比較した場合に、単位重量の飼料原料を消費する動物が利用できる栄養塩の量またはエネルギーの量が増加することを意味する。

【0098】

別の好ましい実施形態では、飼料材料が、高レベルのフィチン酸塩および／またはカルシウムを含む飼料材料である。

【0099】

本発明について、以下の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】野生型ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼのアミノ酸配列 (配列番号1) を示す。

【図2】BP-112で表示した変異体ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼのアミノ酸配列 (配列番号2) を示す。

【図3】野生型ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼおよび4つの変異体ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼ (配列番号1~5) のアミノ酸アライメントを示す。

【図4】BP-11で表示した別の変異体ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼのアミノ酸配列 (配列番号6) を示す。

【図5】アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 由来の脂肪分解酵素のアミノ酸配列 (配列番号7) を示し、内在性シグナルペプチドをボールドで示してある。

【図6】内在性シグナルペプチドを除去したこと以外は配列番号7と同一である、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 由来の脂肪分解酵素のアミノ酸配列 (配列番号8) を示す。

【図7】シグナル配列を含むアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 脂肪分解酵素 (配列番号7に示す) をコードするヌクレオチド配列を示す—このヌクレオチド配列は、ゲノムDNA配列 (および配列番号9で表示した) である。シグナル配列をボールドで示し、イントロンを小文字で示す。

【図8】シグナル配列を含まないアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 脂肪分解酵素 (配列番号8に示す) をコードするヌクレオチド配列を示す—ヌクレオチド配列は、ゲノムDNA配列 (および配列番号10で表示した) である。イントロンを小文字で示す。

【図9】ペプシンの濃度を上げた場合のブティアウクセラ (*Buttiauxella*)、変異体BP-17、BP-110、BP-111、BP-112由来のフィターゼならびに、Phyzyme XP、Natuphos、Ronozyme Pの耐性を示す。

【図10】KoldingのTechnological Instituteにおけるペレット化ユニットの概略図である。

【図11】本発明に用いる3つのPhytase B変異体でのペレット化試験の相対残留活性を示す。

【図12】Phyzyme XPすなわち大腸菌 (*E. coli*) フィターゼを全粒小麦粉に配合した場合の相対残留活性を示す。

【図13】被覆されたRonozyme製品からフィターゼを抽出して全粒小麦粉に配合し、保護のない状態でフィターゼ分子の熱安定性を研究した試験の結果を示す。

【図14】さまざまなpHでのフィチン酸塩に対する本発明に用いるフィターゼおよび対照の活性を示す。

【図15】さまざまなpHでのフィチン酸塩に対する本発明に用いるフィターゼおよび対照の活性を示す。

【図16】さまざまなpHでのフィチン酸塩に対する本発明に用いるフィターゼおよび対照の活性を示す。

【図17】さまざまなpHでのフィチン酸塩に対する本発明に用いるフィターゼおよび対照の活性を示す。

【図18】ブティアウクセラ (*Buttiauxella*) 変異体由来のフィターゼが85℃を超える温度でフィチン酸の加水分解を触媒したことを明らかに示すHPLCクロマトグラムである。

【図19】ブティアウクセラ (*Buttiauxella*) 変異体由来のフィターゼが85℃を超える温度でフィチン酸の加水分解を触媒したことを明らかに示すHPLCクロマトグラムである。

【図20】アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) リパーゼ3ゲノムDNAを含有するpDONR221::lip 3を示す。

【図21】最終リパーゼ発現コンストラクトATlipase3Trexを示す。

【図22】野生型ブティアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼをコードするヌクレオチド配列 (配列番号11) を示す。

【図23】Aはカニユーレ処置したブタの回腸でのエネルギー消化係数を示す (SEM=0.0009)。文字の異なるバーはP<0.05レベルが異なる。Bはカニユーレ処置したブタの回腸での粗タンパク質消化係数を示す (SEM=0.0009)。文字の異なるバーはP<0.05レベルが異なる。

【図24】ブタの全消化管で消化可能なエネルギー係数を示す (SEM=0.0009)。文字の異なるバーはP<0.05レベルが異なる。

【図25】Aはブタの全消化管カルシウム貯留を示す (SEM=0.027)。文字の異なるバーはP<0.05レベルが異なる。Bはブタの全消化管リン貯留を示す (SEM=0.030)。文字の異なるバーはP<0.05レベルが異なる。

【図26】シグナル配列 (配列番号12) を含む野生型大腸菌 (*E. coli*) フィターゼのアミノ酸配列を示す。

【図27】成熟野生型大腸菌 (*E. coli*) フィターゼ (配列番号13) のアミノ酸配列を示す。

【図28】野生型大腸菌 (*E. coli*) フィターゼ (配列番号14) をコードするヌクレオチド配列を示す。

【図29】さまざまな脂肪分解酵素/フィターゼの組み合わせと一緒にインキュベートした場合のトウモロコシ (*corn*) -ダイズ飼料からの遊離脂肪酸の生成を示す。

【図30】フィチン酸とカルシウムとのフィターゼ耐性錯体の生成ならびに、遊離脂肪酸を加えることによる反転を示す。図30Aは、CaCl₂濃度を高めることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。図30Bは、遊離脂肪酸を、15mMを含有する反応混合

10

20

30

40

50

物に加えることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。

【図31】フィチン酸とカルシウムとのフィターゼ耐性錯体の生成ならびに、リパーゼを含むリパーゼ反応混合物を加えることによる反転を示す。図31Aは、 CaCl_2 濃度を高めることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。図31Bは、リパーゼ反応混合物を、30mMの CaCl_2 を含有するフィターゼ反応混合物に加えることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。

【図32】トウモロコシ(corn)ーダイズ食餌で測定したリパーゼ3および腓リパーゼのpH特性を示す。

【図33】ブロイラー鶏におけるリンの回腸での消化係数を示す。文字の異なるバーは $P < 0.05$ レベルが異なる。

10

【図34】ブロイラー鶏におけるカルシウムの回腸での消化係数を示す。文字の異なるバーは $P < 0.05$ レベルが異なる。

【図35】ブロイラー鶏におけるリンの全消化管での貯留係数を示す。文字の異なるバーは $P < 0.05$ レベルが異なる。

【図36】ブロイラー鶏を用いる2つの実験でのカルシウムの全消化管での貯留係数。文字の異なるバーは $P < 0.05$ レベルが異なる。

【図37】家禽類の消化管でのリパーゼとフィターゼとの相互作用に關与する機序についての本発明者らの仮説を示す。図は、リパーゼとフィターゼとの間に觀察された相乗効果の裏にある考えられる機序の略図を示している。酸性条件下でのリパーゼ3の作用がゆえに、遊離脂肪酸(FFA)がリパーゼ3のない状況よりも消化の早い段階で遊離する。これらのFFAは、余分なカルシウム(Ca)と結合して石鹼を形成することがある。その結果、フィチン酸(IP6)と結合してフィターゼ耐性錯体を形成するのに利用できる遊離Caが減る。最終的に、リパーゼ3を添加しない状況よりも多くのIP6がフィターゼによって分解される。これによって、動物によるリン酸塩(P)の遊離と以後の吸収量が増加する。FFA-Ca錯体のほうが消化管で後から溶解されることがあり、脂肪およびCaの吸収が増加する。IP6を加水分解するフィターゼが存在しないと、これがFFA-Ca石鹼と錯体を形成して不溶性の非分解可能なIP6-Ca-FFA石鹼となり、脂肪、Ca、Pの吸収が低下する。

20

【発明を実施するための形態】

【0101】

30

発明の詳細な開示

特に定義しないかぎり、本明細書で用いる科学技術用語はいずれも、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994) および Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) が、本開示で用いる用語の多くについての当業者向けの汎用的な辞書となる。

【0102】

40

本開示は、本明細書に開示した例示的な方法および材料に限定されるものではなく、本開示の実施形態を実施または試験するにあたっては、本明細書に記載したものと類似または等価な任意の方法および材料を使用することが可能である。数値の範囲は、その範囲を規定する数字を包含する。特に明記しないかぎり、核酸配列は左から右に5'から3'の方向に、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシの方向に記載される。

【0103】

本明細書に記載の見出しは、明細書を全体として参照することにより得られる本開示のさまざまな態様または実施形態を限定するものではない。よって、すぐ下で定義する用語は、明細書を全体として参照することにより一層完全に定義される。

【0104】

50

アミノ酸は、本明細書では、アミノ酸の名称、3文字の略語または1文字の略語を用いて示される。

【0105】

本明細書で使用する場合、「相同体」という用語は、該当アミノ酸配列および該当ヌクレオチド配列に対して一定の相同性を有する実体を意味する。ここで、「相同性」という用語は、「同一性」と等価に扱うことができるものである。好適には、この文脈での「相同的」は、詳細については後述するアライメントアルゴリズムを用いて、2種類の酵素の配列を比較した後のこれらの酵素の配列同一性のパーセンテージを示す。

【0106】

本文脈において、相同的アミノ酸配列とは、該当配列に対して、少なくとも75、80、81、85または90%同一、好ましくは少なくとも95、96、97、98または99%同一であってもよいアミノ酸配列を含むものとする。一般に、相同体は、対象アミノ酸配列のように、同一の活性部位などを含む。相同性を類似性（すなわち、同様の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）の観点から考慮することも可能であるが、本発明の文脈では、相同性を配列同一性の観点から表現するのが好ましい。

【0107】

「機能的フラグメント」とは、そのポリペプチドのその特徴的な特性を保持したポリペプチドのフラグメントを意味するものである。本発明の文脈において、フィターゼ酵素の機能的フラグメントは、このタンパク質全体のフィチン酸からリン酸塩を放出する機能を保持したフラグメントである。

【0108】

アミノ酸配列およびヌクレオチド配列の場合、目視によって、あるいはより一般的に、容易に利用可能な配列比較プログラムの助けを借りて相同性の比較を実施可能である。これらの市販のコンピュータプログラムでは、2つ以上の配列間の相同率（%）を計算することができる。

【0109】

相同率（%）は、隣接配列について計算可能なものである。すなわち、一方の配列を他方の配列と整列させ、一方の配列に含まれるアミノ酸をそれぞれ他方の配列に含まれる対応するアミノ酸と一度に一残基ずつ直接比較する。これは、「ギャップのない」アラインメントと呼ばれる。一般に、このようなギャップのないアラインメントは、比較的数の少ない残基についてのみ実施される。

【0110】

これは極めて単純で着実な方法ではあるが、たとえば、同一の配列対で1つの挿入または欠失が生じると、これが原因で以後のアミノ酸残基がアラインメントから除外され、全体のアラインメントを実施したときに相同率（%）が大幅に低下する可能性があることを考慮していない。その結果、ほとんどの配列比較方法は、全体の相同性スコアを極端に損なわない程度に、起こり得る挿入および欠失を考慮した最適なアラインメントを得るよう設計されている。これは、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入して、局所的な相同性を最大にするようにして達成される。

【0111】

しかしながら、こうした一層複雑な方法では、アラインメントに生じる各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当てているため、同じ数の同一のアミノ酸であれば、ギャップの少ない配列アラインメントほど（比較対象となる2つの配列間の関連性がより高いことを反映して）ギャップの多い配列アラインメントより高いスコアが得られる。ギャップの存在に対してはコストを比較的高くして、このギャップで以後に表れる残基ではペナルティを減少させる「アフィンギャップコスト」が一般に用いられている。これは、最も一般に用いられるギャップスコアリングシステムである。ギャップペナルティが高いと、ギャップの少ない最適なアラインメントを得られることは言うまでもない。ほとんどのアラインメントプログラムでは、ギャップペナルティを変更できるようになっている。しかしながら、このようなソフトウェアを配列比較に用いる場合は、デフォルト値を使用するの

が好ましい。たとえば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを使用する場合、アミノ酸配列のデフォルトのギャップペナルティは、ギャップについて-12、各伸長部分については-4である。

【0112】

したがって、最大相同率(%)を計算するには、まずはギャップペナルティを考慮して最適なアラインメントを作成する必要がある。このようなアラインメントを実行するのに適したコンピュータプログラムにGCG Wisconsin Bestfitパッケージ(Devereux et al 1984 Nuc. Acids Research 12 p387)がある。配列比較を実施できる他のソフトウェアの例として、BLASTパッケージ(Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18を参照のこと)、FASTA(Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403-410)、GENEWORKSスイートの比較ツールがあげられるが、これに限定されるものではない。BLASTおよびFASTAのどちらもオフラインとオンラインの検索で利用可能である(Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 7-58ページから7-60ページを参照のこと)。

10

【0113】

しかしながら、いくつかの用途では、GCG Bestfitプログラムを用いると好ましい。タンパク質およびヌクレオチド配列の比較には、BLAST 2 Sequencesと呼ばれる新しいツールも利用できる(FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247~50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187~8およびtatiana@ncbi.nlm.nih.govを参照のこと)。

20

【0114】

最終的な相同率(%)は同一性の観点から測定可能なものであるが、アラインメントプロセス自体は一般に、一かゼロかのペアワイズ比較に基づくものではない。むしろ、化学的な類似性または進化距離に基づいて、それぞれのペアワイズ比較にスコアを割り当てるスケールド類似性スコア行列が一般に使用される。普通に用いられるこのような行列の一例に、BLASTスイートプログラムのデフォルト行列であるBLOSUM62行列がある。GCG Wisconsinプログラムでは通常、一般公開されたデフォルト値またはカスタムシンボル比較表が供給される場合にはそのいずれかを用いる(詳細については、ユーザーマニュアルを参照のこと)。用途によっては、GCGパッケージ用の一般公開されたデフォルトの値、他のソフトウェアの場合はBLOSUM62などのデフォルトの行列を用いるのが好ましい。

30

【0115】

あるいは、CLUSTAL(Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237~244)に似たアルゴリズムに基づいて、DNASIS(商標)(日立ソフトウェア)のマルチプルアライメント機能を用いて相同性のパーセンテージを計算してもよい。

40

【0116】

このソフトウェアで最適なアラインメントを生成した後、相同率(%)、好ましくは配列同一率(%)を計算できる。このソフトウェアは一般に、配列比較の一部としてこれを実行し、数値としての結果を生成する。

【0117】

本発明の好ましい態様では、配列相同性/同一性のパーセンテージを計算するのに以下のソフトウェアと設定を使用する。アミノ酸配列の場合、同一性(相同性)のパーセンテージすなわち「陽性」を、それぞれの考え得るアミノ酸配列対について、AlignX VectorNTI(Vector NTI Advance 9.1 from Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califor

50

n i a, U S A) で計算する。設定はデフォルトのパラメータ（ギャップオープニングペナルティ 10、ギャップ伸長ペナルティ 0.1）とする。

【0118】

核酸配列の場合、同一性（相同性）のパーセンテージすなわち「陽性」を、それぞれの考え得る核酸配列対について、Informax Inc. (USA) から入手した AlignX VectorNTI プログラムで計算する。設定は DNA のデフォルト設定であり、ギャップオープニングペナルティ：15 およびギャップ伸長ペナルティ：6.66 である。（マルチプルアライメントも同じ設定）。

【0119】

好ましくは、全長アミノ酸配列で、あるいはそれぞれの全長アミノ酸配列をコードする対応のポリヌクレオチドに対する核酸について、アミノ酸の同一性（相同性）を計算する。

【0120】

サイレントな変化を生じて機能的に等価な物質が得られるアミノ酸残基の欠失、挿入または置換が配列に含まれることもある。アミノ酸の特性（残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性）における類似性に基づいて、意図的なアミノ酸置換を作製してもよい。このため、アミノ酸を官能基でグループ化すると有用である。アミノ酸は、その側鎖だけの特性に基づいてグループ化可能であるが、変異データも含むようにすると一層有用である。このようにして誘導されるアミノ酸のセットが、その構造的な理由で保存されると思われる。これらのセットは、Venn ダイアグラムとして描画可能である (Livingstone C. D. and Barton G. J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput. Appl. Biosci. 9: 745~756) (Taylor W. R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J. Theor. Biol. 119: 205~218)。保存的な置換を、たとえば、一般に許容される Venn ダイアグラムによるアミノ酸のグループ化を表す以下の表に沿って作製してもよい。

【0121】

【表1】

セット		サブセット	
疎水性	FWYHKMILVAGC	芳香族	FWYH
		脂肪族	ILV
極性	WYHKR EDCSTNQ	荷電	HKR ED
		正に荷電	HKR
		負に荷電	ED
小さい	VCAGSPTND	わずか	AGS

【0122】

本発明は、起こり得る相同的置換（置換 (substitution) および置換 (replacement) はどちらも、本明細書では既存のアミノ酸残基と別の残基との相互の入れ替えを意味するものとして用いられる）すなわち、塩基と塩基、酸と酸、極性と極性といった具合などの同じようなもの同士の置換も包含する。また、非相同的置換すなわち、あるクラスの残基から別のクラスの残基への置換、あるいは、オルニチン（以下、Z とする）、ジアミノ酪酸オルニチン（以下、B とする）、ノルロイシンオルニチン（以下、O とする）、ピリジルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、フェニルグ

リシンなど、非天然のアミノ酸を含ませることを伴う置換も起こり得る。

【0123】

置換 (replacem ent) は、非天然のアミノ酸によってなされるものであってもよい。

【0124】

「タンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドを含む。

【0125】

「～と等価なアミノ酸残基」、「～に対応するアミノ酸」という表現ならびに文法的にこれと等価の表現は、本明細書では、特定のタンパク質の特定のアミノ酸配列で示されるものと同様の位置および作用を有するタンパク質のアミノ酸残基を示すものとして用いられる。当業者であれば、同等のタンパク質における特定残基の等価性を識別できるであろう。

10

【0126】

「特性」またはポリペプチドに関する文脈で文法的にこれと等価の表現は、本明細書で使用する場合、検出または選択可能なポリペプチドの特徴または属性を意味する。これらの特性として酸化安定性、基質特異性、触媒活性、熱安定性、温度および／またはpH活性特性、飼料加工安定性、分泌される機能があげられるが、これに限定されるものではない。

20

【0127】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸配列」という用語は、「ポリペプチド」という用語および／または「タンパク質」という用語と同義である。いくつかの場合には、「アミノ酸配列」という用語が、「ペプチド」という用語と同義である。いくつかの場合には、「アミノ酸配列」という用語が、「酵素」という用語と同義である。

【0128】

アミノ酸配列は、好適な起源から調製／単離されるものであってもよいし、合成的に作られたものでもよく、組換えDNA技術を用いて調製されるものであってもよい。

【0129】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書では同義に用いられる。本開示および特許請求の範囲では、アミノ酸残基に従来から用いられている1文字および3文字のコードを使用する。IUPAC IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) に準拠して定義されるようなアミノ酸の3文字のコード。また、遺伝暗号の縮重がゆえに、ポリペプチドが2つ以上のヌクレオチド配列でコードされることもある旨は、理解できよう。

30

【0130】

「シグナル配列」または「シグナルペプチド」という用語は、タンパク質の成熟または前駆体形態の分泌に関与する場合があるヌクレオチドおよび／またはアミノ酸の任意の配列を示す。このシグナル配列の定義は機能的なものであり、タンパク質遺伝子のN末端部分によってコードされ、タンパク質の分泌がなされることに関与するすべてのアミノ酸配列を含むことを意図している。これらは、タンパク質のN末端部分または前駆体タンパク質のN末端部分に結合していることが多いが、常にそうだというわけではない。

40

【0131】

「機能的フラグメント」とは、ポリペプチドのフラグメントであって、そのポリペプチドの特徴的な特性を保持しているフラグメントを意味する。本発明の文脈において、フィターゼまたは脂肪分解酵素の機能的フラグメントは、このタンパク質全体のフィターゼまたは脂肪分解酵素切断能を保持しているフラグメントである。

【0132】

「単離された」、「回収された」または「精製された」という表現は、それがもともとあった環境から取り出された材料を示す。「実質的に精製された」という表現は、その材料が少なくとも有意な程度に精製されていることを意味する。

50

【0133】

一態様では、好ましくは、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、単離された形態である。「単離された」という表現は、配列が、天然の状態でこの配列と関連し、天然に見られるものとしての少なくとも1種類の他の成分を、少なくとも実質的に含まないことを意味する。

【0134】

明細書全体をとおして、用語の他の定義が出てくることがある。例示的な実施形態を一層詳細に説明する前に、本開示はここに記載の特定の実施形態に限定されるものではなく、もちろんそれ自体も変化し得る旨を理解するものとする。また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものであるから、本明細書で用いる専門用語は、

10

【0135】

値の範囲が示される場合、文脈からそうでないことが明らかな場合を除いて、その範囲の上限と下限との間にあるそれぞれの中間の値が、下限の単位の十分の一まで具体的に開示されていると理解するものとする。表記の範囲内の表記の値または中間値と、その表記の範囲内の他の表記の値または中間値との間の小さいほうの範囲も各々、本開示に包含される。これらの小さいほうの範囲の上限および下限は、その範囲に独立に含まれていてもよいし、除外されていてもよく、表記の範囲で具体的に除外された限界値次第で、その小さいほうの範囲に一方の限界値が含まれる、どちらの限界値も含まれない、あるいは両方の限界値が含まれる各範囲も本開示に包含される。表記の範囲が一方または両方の限界値を含む場合、これら含まれる限界値の一方または両方を除外する範囲も本開示に含まれる。

20

【0136】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈からそうでないことが明らかである場合を除いて、同じ対象の複数形も含む点に注意されたい。よって、たとえば、「遺伝子（単数形）」といえは複数のこのような候補剤を含み、「細胞」といえは1種類以上の細胞ならびに当業者間で周知のその等価物を含むといった具合である。

【0137】

本明細書に引用した刊行物は、本出願の出願日前に開示されているというだけのものである。本明細書のいずれも、このような刊行物が本明細書に添付の特許請求の範囲に対する先行技術をなすことを認めるものであると解釈されるものではない。

30

【0138】

本発明で用いる酵素は、回分、流加、連続流加プロセスをはじめとして、固体または液体培養のいずれかによって産生可能なものである。培養は、水性ミネラル塩培地、有機成長因子、炭素およびエネルギー材料、分子酸素、そしてもちろん、使用する1種類以上の特定の微生物種の開始接種材料を含む成長培地で達成される。

【0139】

炭素およびエネルギー源、酸素、同化可能な窒素、微生物の接種材料に加えて、適切な割合で好適な量のミネラル栄養塩を供給し、微生物を適切に成長させるとともに、微生物変換プロセスにおける細胞による炭素およびエネルギー源の同化を最大限にし、発酵培地にて最大細胞密度で最大細胞収率を達成する必要がある。

40

【0140】

従来技術において周知のように、水性ミネラル培地の組成は、ある程度は使用する微生物および基質に応じて広範囲にわたって変更可能である。ミネラル培地には、窒素に加えて、好適な量のリン、マグネシウム、カルシウム、カリウム、イオウ、ナトリウムを、同化可能で好適な可溶性イオン混合形態で含むものとし、好ましくは、従来技術において周知のように、銅、マンガン、モリブデン、亜鉛、鉄、ホウ素、ヨウ素などの特定の微量元素が、同じく同化可能で好適な可溶性形態で存在するものとする。

50

【0141】

発酵反応は、発酵槽の中身を、微生物種が活発に成長するのを助ける上で効果的な適した酸素分圧に維持するための空気、酸素の豊富な空気など、あるいは、実質的に純粋な分子酸素のこすらある分子酸素含有ガスによって必要な分子酸素が供給される好氣的なプロセスである。実際、酸素化した炭化水素基質を用いることで、微生物成長のための酸素要求量が少なくなる。それにもかかわらず、成長用の分子酸素を供給しなければならない。これは、基質の同化と、これに対応する微生物の成長が、ある程度は燃焼プロセスであるためである。

【0142】

曝気速度はかなり広い範囲にわたって変更可能であるが、曝気は通常、（使用する圧力および25℃で）発酵槽の液体容量あたりの酸素含有ガスの概算容量で毎分約0.5～10、好ましくは約0.5～7の範囲の速度で実施される。この量は、普通の酸素含有量の空気がリアクタに供給されている前提でのものであり、純粋な酸素に関しては、それぞれの範囲が、（使用する圧力および25℃で）発酵槽の液体容量あたりの酸素の容量で1分あたり約0.1～1.7または好ましくは約0.1～1.3になる。

【0143】

微生物変換プロセスに使用する圧力は、広い範囲を取り得る。圧力は通常、約0～50 psigの範囲内であり、設備および運用コストと達成される酸素溶解性とのバランスとして、現段階で好ましくは約0～30 psig、一層好ましくは大気圧を少なくともわずかに超える圧力である。大気圧を超えることには、このような圧力だと水性発酵物中の溶存酸素濃度が高くなりやすく、ひいては細胞の成長率を増す一助となり得るという利点がある。同時に、これは大気圧が高いと設備および運用コストが上がるという事実とバランスが保たれている。

【0144】

発酵温度は、ある程度は変更可能であるが、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) などの糸状菌類の場合、選択する微生物株に応じて、温度は通常、約20℃～40℃の範囲内であり、通常好ましくは、約25℃～34℃の範囲内である。

【0145】

微生物は、同化可能な窒素源も必要とする。同化可能な窒素源は、微生物による代謝利用に適した形態で窒素を放出できるものであれば、どのような窒素含有化合物であってもよい。タンパク質加水分解物などの多岐にわたる有機窒素源化合物を採用できるが、通常はアンモニア、水酸化アンモニウム、尿素、さまざまなアンモニウム塩（リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、ピロリン酸アンモニウム、塩化アンモニウムなど）またはさまざまな他のアンモニウム化合物などの安価な窒素含有化合物を利用できる。アンモニアガス自体も、大規模な運用には便利であり、好適な量で水性発酵物（発酵培地）に気泡を通して採用できるものである。同時に、このようなアンモニアを、pH制御を助ける目的で用いることも可能である。

【0146】

水性微生物発酵物（発酵混合物）のpH範囲は、約2.0～8.0の例示的な範囲にあるものとする。糸状菌類では、pHは普通、約2.5～8.0の範囲内である。トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) では、pHは普通、約3.0～7.0の範囲内である。特定の微生物にとってのpH範囲の好みは、ある程度までは使用する培地とその微生物自体に左右されるため、当業者によって容易に判断可能なように、変更には若干培地の変更を伴う。

【0147】

発酵槽中における発酵混合物の平均保持時間には、ある程度使用する発酵温度と培養次第で相当な幅を持たせることができるが、通常は約24～500時間の範囲内、好ましくは現段階で約24～400時間である。好ましくは、炭素含有基質を律速因子として制御することで、炭素含有基質から細胞への良好な変換を提供しつつ、相当量の未変換基質に

10

20

30

40

50

よる細胞の汚染を回避可能であるような形で、発酵を実施する。水溶性基質の場合は、微量に残っている物質を容易に洗い流せるため、後者が問題になることはない。しかしながら、非水溶性基質の場合は、これが問題となり、好適な洗浄ステップなどの生成物を処理する追加のステップが必要とされることもある。上述したように、このレベルに達するまでの時間は重要ではなく、特定の微生物および実施する発酵プロセスで変更してもよい。しかしながら、発酵培地における炭素源濃度と、所望のレベルの炭素源が達成されたか否かをどのように判断するかは従来技術において周知である。

【0148】

発酵については、回分または連続運用して実施可能であるが、流加回分での運用に、制御の容易さ、一定量の生成物の生成、あらゆる設備の最も経済的な使用など、好ましい点が多くある。必要があれば、水性ミネラル培地を発酵槽に供給する前に、炭素およびエネルギー源材料の一部または全部および／またはアンモニアなどの同化可能な窒素源の一部を、水性ミネラル培地に加えることが可能である。リアクタに導入される各々の流れは、好ましくはあらかじめ定められた速度で制御されるか、または炭素の濃度およびエネルギー基質、pH、溶存酸素、発酵槽からのオフガス中の酸素または二酸化炭素、光線透過性によって測定可能な細胞密度などを監視することで判断可能な需要に応答して制御される。さまざまな材料の供給速度については、できるだけ高速な細胞成長速度を得て、炭素およびエネルギー源の効率的な利用と整合し、仕込んだ基質に比してできるだけ高い微生物細胞収率を得られるように、変更可能である。

【0149】

回分または好ましい流加回分運用のいずれかで、すべての設備、リアクタまたは発酵手段、槽または容器、配管、付帯する循環または冷却装置などは、通常は約121℃などの蒸気を利用して少なくとも約15分間かけて、最初から滅菌してある。その後、滅菌済みのリアクタに、酸素および炭素含有基質を含む必要なすべての栄養塩の存在下、選択した微生物の培養を接種する。用いる発酵槽のタイプは重要ではないが、現段階で好ましいのは、15L Biola f i t t e (S a i n t - G e r m a i n - e n - L a y e , F r a n c e) での運用である。

【0150】

本発明による酵素を発酵ブロスから回収して精製する作業を、それ自体は従来技術において周知の手法を用いて実施することも可能である。発酵ブロスは通常、細胞残屑（細胞を含む）、さまざまな懸濁固体および他のバイオマス汚染物質ならびに、本発明による所望の酵素産物（好ましくは従来技術において周知の手段によって発酵ブロスから取り出される）を含有する。これを取り出すための好適なプロセスとして、遠心分離、濾過、透析、精密濾過、回転真空濾過、あるいは他の周知のプロセスなど、無細胞濾液を生成するための従来の固液分離技術があげられる。限外濾過、蒸発または沈殿などの技術を用いて、発酵ブロスまたは無細胞濾液をさらに濃縮すると好ましいこともある。上清または濾液のタンパク質成分の沈殿は、硫酸アンモニウムなどの塩によって達成してもよい。また、任意に、結晶化あるいは、イオン交換クロマトグラフィ、親和性クロマトグラフィなどの多岐にわたるクロマトグラフによる手法または同様の従来技術で認識されている手法によって、さらに精製を実施してもよい。

【0151】

フィターゼ。

フィチン酸（myo-イノシトールヘキサキスリン酸塩）は、穀類、マメ科植物、油糧種子作物における重要な構成成分のひとつである。塩形態でのフィチン酸塩は、これらの植物での亜リン酸の主要な貯蔵形態である。

【0152】

本明細書で使用する場合、「フィターゼ」または「フィターゼ活性」という用語は、フィチン酸塩の加水分解を触媒して、（1）myo-イノシトールおよび／または（2）そのモノー、ジー、トリー、テトラーおよび／またはペンターリン酸塩、（3）無機リン酸塩を生成できるタンパク質またはポリペプチドを示す。たとえば、E n z y m e C o m

mission ECのEC番号3. 1. 3. 8またはEC番号3. 1. 3. 26に定義された触媒活性を有する酵素。

【0153】

フィチン酸塩だけでなく、いくつかのフィターゼも、リン酸化の中間過程であるイノシトールリン酸塩を少なくともいくつか加水分解可能である。

【0154】

「フィターゼ変異体」または「変異体」または「修飾された形態」という表現は、親フィターゼのアミノ酸配列由来のアミノ酸配列を有し、1つ以上のアミノ酸置換、挿入および/または欠失（これらをまとめて「突然変異」と呼ぶ）を有するフィターゼ酵素を示す。

10

【0155】

「親フィターゼ」または「親酵素」という用語は、フィターゼ変異体の誘導元であるフィターゼ酵素を示す。親フィターゼは野生型フィターゼであってもよいし、別のフィターゼ変異体であっても構わない。特に、本発明では、「親フィターゼ」は、国際公開第99/08539号パンフレット、米国特許第5876997号明細書、同第6190897号明細書、オーストラリア特許第735371号明細書、欧州特許第1003379号明細書、特開2001-514869号公報（いずれも本明細書に援用する）に記載されているようなブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. または大腸菌 (*E. coli*) 由来のものであってもよい。好適には、「親フィターゼ」は、国際公開第2006/043178号パンフレットに記載されているような、受託番号NCIMB41248で寄託されたブチアウクセラ (*Buttiauxella*) 株P1-29由来のものである。

20

【0156】

「大腸菌 (*E. coli*) フィターゼ」および「ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. フィターゼ」という用語は、この酵素が、大腸菌 (*E. coli*) またはブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. の起源から得られたものである必要はないことを意味する。そうではなく、この酵素は、好ましくは、大腸菌 (*E. coli*) またはブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. フィターゼと同じ機能的な特徴または配列を有するべきものである。たとえば、ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. フィターゼは、ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. 由来の変異体であってもよいが、これは天然にはブチアウクセラ (*Buttiauxella*) 種に存在するものではない。

30

【0157】

「ブチアウクセラ (*Buttiauxella*)」という用語は、腸内細菌科の通性嫌気的なグラム陰性細菌属を示し、ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) spp は、ブチアウクセラ・アグレスライス (*B. agrestis*)、ブチアウクセラ・ブレンネラーゼ (*B. brennerase*)、ブチアウクセラ・フェラグティアエ (*B. ferragutiae*)、ブチアウクセラ・ガビニアエ (*B. gaviniae*)、ブチアウクセラ・イザルディイ (*B. izardii*)、ブチアウクセラ・ノアキアエ (*B. noackiae*)、ブチアウクセラ・ワームボールディアエ (*B. warmboldiae*) を含む。ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) 種の株は、たとえば、American Type Culture Collection (ATCC) およびDSMZ、German National Resource Centre for Biological Materialから入手可能である。

40

【0158】

ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼは、好ましくは、国際公開第2006/043178号パンフレットに記載の方法によって、ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sppから同定される。

【0159】

50

別の実施形態では、親フィターゼまたはフィターゼが、国際公開第2006/038062号パンフレットに記載されているようなシトロバクター (*Citrobacter*) sp. 由来のものであってもよい。

【0160】

「野生型フィターゼ」または「野生型」という用語は、本明細書で使用する場合、天然に見られるアミノ酸配列を有するフィターゼ酵素についていうものである。特に、野生型ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) フィターゼは、配列番号1として示すものである。野生型大腸菌 (*E. coli*) フィターゼは、配列番号13 (図27) として示すものである。

【0161】

「フィターゼ変異体」という用語は、本明細書で使用する場合、配列番号1または配列番号13のフィターゼのアミノ酸配列と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、挿入および/または欠失が異なるアミノ酸配列を有するフィターゼ酵素を意味する。「変異体」および「変異」という用語は、本明細書で使用する場合、単にフィターゼ変異体のアミノ酸配列と配列番号1または13のアミノ酸配列との間に配列差があることを意味するだけであり、配列番号1または13のアミノ酸配列または他のフィターゼが何らかの形で開始材料として機能するおよび/または変異体を得るために物理的に改変、突然変異、修飾またはその他の変更を加えられたことを意味するものではない。簡単に言うと、本発明に用いるフィターゼ変異体は、任意の方法で調製すればよいものであり、当業者であれば多数の方法（そのうちのいくつかを本明細書で説明する）に容易になじんでフィターゼ変異体を生成できよう。

【0162】

本発明に用いる変異体フィターゼ（変異体ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. フィターゼなど）の実施形態が、国際公開第2006/043178号パンフレット、同第2008/097619号パンフレット、国際特許出願第PCT/US2009/41011号（いずれも具体的に本明細書に援用する）に開示され、そこでは親ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. から得られるまたは誘導されるフィターゼならびに、ブチアウクセラ (*Buttiauxella*) sp. フィターゼ酵素に対応するフィターゼについて説明されている。具体的には、国際公開第2006/043178号パンフレットには、そこに配列番号3として開示された配列を有する野生型フィターゼ酵素の突然変異誘発が記載されている。国際公開第2006/043178号パンフレットには、多数の好ましい突然変異が教示されている。国際特許出願第PCT/US2009/41011号は、さらに好ましい突然変異を教示している。具体的な好ましい突然変異が、そこには配列番号2～6として開示され、その内容は以下のとおりである。

フィターゼBP-11 (BP 11とも呼ばれることがある) —これは、少なくとも国際公開第2006/043178号パンフレットに記載されたフィターゼであり、Danisco A/Sから入手してもよいものである。このアミノ酸配列を、本明細書では配列番号6として説明する。フィターゼBP-17 (BP 17とも呼ばれることがある) —これは、少なくとも国際公開第2008/097619号パンフレットに記載され、Danisco A/Sから入手してもよいフィターゼである。このアミノ酸配列を、本明細書では配列番号3として説明する。

【0163】

BP-110 (BP 17 var. 110とも呼ばれることがあり、あるいはBP 17-110またはBP 17 110とも呼ばれることもある) —これは、少なくともPCT出願第PCT/US2009/41011号に記載されたフィターゼである。このアミノ酸配列を、本明細書では配列番号4として説明する。

【0164】

BP-111 (BP 17 var. 111とも呼ばれることがあり、あるいはBP 17-111またはBP 17 111とも呼ばれることもある) —これは、少なくともPCT

10

20

30

40

50

出願第 P C T / U S 2 0 0 9 / 4 1 0 1 1 号に記載されたフィターゼである。このアミノ酸配列を、本明細書では配列番号 5 として説明する。

【0165】

B P - 1 1 2 (B P 1 7 v a r . 1 1 2 と呼ばれることがあり、あるいは B P 1 7 - 1 1 2 または B P 1 7 1 1 2 と呼ばれることもある) - これは、少なくとも P C T 出願第 P C T / U S 2 0 0 9 / 4 1 0 1 1 号に記載されたフィターゼである。このアミノ酸配列を、本明細書では配列番号 2 として説明する。

【0166】

B P - 1 1 (配列番号 6)、B P - 1 7 (配列番号 3)、B P - 1 1 0 (配列番号 4)、B P - 1 1 1 (配列番号 5)、B P - 1 1 2 (配列番号 2) のアミノ酸配列を図 3 に示す。

10

【0167】

配列番号 1 ~ 6 と、配列番号 1 ~ 6 を含むポリペプチドとを参照すると、これは発現時に、たとえばシグナルペプチド切断によって同時翻訳または翻訳後処理されたポリペプチドも示すことが想定される。翻訳後の切断は、C 末端でも起こり得る。したがって、好ましい実施形態では、その有効フラグメント (その機能的フラグメントとも呼ばれる) が、天然の宿主または好適で適切な発現宿主によって産生された成熟ポリペプチドである。

【0168】

もうひとつの実施形態では、フィターゼが、国際公開第 2 0 0 6 / 0 4 3 1 7 8 号パンフレットに記載されているような、受託番号 N C I M B 4 1 2 4 8 で寄託されたブティアウクセラ (B u t t i a u x e l l a) s p . 株 P 1 - 2 9 由来のものであることを特徴とする。

20

【0169】

本発明による飼料用サプリメントは、親フィターゼのアミノ酸配列の 1 種類以上のアミノ酸残基が修飾された結果として親フィターゼの特徴が改善されたフィターゼを含むものであってもよい。

【0170】

本発明に用いる改善されたフィターゼ酵素は、好ましくは、配列番号 3 またはその有効フラグメントに対する同一性が 7 5 % を超え、好ましくは 8 0 % を超え、一層好ましくは 9 0 % を超え、一層好ましくは 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % を超え、好ましくは 9 9 % を超える。しかしながら、変異体が配列番号 3 に対して異種 (すなわち相同的ではない) であってもよいことも想定される。たとえば、エキソ型 (e x o - m e d i a t e d) 組換えまたはファミリーシャフリングなどの組換え技術によって産生される変異体が、変異体を生んでもよいが、親フィターゼを用いて調製すると相同率 7 5 % 未満のこともある。

30

【0171】

好適には、変異体が、以下のうちのいずれか 1 つに関して向上した安定性の特徴を示す。熱安定性、熱活性、p H 範囲、ペプシン安定性、比活性、基質特異性、一層広い基質特異性。これらの特徴を判断するための好適な方法を、本明細書で開示する。

【0172】

高めの温度、低めの p H などでの安定性といった特性に関する文脈での「向上した安定性」という表現は、ブティアウクセラ (B u t t i a u x e l l a) の場合は配列番号 1 などの指定された別のフィターゼと比較して、経時的に保持された酵素活性が高いことを示す。別のフィターゼを具体的に指定しないかぎり、本明細書で使用する「向上した安定性」という表現は、配列番号 1 のフィターゼよりも経時的に保持された酵素活性が高いことを示す。

40

【0173】

「熱的に安定した」および「熱安定性の」とは、上昇した温度への曝露後に規定量の酵素活性を保持する本開示のフィターゼを示す。本開示によるフィターゼ変異体は、緩衝液中にて p H 5 . 5 で、規定の温度に 1 0 分間曝露した後に酵素がその活性の 5 0 % より多

50

くを保持する場合に、規定の温度で熱安定性であるとみなされる。

【0174】

「向上した熱活性」という用語は、本開示のフィターゼ変異体に関するものであるため、フィターゼ変異体が、配列番号1などのもうひとつの指定されたフィターゼのフィターゼ酵素活性と比較して、上昇した温度で、フィターゼ酵素活性の量が同一または増えていることを意味する。別のフィターゼを具体的に指定しないかぎり、本明細書で使用する「改善された熱活性」という表現は、配列番号1のフィターゼの熱活性と比較した本開示のフィターゼ変異体の熱活性を示す。

【0175】

国際公開第2006/043178号パンフレット、同第2008/097619号パンフレット、国際特許出願第PCT/US2009/41011号（これらの開示を本明細書に援用する）に記載されたような本開示の変異体について、以下の命名法で記載する。〔配列番号1の元のアミノ酸残基／配列番号1における元のアミノ酸残基の位置／置換後のアミノ酸残基〕。たとえば、配列番号2では、配列番号1の89位における元のアラニン（A）がトレオニン（T）で置換されたものを、A89Tで表す。具体的なアミノ酸を提案することなく本明細書で置換に適した位置を指定する場合、その位置に存在するアミノ酸残基をどのアミノ酸残基でも置換できることを理解されたい。変異体フィターゼが他のフィターゼと比較して欠失を含む場合、この欠失を「*」で示す。たとえば、配列番号1のA89位の欠失をA89*で表す。2つ以上の連続したアミノ酸の欠失は、たとえば、（89～91）*のように示される。

【0176】

「～由来の」および「～から得られる」という表現は、対象となる生物体の株によって産生されるか産生可能なフィターゼだけでなく、このような株から単離されたDNA配列によってコードされ、当該DNA配列を含む宿主生物で産生されるフィターゼも示す。また、これらの表現は、合成および／またはcDNA由来のDNA配列によってコードされ、対象となるフィターゼの識別的な特徴を有するフィターゼも示す。したがって、別のフィターゼ「由来の」および別のフィターゼ「から得られる」フィターゼは、そのフィターゼが第2のフィターゼに物理的に由来または第2のフィターゼから物理的に得られることを必ずしも意味するものではなく、対象となるフィターゼが、第2のフィターゼについての知識に由来する知識またはアイデアを用いて調製されたことを意味し得る。

【0177】

特に、フィターゼの特徴の改善は、改善された変異体を飼料用サプリメントとして用いるのに特に適したものに、食品および飼料加工条件下での酵素の安定性、胃部通過時の酵素の安定性、ヒトまたは動物の胃および／または胃腸管における酵素活性および安定性に関連する。よって、このような改善は、他のパラメータの中に、上昇した温度、好ましくは65℃を超える温度での安定性の増加、タンパク質分解消化、好ましくはペプシンなどの消化管のプロテアーゼに対する安定性の増加、低pHでの触媒活性、好ましくはpH5.5未満の触媒活性の増加、フィチン酸塩からリン酸塩基、好ましくはさらにリン酸イノシトールを放出する全体的な効率を含む。

【0178】

このため、いくつかの実施形態では、本発明は、親フィターゼと比較した場合に、国際公開第2006/043178号パンフレット、同第2008/097619号パンフレット、国際特許出願第PCT/US2009/41011号に開示された位置および／または配列番号1のアミノ酸配列に示すようなフィターゼと相同的なフィターゼにおける対応する位置の1つ以上に変異を含む、特徴が改善されたフィターゼ変異体を含む飼料用サプリメントに関する。これらの位置は、これらの位置の突然変異誘発によって酵素の特徴が改善されることを特徴とする。

【0179】

熱安定性（熱安定性差）が一層高い変異体は、好ましくは、国際公開第2006/043178号パンフレットに開示された方法で判断される。

【0180】

本発明に用いる変異体フィターゼ酵素は、好ましくは、熱安定性差（T₁D）が少なくとも1.5、一層好ましくは2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、最も好ましくは少なくとも20である。

【0181】

タンパク質分解安定性が一層高い変異体は、好ましくは、国際公開第2006/043178号パンフレットに開示された方法で判断される。

【0182】

好ましくは、本発明に用いるフィターゼ酵素変異体は、タンパク質分解安定性（残留活性）が少なくとも45%、好ましくは50%、55%、一層好ましくは少なくとも60%または65%、最も好ましくは少なくとも70%である。

【0183】

好ましくは、本発明に用いるフィターゼ変異体は、比活性がpH4.0でのwt活性の100%を超え、好ましくは105%、110%を超え、一層好ましくは114%を超える。

【0184】

一態様では、好ましくは、アミノ酸配列が精製された形態である。「精製された」という用語は、その配列が比較的純粋な状態にあり、少なくとも1%、5%純粋または10%純粋、一層好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%純粋であることを意味する。好ましい実施形態では、ポリペプチドについて言う場合、先に定義したような純度を、他のポリペプチドからSDS-PAGE電気泳動で精製されるものとして判断する。

【0185】

変異体／誘導体

本発明は、酵素あるいは、このような酵素をコードするヌクレオチド配列の任意のアミノ酸配列の変異体、相同体および誘導体の使用を包含する。

【0186】

変異体アミノ酸配列は、グリシンまたはβ-アラニン残基などのアミノ酸スペーサに加えて、メチル、エチルまたはプロピル基などのアルキル基を含む配列の任意の2つのアミノ酸残基間に挿入できる好適なスペーサ基を含むものであってもよい。別の形態のバリエーションでは、ペプチド形態での1種類以上のアミノ酸残基の存在が必要である旨が、当業者によって十分に理解されるであろう。誤解を避けるために、「ペプチド形態」は、α-炭素置換基が（-炭素ではなく残基の窒素原子上にある変異体アミノ酸残基を示すものとして用いられる。ペプチド形態のペプチドを調製するためのプロセスが、従来技術において周知である。たとえばSimon RJ et al., PNAS (1992) 89 (20), 9367~9371およびHorwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13 (4), 132~134。

【0187】

他の成分

本発明による飼料用サプリメントを、他の成分またはキャリアと組み合わせで使用してもよい。

【0188】

飼料酵素に適したキャリアとしては、マルトデキストリン、石灰石（炭酸カルシウム）、シクロデキストリン、コムギまたはコムギ成分、スクロース、デンプン、アンチフォーム、Na₂SO₄、タルク、PVA、これらの混合物があげられる。加えて、脂肪／ワックス被覆、植物ゴムの添加などをベースにした含む多数の封入技術がある。

【0189】

他の成分の例として、増粘剤、ゲル化剤、乳化剤、バインダー、結晶改質剤、甘味料（人工甘味料を含む）、レオロジー改質剤、安定剤、酸化防止剤、色素、酵素、キャリア、

10

20

30

40

50

ビヒクル、賦形剤、希釈剤、潤滑剤、香味料、着色料、懸濁剤、崩壊剤、造粒バインダーなどのうちの1種類以上があげられる。これらの他の成分は、天然のものであってもよい。これらの他の成分は、化学的および／または酵素的な技術を用いて調製されるものであってもよい。

【0190】

本明細書で使用する場合、「増粘剤またはゲル化剤」という用語は、本明細書で使用する場合、不混和性液体の液滴、空気または不溶性固体の粒子の移動を遅くするか防止して、分離を防ぐ生成物を意味する。

【0191】

ここで使用する「安定剤」という用語は、生成物（食品など）が経時的に変化しないようにする成分または成分同士の組み合わせとして定義される。

10

【0192】

「乳化剤」という用語は、本明細書で使用する場合、エマルションの分離を防止する成分（食品製品の成分など）を示す。

【0193】

本明細書で使用する場合、「バインダー」という用語は、生成物を物理反応または化学反応によって一緒に結合する成分（食品成分など）を示す。

【0194】

「結晶改質剤」という用語は、本明細書で使用する場合、脂肪または水の結晶化に影響する成分（食品成分など）を示す。

20

【0195】

「キャリア」または「ビヒクル」とは、化合物の投与に適した材料を意味し、たとえば、液体、ゲル、溶媒、液体希釈剤、可溶化剤など（非毒性かつ、組成物の成分と有害な形では相互作用しない）など、従来技術において周知のこのような材料を含む。

【0196】

栄養的に許容されるキャリアの例として、たとえば、穀物粒、水、塩溶液、アルコール、シリコン、ワックス、ワセリン、野菜油などがあげられる。

【0197】

賦形剤の例として、微結晶セルロースおよび他のセルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、グリシン、デンプン、乳糖、高分子量ポリエチレングリコールのうちの1種類以上があげられる。

30

【0198】

崩壊剤の例として、デンプン（好ましくはトウモロコシ（corn）、ジャガイモまたはタピオカデンプン）、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウムおよび特定のケイ酸塩複合体のうちの1種類以上があげられる。

【0199】

造粒バインダーの例として、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、スクロース、マルトース、ゼラチン、アカシアのうちの1種類以上があげられる。

【0200】

潤滑剤の例として、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、タルクのうちの1種類以上があげられる。

40

【0201】

希釈剤の例として、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、これらの組み合わせのうちの1種類以上があげられる。

【0202】

他の成分を、同時に（たとえば、一緒に混合物中に含めるか、異なる経路で送達される場合であってもよい）使用してもよいし、逐次的に（たとえば、異なる経路で送達してもよい）使用してもよい。

【0203】

50

本明細書で使用する場合、「動物またはヒトでの消費に適した成分」という表現は、本発明の組成物であるか、栄養面での利点があり、繊維の代用品で、あるいは消費者に対して概して有益な作用があってもよいサプリメントとして本発明の組成物に添加可能な化合物を意味する。

【0204】

一例として、この成分は、アルギン酸塩、キサンタン、ペクチン、ローカストビーンガム（LBG）、イヌリン、グアーガム、ガラクトオリゴ糖（GOS）、フルクトオリゴ糖（FOS）、ラクトスクロース、ダイズオリゴ糖、パラチノース、イソマルトオリゴ糖、グルコオリゴ糖、キシロオリゴ糖などのプレバイオティクスであってもよい。

【0205】

脂肪分解酵素

アシलगリセロールの加水分解を触媒するカルボキシエステラーゼとして定義可能な脂肪分解酵素（EC 3. 1. 1. 3）は、アミラーゼおよびプロテアーゼと一緒に、3つの主要な消化酵素のうちの1つとして生理学的に極めて重要な酵素である。この酵素は、脂質をグリセロールと脂肪酸に加水分解するが、エステル化またはトランスエステル化反応においても機能し得る。

【0206】

好ましい実施形態では、本発明で使用する脂肪分解酵素は、国際公開第98/45453号パンフレットに開示され、ブタペスト条約に準拠して1997年2月24日にNCIMBに対して、受託番号40863で寄託されているような、糸状菌類アスペルギルス・ツビンゲンシス（*Aspergillus tubingensis*）由来の脂肪分解酵素である。脂肪分解酵素は、アスペルギルス（*Aspergillus*）由来のものであってもよいし、大腸菌（*E. Coli*）などのもうひとつの生物体において組換え的に産生されるものであってもよい旨は、理解できよう。

【0207】

好ましくは、脂肪分解酵素が、配列番号7または8に示すようなアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはこれに対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%であるポリペプチド；または配列番号9または10の配列；または遺伝暗号の縮重がゆえに配列番号9または10とは異なる配列；または配列番号9または10に対する同一性が少なくとも70%、80%、90%、95%、98%または99%である配列を含むヌクレオチド配列の発現によって産生されるポリペプチドを含む。

【0208】

フィターゼに関して開示される特徴の一般的な定義は脂肪分解酵素にも等しく適用可能であり、簡潔にする目的で、本明細書では繰り返していない旨は理解できよう。

【0209】

別の好ましい実施形態では、本発明で使用する脂肪分解酵素が、本明細書で開示するように、トリコデルマ・リーセイ（*Trichoderma reesei*）細胞で産生される。

【0210】

脂肪分解酵素を産生する方法は、

(i)

a) 配列番号7または配列番号8として示されるアミノ酸配列または配列番号7または8に対する配列同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および/または

b) ヌクレオチド配列が、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列として示されるヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および/または

c) ヌクレオチド配列が、ストリンジェントな条件下で、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%である

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列またはこれらの相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

d) ヌクレオチド配列が、遺伝暗号の縮重以外は配列番号9または配列番号10として示されるものとヌクレオチド配列と同一である、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；

を含むトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞を提供するステップと、

(ii) 前記脂肪分解酵素をコードする前記異種のヌクレオチド配列の発現を可能にする条件下で細胞を培養するステップと、を含む。

【0211】

本明細書で定義するように、ストリンジェントな条件という表現は、50℃および0.2×SSC {1×SSC=0.15MのNaCl、0.015MのNa3クエン酸塩pH7.0}での洗浄を示すことは理解できよう。

【0212】

これらの条件も、本明細書では65℃および0.1×SSC {1×SSC=0.15MのNaCl、0.015MのNa3クエン酸塩pH7.0}での洗浄として定義される高ストリンジェントな条件であってもよいことは、理解できよう。

【0213】

あるいは、

(i) トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞を、

a) 配列番号7または配列番号8として示されるアミノ酸配列または配列番号7または8に対する配列同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

b) ヌクレオチド配列が、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列として示されるヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

c) ヌクレオチド配列が、ストリンジェントな条件下で、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列またはこれらの相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

d) ヌクレオチド配列が、遺伝暗号の縮重以外は配列番号9または配列番号10として示されるものとヌクレオチド配列と同一である、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；

とトランスフェクトまたはトランスフォームするステップと、

(ii) 前記脂肪分解酵素をコードする前記異種のヌクレオチド配列の発現を可能にする条件下で細胞を培養するステップと、を含む、脂肪分解酵素を産生する方法が得られる。

【0214】

さらに、

(i) トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞を、

a) 配列番号7または配列番号8として示されるアミノ酸配列または配列番号7または8に対する配列同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

b) ヌクレオチド配列が、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列として示されるヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

c) ヌクレオチド配列が、ストリンジェントな条件下で、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%である

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列またはこれらの相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

d) ヌクレオチド配列が、遺伝暗号の縮重以外は配列番号9または配列番号10として示されるものとヌクレオチド配列と同一である、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；

とトランスフェクトまたはトランスフォームするステップと、

(i i) 細胞でステップ(i)を繰り返し、この細胞を、(i)(a)、(i)(b)または(i)(c)に定義されたような少なくとも1種類の別の異種のヌクレオチド配列(配列番号7または配列番号8として示されるアミノ酸配列あるいは、配列番号7または8に対する配列同一性が少なくとも40%であるアミノ酸配列を含む脂肪分解酵素をコードする異種のヌクレオチド配列など)と逐次的にトランスフェクトまたはトランスフォームするステップと、

(i i i) 前記脂肪分解酵素をコードする前記異種のヌクレオチド配列の発現を可能にする条件下で細胞を培養するステップと、を含む、脂肪分解酵素を産生する方法が得られる。

【0215】

トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) は、脂肪分解酵素を有意に高収率で産生できる。

【0216】

さらに、本明細書に開示される方法で産生される脂肪分解酵素は、過剰にグリコシル化されておらず、良好な酵素活性を有する。

【0217】

Bradnerらは(*Current Genetics*, 44: 224-230, (2003)において)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) を、かつて知られていない脂肪分解酵素の探索で、発現宿主生物として使用した。ペニシリウム・アリー (*Penicillium allii*) の南極単離物からの脂肪分解酵素をクローンし、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) で発現させた。Bradnerらは、そこに記載の方法が、潜在的に新規な脂肪分解酵素遺伝子を調査するには有用であろうと結論付けたが、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) をタンパク質の過発現に使用可能であるという提案はしていなかった。

【0218】

また、もうひとつの態様で開示されるのが、

(i) 脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列を含む、トランスフォームまたはトランスフェクトされたトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞を提供するステップと、

(i i) 前記脂肪分解酵素をコードする前記異種のヌクレオチド配列の発現を可能にする条件下で、pH4~pH5.5で細胞を培養するステップと、

(i i i) pH5.5~pH6.5の培地にて、酵素を単離、精製または濃縮するステップと、を含む、脂肪分解酵素を産生する方法。

【0219】

この態様では、好ましくは、脂肪分解酵素が、

a) 配列番号7または配列番号8として示されるアミノ酸配列を含むまたは配列番号7または8に対する配列同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を含む；および／または

b) 配列番号9または配列番号10として示される配列を含むか、配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列を含むヌクレオチドによってコードされる；および／または

c) ストリンジェントな条件下で、配列番号9または配列番号10とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むか、配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少

10

20

30

40

50

なくとも70%であるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列またはこれらの相補体によってコードされる；および／または

d)ヌクレオチド配列が、遺伝暗号の縮重以外は配列番号9または配列番号10として示されるものとヌクレオチド配列と同一である、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列である。

【0220】

好適には、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞で、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列があってもよい。トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞で、本発明による脂肪分解酵素をコードするそのまたは各々の異種のヌクレオチド配列の2つ以上のコピー（すなわち複数のコピー）があってもよい。各異種のヌクレオチド配列が、プロモーターと関連し、プロモーターの制御下にある。好適には各異種のヌクレオチド配列が、これと関連し、このプロモーターの制御下にある別のプロモーターを有する。プロモーターは、同一であっても異なっているてもよい。

10

【0221】

よって、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞は、脂肪分解酵素をコードする少なくとも2種類の異種のヌクレオチド配列を含むあるいは、これでトランスフェクトまたはトランスフォームされるものであってもよい。

【0222】

好適には、その（または各）異種のヌクレオチド配列が、シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むものであってもよく、この前記シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が、前記脂肪分解酵素をコードする前記ヌクレオチド配列と作動的に結合されている。複数の異種のヌクレオチド配列があり、2つ以上がこれと関連したシグナル配列を有する場合、これらのシグナル配列は同一であっても異なっているてもよい。

20

【0223】

好適には、脂肪分解酵素は、内在性のシグナルペプチドを含むものであっても、外来性のシグナルペプチドを含むものであってもよい。シグナルペプチドが内在性である場合—これは、シグナルペプチドが天然に産生されるときに脂肪分解酵素と天然でリンクしていることを意味する。たとえば、シグナルペプチドは、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) で見出される場合、脂肪分解酵素と天然でリンクしているアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) のシグナルペプチドであってもよい。

30

【0224】

「異種の」という用語は、本明細書で使用する場合、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞では天然には起こらないことを意味する。言葉をかえると、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞にとっては外来性である。たとえば、「異種のヌクレオチド配列」という用語は、本明細書で使用する場合、ヌクレオチド配列がトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞で天然には起こらないことを意味する。言葉を変えると、このヌクレオチド配列は、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞にとって外来性である。この用語は、このような別の複数のコピーが異種であろうことから、天然に生じる配列の複数のコピーも含む。

40

【0225】

異種のヌクレオチド配列は、微生物、特に真菌から得られるまたは取得可能なものであってもよい。

【0226】

異種のヌクレオチド配列は、アスペルギルス (*Aspergillus*)、特にアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) から得られるまたは取得可能なものであってもよい。

【0227】

50

上記の態様の好ましい実施形態では、前記トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、抑制された非脂肪分解酵素をコードする少なくとも2つの遺伝子を有する。

【0228】

さらに提供されるのが、本発明の方法で取得可能な脂肪分解酵素である。

【0229】

また、提供されるのが、

a) 配列番号7または8に対する配列同一性が少なくとも70%である、脂肪分解酵素タンパク質をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

b) ヌクレオチド配列が、配列番号9または配列番号10または配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列として示されるヌクレオチド配列を含む、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

c) ヌクレオチド配列が、ストリンジェントな条件下で、配列番号9または配列番号10とハイブリダイズされるヌクレオチド配列あるいは、配列番号9または配列番号10に対する配列同一性が少なくとも70%であるヌクレオチド配列あるいは、これらの相補体を含む脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列；および／または

d) ヌクレオチド配列が、遺伝暗号の縮重以外は配列番号9または配列番号10として示されるものとヌクレオチド配列と同一である、脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列を含む、トランスフォームまたはトランスフェクトされたトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞であって、

前記トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、抑制される非脂肪分解酵素をコードする少なくとも2つの遺伝子を有する。

【0230】

好ましくは、前述のいずれかの態様による前記トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、抑制される非脂肪分解酵素をコードする少なくとも3つの遺伝子を有する。

【0231】

好ましくは、前述のいずれかの態様による前記トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、抑制される非脂肪分解酵素をコードする少なくとも4つの遺伝子を有する。

【0232】

「抑制される」とは、細胞が関連の非脂肪分解酵素をトランスフォームされていない／トランスフェクトされていない細胞とは同じレベルでは発現しないことを意味する。いくつかの実施形態では、「抑制された」とは、細胞が関連の非脂肪分解酵素を発現しないことを意味する。抑制は、欠失などの従来技術において周知の技術によって生じ得るものである。

【0233】

好ましくは、抑制された非脂肪分解酵素をコードする遺伝子のうちの少なくとも1つがセルラーゼ遺伝子である。

【0234】

好ましくは、抑制された非脂肪分解酵素をコードする遺伝子のうちの少なくとも2つがセルラーゼ遺伝子である。

【0235】

抑制された非脂肪分解酵素をコードする遺伝子のうちの少なくとも1つの一例が、セロビオヒドロラーゼをコードする遺伝子 (CBHI または CBHI I など) である。

【0236】

抑制された非脂肪分解酵素をコードする遺伝子のうちの少なくとも1つのもうひとつの例が、エンドグルカナーゼをコードする遺伝子 (EGI および EGI I など) である。

【0237】

いくつかの実施形態では、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、セロビオヒドロラーゼ (CBHI および CBHII) の一方または両方および／またはエンドグルカナーゼ (EGI および EGI I) の一方または両方をコードする内在性遺伝子が欠失または破壊された細胞である。好適には、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞は、非GMM細胞またはその誘導体、たとえば株 RL-P37 の誘導体であってもよい。好適には、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、実施例 7 に記載の方法を用いて産生される株 RL-P37 の誘導体であってもよい。

【0238】

10

いくつかの実施形態では、異種のヌクレオチド配列が、配列番号 7 または配列番号 8 に対する配列同一性が少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 98% であるアミノ酸配列を含む脂肪分解酵素をコードするものであってもよい。

【0239】

いくつかの実施形態では、異種のヌクレオチド配列が、脂肪分解酵素をコードするものであってもよく、配列番号 9 または配列番号 10 に対する配列同一性が少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 98% であるヌクレオチド配列を含む。

【0240】

20

好ましくは、異種のヌクレオチド配列が、配列番号 7 または配列番号 8 に対する配列同一性が少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 98% であるアミノ酸配列を含む脂肪分解酵素をコードする。

【0241】

好ましくは、異種のヌクレオチド配列が、脂肪分解酵素をコードし、配列番号 9 または配列番号 10 に対する配列同一性が少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または少なくとも 98% であるヌクレオチド配列を含む。

【0242】

30

配列番号 9 (本明細書ではリパーゼ 3 と呼ぶ) 由来の配列を有するアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 由来の脂肪分解酵素に対する多数の脂肪分解酵素のアミノ酸配列同一性を、以下の表 1 に示す。

【0243】

【表 2】

表 1-アスペルギルス・ツビンゲンシス(*Aspergillus tubingensis*)(リパーゼ 3 からの脂肪分解酵素に対する配列同一性を有する脂肪分解酵素

異なる真菌からの脂肪分解酵素	受託番号	アミノ酸配列同一性(%)
A. niger CBS 513.88	XP_001397501.1	93
<i>Aspergillus niger</i>	ABG73613.1	93
<i>Aspergillus niger</i>	ABG37906.1	93
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSCA4	XP_681315.1	61
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001276337.1	57
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	XP_001266329.1	60
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_748138.1	59
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	XP_001818694.1	56
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001218444.1	54
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	CAP96359.1	55
<i>Aspergillus niger</i>	ABG73614.1	54
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001393532.1	53
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	O59952.1	50
<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	XP_002147144.1	49
<i>Aspergillus oryzae</i> R	XP_001824529.1	44
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	XP_001796872.1	45
<i>Penicillium cyclopium</i>	P61869.1	42
<i>Penicillium camemberti</i> .	1TIA A.	42

【0244】

トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞は、どのようなトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞であってもよい。この細胞は、野生型トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞とみなされるものであってもよい。トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞は、1つ以上の分泌されるセロビオヒドロラーゼ (CBHI または CBHI I) をコードする遺伝子が、発現しないように欠失または破壊されたものであってもよい。好適には、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞は、非遺伝子組換え細胞またはその誘導体、たとえば株 RL-P37 の誘導体であってもよい。好適には、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞が、実施例 10 に記載の方法を用いて産生される株 RL-P37 の誘導体であってもよい。

【0245】

酵素は、約 3 リットル～約 20 リットルの培養液を含むものであってもよい発酵槽で産生されるものであってもよい。もうひとつの実施形態では、本発明が、10～16 リットル、好ましくは 14 リットル規模の発酵で実施される。一実施形態では、好ましくは、12 リットルを超え、好ましくは約 14 リットルを超える量で発酵が実施される。

【0246】

トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 宿主細胞は、好ましくは、大規模発酵で使用するのに適している。

【0247】

好ましい実施形態では、脂肪分解酵素の生成を業務規模で実施する。この観点で、発酵は、約 50,000 リットルを超える規模、好ましくは約 80,000 リットルを超える

規模、好ましくは約200,000リットルを超える規模の発酵で実施される。

【0248】

一実施形態では、この方法で生成される全タンパク質が、約20g／リットルを十分に上回る。

【0249】

生成される全タンパク質のうち、大半が所望の脂肪分解酵素である。一実施形態では、生成される全分泌タンパク質が、所望の脂肪分解酵素の少なくとも50%をなす。一実施形態では、生成される全分泌タンパク質が、所望の脂肪分解酵素の少なくとも60%をなす。一実施形態では、生成される全分泌タンパク質が、所望の脂肪分解酵素の少なくとも70%をなす。一実施形態では、生成される全分泌タンパク質が、所望の脂肪分解酵素の少なくとも80%をなす。

10

【0250】

好適には、この方法は、脂肪分解酵素の生成についてスクリーニングされた形質転換体（所望の酵素が優先的に選択される高産生体）の選択肢を含むものであってもよい。

【0251】

一実施形態では、好適に、この方法は、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞を、本明細書に定義する脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列でトランスフォームする第1のトランスフォーメーションステップを含むものであってもよく、脂肪分解酵素の生成についてスクリーニングされた形質転換体（所望の酵素が優先的に選択される高産生体）の選択ならびに、選択された形質転換体を、本明細書に定義する脂肪分解酵素をコードする少なくとも1種類の異種のヌクレオチド配列で第2のトランスフォーメーションステップ（すなわち再トランスフォーメーションステップ）した後、脂肪分解酵素の生成についてスクリーニングされた新たな形質転換体（所望の酵素が優先的に選択される高産生体）をさらに選択する。

20

【0252】

いくつかの実施形態では、本発明で使用する脂肪分解酵素が、グリコシル化されたものであってもよい。いくつかの実施形態では、脂肪分解酵素が、N32（配列番号8を用いて番号付けをした場合）または本発明による他の脂肪分解酵素では等価な位置でNグリコシル化されたものであってもよい。この態様は、酵素の活性が酵素のグリコシル化によって破壊または低減されないという点で大きな利点をもたらすものである。理論に拘泥することを望まずに、脂肪分解酵素がアスペルギルス・ツビンゲンシス (*A. tubingensis*) などの他の宿主で産生される際に、その活性の低下を確認でき、これは少なくともN242部位での酵素の過剰なグリコシル化によるものと思われる。

30

【0253】

したがって、本明細書で開示する方法で産生される脂肪分解酵素は、特にN32部位での酵素のグリコシル化の度合いがゆえに、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*A. tubingensis*) などの他の宿主で産生される脂肪分解酵素と区別できる。本発明のいくつかの実施形態では、酵素が、少なくともN32部位でグリコシル化を有する。

【0254】

好適には、脂肪分解酵素はシグナルペプチドを用いて産生されるものであってもよい。言葉をかえると、本発明に用いられる異種のヌクレオチド配列が、シグナルペプチドをコードするその一部を含む。

40

【0255】

シグナルペプチドを、特定の細胞膜を介しての脂肪分解酵素の分泌の指令に用いてもよい。シグナルペプチド配列は、脂肪分解酵素コード配列に対して内在性であっても外来性であってもよい。たとえば、シグナルペプチドは、脂肪分解酵素に対して内在性のシグナルペプチドであってもよく、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) である。あるいは、シグナルペプチドのコード配列を、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) のセロビオヒドロラーゼ遺伝子から取得してもよい（または取得可能であってもよい）。

50

【0256】

しかしながら、選択したトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞の分泌経路に発現された脂肪分解酵素を送ることのできるシグナルペプチドコード配列であれば、どのようなものを使用してもよい。

【0257】

本発明者らが、脂肪分解酵素の発現、脂肪分解酵素のグリコシル化、酵素活性および／または収率のうち1つ以上を改善することに言及する場合、これはこの脂肪分解酵素を発現する従来の方法と比較される。たとえば、もうひとつの宿主生物（すなわち、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) 以外の宿主生物) における脂肪分解酵素の産生と比較して、脂肪分解酵素の発現、脂肪分解酵素のグリコシル化、酵素活性および／または収率が改善される。特に、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) 細胞（たとえば、本明細書に援用するような国際公開第98/45453号パンフレットに教示されているものなど）における同じ脂肪分解酵素の発現と比較して、本発明による脂肪分解酵素（すなわちトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 細胞で産生）の脂肪分解酵素の発現、脂肪分解酵素のグリコシル化、酵素活性および／または収率が改善される。

【0258】

「改善されたグリコシル化」という表現は、本明細書で使用する場合、好ましくは、グリコシル化がN32（配列番号8を用いて番号付けをする場合）で生じることを意味する。理論に拘泥することを望まずに、状況によっては、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) 以外の（特にアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) において）（国際公開第98/45453号パンフレットに教示されているものなど）宿主細胞で産生される脂肪分解酵素を、特にN242でグリコシル化（または過剰にグリコシル化）してもよい。よって、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) 以外の宿主細胞、特にアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*)（国際公開第98/45453号パンフレットに教示されているものなど）で産生される脂肪分解酵素を、N32およびN242部位の両方でグリコシル化してもよい。しかしながら、理論に拘泥することを望まずに、N242部位は、活性部位残基のうちの1つすなわち、配列番号8のHis258の近傍にある。よって、N242部位でのグリコシル化（または過剰なグリコシル化）が、酵素の活性（すなわちリパーゼ活性）の低下につながり得ると考えられている。本発明の脂肪分解酵素では、活性が低下しない。本発明の脂肪分解酵素のグリコシル化は、His258などの活性部位残基から離れたN32部位で起こり得る。

【0259】

「改善された酵素活性」という表現は、本明細書で使用する場合、活性が、天然ではアスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) によって産生される脂肪分解酵素のリパーゼ活性と同じかこれよりも大きいことを意味する。

【0260】

酵素活性によって、本発明者らは少なくともリパーゼ活性を意味する。酵素活性（リパーゼ活性など）については、実施例のセクションで後述する関連のプロトコルを用いて測定可能である。

【0261】

驚くべきことに、本明細書で開示した方法に基づいて産生される脂肪分解酵素は、高い発現レベルが得られるときに、これが排泄された培地—すなわち、培養（発酵）ブローからの単離が容易であることが見出された。

【0262】

よって、この方法は、細胞の培養後に脂肪分解酵素が分泌された培地に対して、以下のステップのうちの1つ以上を必要とするものであってもよい。培地を（好ましくは水で）希釈する；細胞を培地から分離する；培地（好ましくは前記培地が無細胞である）を濃縮す

る；前記培地（好ましくは前記培地は無細胞である）を顆粒化する。

【0263】

この方法は、細胞の培養後に酵素が分泌された培地に対して、以下のステップを必要とするものであってもよい。培地を（好ましくは水で）希釈する；細胞を培地から分離する；培地（好ましくは前記培地が無細胞である）を濃縮する；任意に前記培地（好ましくは前記培地は無細胞である）を顆粒化する。

【0264】

この方法は、細胞の培養後に任意に、酵素が分泌された培地に対して以下のステップの実施を必要とする。培地を（好ましくは水で）希釈する；細胞を培地から分離する；培地（好ましくは前記培地が無細胞である）を濃縮する；前記培地（好ましくは前記培地は無細胞である）を顆粒化する。

10

【0265】

好ましくは、この方法は、細胞の培養後に、酵素が分泌された培地に対して以下のステップを必要とする。培地を水で希釈する；細胞を培地から分離する；本明細書では培地が無細胞である前記培地を濃縮する；任意に本明細書では前記培地が無細胞である前記培地を顆粒化する。

【0266】

好ましい態様では、この方法は、細胞の培養後に、酵素が分泌された培地に対して以下のステップを必要とする。培地を水で希釈する；細胞を培地から分離する；本明細書では培地が無細胞である前記培地を濃縮する；本明細書では前記培地が無細胞である前記培地を顆粒化する。

20

【0267】

好ましくは、脂肪分解酵素が発酵ブロスの溶液から析出する。好ましくは、脂肪分解酵素沈殿物をpH調整によって再溶解させる。好ましくは、発酵ブロスのpHを超えるpHまでpHを調整する。

【0268】

上述した利点に加えて、方法によって産生される酵素のもうひとつの利点に、脂肪分解酵素の商業規模での生成が可能だということがある。この方法は、脂肪分解酵素を高収率で産生できるようにするものである。

【0269】

30

本明細書に開示される脂肪分解酵素の一つの利点に、トランスフォーメーションおよびスクリーニングステップ（すなわち、マイクロタイタープレートからのsay）から直接的に大規模発酵（少なくとも14リットル発酵など）に直接的に行くことができる旨が、驚くべきことに見出されたことがある。驚くべきことに、スクリーニングステップ（特にマイクロタイタープレートの結果）は、大規模発酵における良好な結果の高い前兆となるため、これが可能である。これは、大きめの規模の発酵に移す前に株をフラスコ内で培養することが頻繁に必要な従来の方法とは対照的である）。これには、生成時間の短縮および／または全体としての手法の単純化および／またはコスト削減に大きな利点がある。

【0270】

40

別の利点として、本明細書に記載の方法を用いると、脂肪分解酵素を発現する従来の方法と比較して、この脂肪分解酵素の発現の増大／増加および／または収率の改善がなされることがあげられる。たとえば、別の宿主生物（すなわちトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）以外の宿主生物）における脂肪分解酵素の生成と比較して、脂肪分解酵素の発現の増大／増加および／または収率の改善が得られる。特に、アスペルギルス・ツビンゲンシス（*Aspergillus tubingensis*）細胞（たとえば、本明細書に援用する国際公開第98／45453号パンフレットに教示されているようなもの）における脂肪分解酵素の発現と比較して、同じ脂肪分解酵素（すなわちトリコデルマ・リーセイ（*Trichoderma reesei*）細胞で産生）の発現の増加および／または収率の改善が得られる。

50

【0271】

別の利点に、本明細書で開示した方法で産生される脂肪分解酵素が、容易に産生および単離および／または精製および／または濃縮されることがある。

【0272】

別の利点に、ここに開示の方法で産生される脂肪分解酵素が、容易に再可溶化されることがある。

【0273】

別の利点に、ここに開示の方法で産生される脂肪分解酵素を、顆粒または溶液として使用してもよいことがある。

【0274】

脂肪分解酵素

「脂肪分解酵素」という用語は、本明細書で使用する場合、トリアシルグリセロール加水分解活性（E. C. 3. 1. 1. 3として分類）を有する酵素を意味する。

【0275】

好適には、本発明で使用する脂肪分解酵素は、以下の追加の活性のうち1つ以上を呈するものであってもよい。グリコリパーゼ活性（E. C. 3. 1. 1. 26）、ホスホリパーゼA2活性（E. C. 3. 1. 1. 4）、ホスホリパーゼA1活性（E. C. 3. 1. 1. 32）またはホスホリパーゼB活性（E. C. 3. 1. 1. 5）。「グリコリパーゼ活性」という用語は、本明細書で使用する場合、「ガラクトリパーゼ活性」を包含する。

【0276】

単離された

一態様では、好ましくは、本発明で使用する脂肪分解酵素が、単離された形態である。「単離された」という表現は、脂肪分解酵素が天然で自然に関連し、天然に見られるものとしての少なくとも1種類の他の成分を、脂肪分解酵素が少なくとも実質的に含まないことを意味する。「単離された」という表現は、脂肪分解酵素が産生される培養液中の少なくとも1種類の他の成分を、脂肪分解酵素が少なくとも実質的に含まないことを意味することもある。本発明の脂肪分解酵素は、そうでなければこの物質に関連しているまたは、それを用いて酵素が産生される1種類以上の汚染物質を実質的に含まない形態で提供できるものである。

【0277】

よって、たとえば、細胞または1種類以上の潜在的に汚染性のポリペプチドおよび／または核酸分子を実質的に含まないものであってもよい。脂肪分解酵素を単離するには、発酵中または発酵後に、脂肪分解酵素がブロスに残るように細胞をブロスから分離すればよい。発酵ブロスに真空濾過で細胞分離をほどこして、脂肪分解酵素を単離してもよい。

【0278】

精製された

一態様では、好ましくは、本発明で使用する脂肪分解酵素が、精製された形態である。「精製された」という表現は、特定の成分が高いレベルで存在することを意味する。この成分は、望ましくは組成物中に存在する主な成分である。好ましくは、これは少なくとも約60%または少なくとも約65%または少なくとも約70%または少なくとも約75%または少なくとも約80%のレベルで存在し、前記レベルは、考慮対象となる全組成物に対して乾燥重量／乾燥重量ベースで判断される。いくつかの実施形態では、量が少なくとも約85%であり、前記レベルは、考慮対象となる全組成物に対して乾燥重量／乾燥重量ベースで判断される。

【0279】

濃縮物

一態様では、好ましくは、本発明で使用する脂肪分解酵素を濃縮物として用いる。濃縮物は、酵素が排泄される培地の濃縮された形態であってもよい。好ましくは、濃縮物は、酵素が分泌される培地の濃縮された形態で、細胞が除去されているものであってもよい。

10

20

30

40

50

【0280】

材料および方法

1. pH 5.5でのリパーゼアッセイ

本明細書で使用する場合、1 L I P U（リパーゼ単位）とは、本明細書で後述する条件下で、1分間に1 μ m o l のH⁺を放出する酵素の量として定義される。

【0281】

15.00 mlのトリブチリン、50.00 mlの乳化剤および235 mlの蒸留水を20秒間ホモジナイザで混合することで、5%（v/v）トリブチリン基質を調製する。0.5 MのNaOHを用いて、基質のpHを約5.4まで調整する。

【0282】

17.9 gのNaClと、0.41 gのKH₂PO₄と、400 mlの蒸留水と、450 mlのグリセロールとを2000 ml容のビーカーで混合して、乳化剤を調製する。強く攪拌しながら、6.0 gのアラビアゴムを加え、アラビアゴムが完全に溶解されるまで攪拌を続ける。この溶液を1000 ml容のメスフラスコに移し、印まで蒸留水を満たす。

【0283】

乾燥試料の場合：メスフラスコに、最終希釈の半分で最終溶液が約3.5 L I P U/mlになるように計算した量の酵素を溶解させ、20分間磁気攪拌した。

【0284】

攪拌後、蒸留水で最終希釈に調節した。以後の希釈は蒸留水を用いて行うものとする。溶液中の試料を直接的に蒸留水で希釈しする。

【0285】

基質25.00 mLを30.0℃に調整する。

【0286】

NaOH/HClを用いて基質のpHを5.50に調整する。

【0287】

攪拌しながら、2.00 mLの試料を加え、すぐにpH-stat滴定装置で開始する。

【0288】

6分後に滴定を停止する。

【0289】

滴定曲線の勾配を計算する。滴定曲線の勾配を3～6分間のデータから計算する。勾配は、間隔0.1～0.2 mL/分でなければならない。

【0290】

酵素の活性（L I P U/g）については、以下の式を用いて求める。

【数1】

$$\text{LIPU/g} = \frac{\text{ml/分} \times N \times 1000 \times F \times \text{トリブチリンの因子}}{A \times 2}$$

ml/分：滴定曲線の勾配

N：NaOHの規定度

F：試料の希釈

A：秤量した試料のグラム数

2：ml 試料

【0291】

2. pH 3.5でのリパーゼアッセイ

1 L P L U（低pHリパーゼ単位）は、本明細書で後述する条件下で、1分間で1マイクロ当量の遊離脂肪酸を産生する酵素の量として定義される。

【0292】

トリオクタン酸塩基質：0.15%のトリオクタン酸塩グリセロール、13%のTri

10

20

30

40

50

ton X-100、0.3%のNaCl、120mMのグリシン-HCl、pH3.5。すべての成分を混合した後、1時間攪拌して、基質を調製した。

【0293】

酵素試料溶液を50mMのグリシン-HCl、pH3.5中で希釈する。

【0294】

Konelab分析ロボット(Thermo, Vantaa, Finland)を用いてアッセイを実施する。50μlのトリオクタン酸塩基質を30℃で3分間平衡化した上で10μlの酵素試料溶液と混合し、30℃で6分間インキュベーションする。NEFA-HR(2)キット(WAKO Chemicals GmbH)を用いて反応混合物中の遊離脂肪酸を測定した。110μlのNEFA試薬R1を反応混合物に加え、55μlのNEFA試薬R2を加えるまで30℃で3分間インキュベートする。インキュベーションを30℃でさらに4.5分間継続した上で、OD_{520nm}を測定する。遊離脂肪酸の含有量を、NEFA標準(WAKO Chemicals GmbH)から作製した標準曲線から計算する。

10

【0295】

1LPLUは、アスペルギルス・ツビンゲンシス(*Aspergillus tubingensis*)リパーゼ(図5、配列番号7)の0.24LIPUに対応する。

【0296】

2. フィターゼアッセイ

本明細書で使用する場合、1FTU(フィターゼ単位)とは、本明細書で定義した反応条件下で、1分間に1μmolの無機オルトリン酸塩を基質から放出するのに必要な酵素の量として定義される

20

【0297】

原理:

フィターゼをフィチン酸ナトリウムと一緒にインキュベートすると、無機リン酸塩が放出される。無機リン酸塩は、モリブデン酸塩-バナジン酸塩試薬との間で色のついた錯体を形成し、これによって黄色に変わる。錯体の黄色の色を分光光度計にて415nmで測定する。

【0298】

リン酸塩の標準曲線を用いる絶対法によって活性を定量化する。

30

【0299】

試薬:

1. 1 酢酸緩衝液(pH5.5) 0.25M 1000mL

溶解:

30.02gのナトリウム酢酸塩-三水和物(18, 10gナトリウム酢酸塩-無水物)

、

0.147gの塩化カルシウム-二水和物、

約900mLの水中、1.76gの100%酢酸(=1.677mL、密度=1.0498g/mL)

4Mの酢酸(100.0mLの脱イオン水中、22.9mLの濃酢酸)を用いてpHを5.5に調整し、溶液を1000mL容のメスフラスコに移す。

40

【0300】

1mLの10%Tween 20を加え、脱イオン水を加えて溶液を1000mLに調整する。

【0301】

1. 2 リン酸二水素カリウム18mM 1000mL

標準曲線で用いる溶液をストックする

加熱用の戸棚中、60℃で一晩、KH₂PO₄を乾燥させる。

【0302】

2. 45gの乾燥KH₂PO₄を秤量し、酢酸緩衝液(1.1)中で希釈する。1000

50

. 0 mL に調整する。

【0303】

1. 3 フィチン酸塩溶液 (基質) 7. 5 mM 250 mL

溶解:

200 mL の酢酸緩衝液中、2. 10 g (±0. 05 g) のフィチン酸ナトリウム、十水和物 (フィチン酸)。

【0304】

水浴中、溶液を 37 °C までサーモスタット処理する。

【0305】

37 °C で、4 M の酢酸 (24 g = 100. 0 mL の脱イオン水中 22. 9 mL 濃酢酸) 10
を加えて、pH を pH 5. 5 に調整する。

【0306】

酢酸緩衝液を添加したことで、250. 0 mL まで調整する。

【0307】

フィチン酸のもうひとつのロットに変更するときに、基質補正因子が必要な場合もある。

【0308】

フィチン酸 Sigma P0109、回分 057K0049 を、補正因子を 1, 00 に定義する。

【0309】

20

1. 4 硝酸溶液 24. 5 % 200 mL

(バナジウム酸アンモニウム溶液の場合)

75 mL の硝酸 65 % を連続攪拌下で 100 mL の水に加える。

【0310】

この溶液を 200 mL 容のメスフラスコに移し、脱イオン水で調整する。

【0311】

1. 5 アンモニウム溶液 25 % 50 mL

(ヘプタモリブデン酸アンモニウム溶液の場合)

40 mL の 32 % アンモニウム溶液を水で 50 mL に調整する。

【0312】

30

1. 6 ヘプタモリブデン酸アンモニウム溶液 10 % 250 mL

(着色/停止試薬の場合)

溶解:

225 mL の水中、25 g のヘプタモリブデン酸アンモニウム一五水和物。この溶液では、アンモニウム溶液を加える前に、ヘプタモリブデン酸アンモニウムを溶解させるのに加熱が必要である。

【0313】

2. 5 mL のアンモニウム溶液 (25 %) (1. 5 参照) を加え、熱を切り、攪拌機にて完全に溶解するまで放置する。

【0314】

40

冷却時、溶液を 250 mL 容のメスフラスコに移し、脱イオン水で調整し、混合する。

【0315】

1. 7 バナジウム酸アンモニウム溶液 0. 24 % 250 mL

(着色/停止試薬の場合)

0. 5875 g のバナジウム酸アンモニウムを、60 °C まで事前に加熱した 100 mL の水に溶解させる)。5 mL の 24. 5 % 硝酸溶液を連続攪拌下でゆっくりと加える。

【0316】

冷却時、溶液を 250 mL 容のメスフラスコに移し、脱イオン水で調整し、混合する。

【0317】

1. 8 着色/停止試薬 200 mL

50

使用する直前に調製すべきである。

【0318】

50 mL のヘプタモリブデン酸アンモニウム溶液（10％）を200 mL 容のメスフラスコに分注した後、50 mL のバナジウム酸アンモニウム溶液（0.24％）を分注する。33 mL の65％硝酸を連続攪拌下で分注する。脱イオン水を加えて200.0 mL に調整し、混合する。

【0319】

【表3】

反応条件

pH = 5.5

インキュベーション温度 = 37°C±0.1°C

インキュベーション時間 = 60 分間

10

【0320】

リン酸塩標準曲線の作製（絶対法）

KH₂PO₄緩衝液（1.2）を用いる標準曲線を作製する。標準を酢酸緩衝液で希釈する。

20

【0321】

C_{希釈} = 0.0 mM、0.5 mM、1.0 mM、1.5 mM、2.0 mM、2.5 mM、3.0 mM、4.0 mM

以下の式を使用する： $C_{\text{ストック溶液}} \times V_{\text{ストック溶液}} = C_{\text{希釈}} \times V_{\text{希釈}}$

$$V_{\text{ストック溶液}} = (C_{\text{希釈}} \times V_{\text{希釈}}) / C_{\text{ストック溶液}}$$

式中、C = 濃度、V = 容量である。

【0322】

【表4】

最終リン酸塩濃度 (mM)	50mL 容のメスフラスコに入れる容量 KH ₂ PO ₄ (18mM)	酢酸緩衝液の容量
0	0,0 mL	50,0 mL
0.5	1,4 mL	48,6 mL
1.0	2,8 mL	47,2 mL
1.5	4,2 mL	45,8 mL
2.0	5,6 mL	44,4 mL
2.5	6,9 mL	43,1 mL
3.0	8,3 mL	41,7 mL
4.0	11,1 mL	38,9 mL

30

【0323】

1.00 mL の標準曲線試料を2.00 mL の着色／停止試薬と混合した後、2.00 mL のフィチン酸塩溶液と混合する。試料を室温で5～10分間インキュベートし、（インキュベーション後に試料で実施するものと同様に）ODを測定する。

【0324】

試料の調製：

1A：液体生成物（約5500 FTU/g）：1 g の試料を100 mL 容のメスフラスコ

40

50

で秤量し、重量を書き取り、メスフラスコを酢酸緩衝液で一杯にする。

【0325】

1 B：乾燥生成物（コムギ／デンプンキャリアだけを用いて配合したフィターゼ）：1 gの生成物をガラスビーカーに秤量する。ディスペンサまたは計量用ガラスを用いて100 mLの酢酸緩衝液を加える。試料をマグネチックスターラーで20分間攪拌する。抽出物をガラスフィルタで濾過する。

【0326】

1 C：乾燥生成物（疎水性の外層を有する被覆顆粒）：乾燥生成物：1 gの生成物をガラスビーカーに秤量する。ディスペンサまたは計量用ガラスを用いて100 mLの酢酸緩衝液を加える。試料をマグネチックスターラーで20分間攪拌する。抽出物を沈殿させ、被覆生成物をガラスフィルタで濾過しないようにする。

10

【0327】

2：試料のさらなる希釈物を調製する。好ましいOD範囲は0.4～1.6である。試料の濃度がわからない場合、活性をアッセイ用の範囲にする一般的な希釈レベルを以下に示す。

【0328】

試料の活性は約0.0300 U/mLでなければならない。

【0329】

希釈物は判定の直前に調製するものとする。

【0330】

20

活性の判定：

すべての試料を同時に分析する一対照、ブランク、試料。アッセイの試行は連続流にしておかなければならない。

【0331】

すべての判定を二重または三重の判定で実施する。

【0332】

各シリーズの最初にブランクを含める。

【0333】

各シリーズの管に対照を含める（フィターゼ対照または活性が知られているPhyzy me XP試料）。

30

【0334】

盲検試料：各試料1.00 mLを2.00 mLの着色／停止試薬と混合した後、2.00 mLのフィチン酸塩溶液を混合する。試料を室温にて60分間インキュベートし、遠心処理し、残りの試料を用いて測定する。

【0335】

試料：

1. 1.00 mLの希釈試料または対照をプラスチック管で2倍または3倍に描く。ブランクについては、1.00 mLの酢酸緩衝液を描く。

2. 37℃に平衡化するまでフィチン酸塩溶液（基質）を37.0℃で最低5分間水浴中におく

40

3. 37.0℃で厳密に5分間、水浴中で試料をインキュベートする。

4. 厳密に5秒間の時間間隔で2.00 mLの平衡化フィチン酸塩溶液を試料に加える。

5. 水浴中にて37.0℃で厳密に60分間インキュベートする。

6. 再び時間間隔5秒間で2.00 mLの着色／停止試薬を加え、蓋をして、上下を5回逆さまにする。

7. 3500 rpmで10分間遠心処理する。

8. 415 nmで測定する。脱塩水を用いて分光光度計をゼロに調節する。

【0336】

活性の計算

50

ブランクのODは ≤ 0.13 でなければならない。そうでない場合、分析を繰り返す必要がある。

データをExcelシートに記入する

標準曲線および傾向線をExcelで作成する。

a) y 軸 = OD₄₁₅

b) x 軸 = mMリン酸塩

c) 勾配 (α) は $0.36 \sim 0.38$ で書かななければならない

d) 切片 (β) は $|0.02|$ を超えてはならない

e) 相関係数 (R^2) は ≥ 0.99 とする

フィターゼ活性を以下のようにして計算する。

【数 2】

$$\text{活性(FTU/g)} = \frac{((\text{OD}_{\text{試料}} - \text{OD}_{\text{ブランク}}) - \beta) * \text{DF}}{\text{インキュベーション時間} * \alpha * W_{\text{試料}}}$$

OD_{試料} = 酵素試料の平均吸光度

OD_{ブランク} = 酵素ブランクの平均吸光度

DF = 試料の希釈係数

インキュベーション時間 = 60 分間

W_{試料} = 試料または対照の重量

α = 標準曲線の勾配

β = 標準曲線の切片

【0337】

pH 3.5でのフィターゼアッセイ:

これは、以下の点を変更した以外、pH 5.5でのフィターゼアッセイと同じである。

1. 1アッセイ緩衝液、グリシン-HCl緩衝液pH 3.5 (1.1酢酸緩衝液pH 5.5の代わりに使用):

0.2Mのグリシン250mlを0.2MのHCl130mLおよび約500mLの脱イオン水と混合する。0.5MのHClまたは0.5MのNaOHを用いてpHを3.5に調整する。この溶液を1000mL容のメスフラスコに移し、溶液を脱イオン水を加えて1000mLまで調整する。

【0338】

1. 3 フィチン酸塩溶液 (基質) 7.5mM (合計250ml):

2. 10g (± 0.05 g) のフィチン酸ナトリウム、十水和物 (フィチン酸) を200mLのアッセイ緩衝液 (グリシンHCl緩衝液pH 3.5) に溶解させる。

【0339】

水浴中、溶液を37℃までサーモスタット処理する。

【0340】

37℃で、4MのHClまたは4MのNaOHを加えて、pHをpH 3.5に調整する。

【0341】

アッセイ緩衝液 (pH 3.5) を添加することで、250.0mLまで調整する。溶液の入った瓶をホイルで包んでおく必要がある。

【0342】

保管寿命: 2週間

フィチン酸のもうひとつのロットに変更するときに、基質補正因子が必要な場合もある。

【0343】

フィチン酸回分128H1234 (Sigma P-3168) の補正因子を1,00に規定する。

10

20

30

40

50

【0344】

この方法での酵素およびリン酸塩の希釈はいずれも、酢酸緩衝液 pH 5.5 ではなくグリシン-HCl アッセイ緩衝液 pH 3.5 で行う。

【実施例】

【0345】

実施例 1－緒言

食品または動物用飼料用の酵素添加剤として効率的にするために、フィターゼは多数の異なる特性を兼ね備えたものでなければならない。フィチン酸を動物の胃の酸性環境で分解できるようにするには、低い pH、好ましくは広い範囲の pH 値で活性でなければならない。また、高い比活性を持つものでなければならず、好ましくは、飼料ペレットなどの飼料原料の調製で一般に用いられる高温にタンパク質が耐えられるだけの高い熱安定性を持つものでなければならない。

10

【0346】

また、酵素がフィチン酸塩だけでなく、五リン酸イノシトール、四リン酸イノシトールおよび三リン酸イノシトールなどのフィチン酸塩分解の中間生成物も加水分解できるように、酵素が広い基質特異性を持つことも重要である。ブタにおけるフィチン酸塩の分解に関する研究で、これらのオリゴリン酸イノシトールは、ほとんどが小腸および大腸で不溶性のまま残り、腸管マイクロフローラおよび動物が産生するアルカリホスファターゼを利用できないことがわかっている。異なる酵素の基質特異性の特性のばらつきも同定した。たとえば、フィターゼによってバチルス・サブティリス (*B. subtilis*) から生成した三リン酸イノシトールは、基本的にこの酵素によるさらなる加水分解に対して耐性である。

20

【0347】

好適には、これらの変異体では、温度安定性、pH 範囲、ペプシン安定性、比活性、基質特異性、広めの基質特異性のうちのいずれか 1 つに関して、特徴の改善が認められる。これらの特徴を判断するための好適な方法を本明細書で開示する。

【0348】

特に、フィターゼの特徴の改善は、改善された変異体を飼料用サプリメントとして用いるのに特に適したものに、食品および飼料加工条件下での酵素の安定性、胃部通過時の酵素の安定性、ヒトまたは動物の胃および／または胃腸管における酵素活性および安定性に関連する。よって、このような改善は、他のパラメータの中に、上昇した温度、好ましくは 65℃ を超える温度での安定性の増加、タンパク質分解消化、好ましくはペプシンなどの消化管のプロテアーゼに対する安定性の増加、低 pH での触媒活性、好ましくは pH 5.5 未満の触媒活性の増加、フィチン酸塩からリン酸塩基、好ましくはさらにリン酸イノシトールを放出する全体的な効率を含む。

30

【0349】

フィターゼの特徴の改善は、食品および飼料加工における用途ならびに、食品および飼料生成物用の添加剤として使用することにも関連する。特に、この改善は、食品および飼料加工条件下での安定性、胃部通過時の安定性、ヒトまたは動物の胃および／または胃腸管における活性および安定性に関連する。このような改善は、他のパラメータの中に、上昇した温度、好ましくは 65℃ を超える温度での安定性の増加、タンパク質分解消化、好ましくは消化管のプロテアーゼに対する安定性の増加、低 pH での触媒活性、好ましくは pH 5.5 未満の触媒活性の増加、フィチン酸塩からリン酸塩基を放出する全体的な効率を含む。

40

【0350】

上昇した温度での安定性の増加は、酵素の不活性化温度によって定量化される。不活性化温度は、特定時間のインキュベーションならびに以後の室温までの冷却後のフィターゼ酵素の残留活性が、同じ時間、同じ条件下で室温にてインキュベートした同じフィターゼ酵素の残留活性の 50% である温度として定義される。熱安定性差は、2 つの酵素の不活性化温度間の℃での差である。

50

【0351】

実施例2. ペプシン安定性

Natuphos (BAS F) および Ronozyme P (Novozymes / DSM) と比較した、ブティアウクセラ (Buttiauxella) 由来のフィターゼ、変異体 BP-17、BP-110、BP-111、BP-112、Phyzyme XP の pH 2 でのペプシン耐性。

【0352】

材料および方法

緩衝液:

ペプシンインキュベーション緩衝液: 0.1 M のグリシン-HCl、pH 2.0、3 mg / ml の BSA、2.9 mg の塩化ナトリウム無水 / mL、0.73 mg の塩化カルシウム / mL。ペプシンを含む溶液では、500、1000、3000、6000 または 10000 U / ml のペプシン (Sigma P-7000、10000 U / mg が 27 mg / ml に相当) をそれぞれ含有するように、インキュベーション緩衝液を調製する。1 ペプシン単位は、基質としてヘモグロビン (Food Chemical Codex) を用いて TCA-可溶性産物で測定した場合に、pH 2.0、37 °C で 1 分間の ΔOD_{280} が 0.001 になる酵素の量として定義される。

10

【0353】

フィターゼアッセイ緩衝液: 酢酸緩衝液 250 mM、pH 5.5

BSA を含むフィターゼアッセイ緩衝液: 酢酸緩衝液 250 mM、pH 5.5 に 3 mg / ml の BSA を含む。

20

【0354】

ペプシン濃度を上げた場合の耐性:

すべての酵素のセットアップを同一にした: 酵素を含む 6 つの試料を調製した (二重): 緩衝液 (pH 2) 中のペプシンの量を増やした 4 つの試料、ペプシンを含まないがインキュベーション緩衝液 (pH 2) 中の 1 つの試料、BSA を含むアッセイ緩衝液 (pH 5.5) 中に酵素も含む 1 つの陽性対照試料。

【0355】

各試料で、ペプシンの量を変えないか増やした 900 μ l のインキュベーション緩衝液あるいは、900 μ l のアッセイ緩衝液を、100 μ l の酵素溶液と混合した後、40 °C でインキュベーションした。120 分間のインキュベーション後、100 μ l を抜き取り、900 μ l のアッセイ緩衝液と混合した。ISOドラフト国際標準 ISO / DIS 30024 に記載されているように、pH 5.5 で、リン酸塩標準曲線に対して試料のフィターゼをすみやかに分析した。

30

【0356】

結果

ペプシン耐性

ブティアウクセラ (Buttiauxella) 変異体はいずれも、ペプシンに対して pH 2 で優れた安定性を示した。対照的に、Natuphos の活性は、ペプシン濃度 500 U / ml ですでに劇的に低下し、さらに活性が低下すると、ペプシン濃度 3000 U / ml で約 45 % 回復するプラトーが見られた。Ronozyme P の回復はさらに悪く、ペプシン濃度わずか 500 U / mg で回復の低下が 20 % 未満であった (図 9A)。

40

【0357】

図 9 は、ペプシンの濃度を上げた場合のブティアウクセラ (Buttiauxella)、変異体 BP-17、BP-110、BP-111、BP-112 由来のフィターゼならびに、Phyzyme XP、Natuphos、Ronozyme P の耐性を示す。データは、ペプシンのない pH 2 でのインキュベーションと関連している。A: すべてのデータ点、B: 同じデータであるが、70 % を超えた回復のみを示す。

【0358】

【表 5】

ペプシンレベル	BP-17	BP-17 v. 110	BP-17 v. 111	BP-17 v. 112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyme P, 新規
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
500	87%	96%	98%	85%		61%	19%
1000	81%	98%	96%	85%		51%	16%
3000	82%	96%	94%	84%	93%	44%	17%
6000	82%	92%	89%	80%	89%	45%	18%
10000	86%	95%	94%	79%	98%	46%	21%

表 1. 図 9 に示したものと同一データ

【0359】

10

ブティアウクセラ (Buttiauxella) 変異体間にわずかな差があり、変異体 BP-17 var. 110 が、最高ペプシン濃度 10000 U/mL で 2 時間のインキュベーション後に 95% の活性が残る最もよい安定性を示している (図 9B)。対照的に、BP-17 は 2 時間のインキュベーション後に 85% 前後の回復を見せた。

【0360】

ブティアウクセラ (Buttiauxella) フィターゼは、優れた酸安定性も示した。pH 2 または pH 5.5 のいずれかで 2 時間のインキュベーション後に pH 5.5 で測定した活性を比較すると、pH 2 で 2 時間のインキュベーション時には 4 つのブティアウクセラ (Buttiauxella) フィターゼすべてで活性が失われなかったことが示されたが、Phyzyme XP、Natuphos、新たな Ronozyme P では、活性のわずかな低下から有意な低下 (表 2) が認められた。

20

【0361】

【表 6】

	BP-17	BP-17 v. 110	BP-17 v. 111	BP-17 v. 112	Phyzyme XP	Natuphos	Ronozyme P, 新規
アッセイ緩衝液	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
pH 2, ペプシンなし	101%	102%	106%	120%	83%	90%	67%

表 2. pH2 または pH5.5 の緩衝液中での 2 時間のインキュベーション後に pH5.5 で測定した活性。数値は pH5.5 でインキュベートした試料の活性に対する相対的なものである。

【0362】

30

データの概要

本発明によるブティアウクセラ (Buttiauxella) フィターゼ変異体は、同じ条件下で、ペプシンは存在させずにインキュベートした試料の活性と比較して、pH 2、37℃、10000 U/mL のペプシンで 2 時間のインキュベーション後に 75% を超える回復を示す。

【0363】

実施例 3. 酵素活性の回復

酵素活性の回復の評価

材料および方法

ここで、本発明者らは、コムギ配合酵素のペレット化後の酵素活性の回復を評価する。酵素を顆粒状のコムギに噴霧し、乾燥させた上で飼料と混合し、ペレット化のプロセスを実施する。

40

【0364】

全粒小麦粉に液体酵素を配合し、乾燥物質含有量約 90% まで乾燥させた。Kolding の Technological Institute にて、ペレット化ユニットを用いて、ペレット化プロセスにおける熱ストレスによる酵素の不活性化を試験した (図 10 に概略的に示す)。被検試料を 10 kg のプレミックスに加え、10 分間混合する。次に、10 kg のプレミックスを 150 kg の飼料 (大型の水平ミキサ) に加え、15 分間混合した上で、コンディショニング/スチーム処理した。飼料を 90℃/95℃ で 30 秒間処理した上で、ペレット化する。カスケードミキサの流出口で温度を測定する。ペレット

50

化プレスを出た直後に、ペレットを室温まで冷却する。

【0365】

本明細書に列挙した方法でフィターゼ活性を測定した。

【0366】

フィターゼ活性は、ペレット化前のマッシュ飼料1グラムあたり5単位である。

【0367】

結果

結果を図11～13に示す。

【0368】

図11に、本発明による3つのPhytase B変異体のペレット化試験の結果を開示する。これらの酵素を全粒小麦粉に配合し、水分含有量が約10%になるまで乾燥させた。ここで、BP 17 var 111のペレット化後のフィターゼ活性の回復は、90℃において90%であり、これに対しBP 17の90℃における回復は19%であった。

10

【0369】

比較用として、Phyzyme XPすなわち大腸菌(E coli)フィターゼを全粒小麦粉に配合した。結果を図12に示す。ここで、Phyzyme XPを全粒小麦粉に配合した3つのバッチでは、90℃でペレット化後のフィターゼ活性の回復は47%である。

【0370】

20

Ronozymeも試験した。この製品は、ペレット化工程の熱から酵素を保護するために被覆された状態で販売されている。この試験では、被覆された製品からフィターゼを抽出して全粒小麦粉に配合し、保護のない状態でフィターゼ分子の熱安定性を研究した。結果を図13に示す。

【0371】

データの概要

コムギに配合した本発明のブティアウクセラ(Buttiauxella)フィターゼ変異体は、90℃でのペレット化後に70%を超える回復を示す。

【0372】

実施例4. フィチン酸の分解

30

フィターゼによるフィチン酸分解についての試験の結果

溶液

インキュベーションには3種類の緩衝液を用いた。これらの緩衝液は以下のとおりとした。

250mMの酢酸塩 pH 5.5;

250mMの酢酸塩M pH 3.5;

250mMのHClグリシン pH 2.5。

【0373】

インキュベーションに用いたすべてのフィターゼを、酵素濃度が1U/mlになるまでアッセイ緩衝液で希釈した。

40

【0374】

インキュベーションに使用したフィチン酸塩基質溶液は、フィチン酸塩1%(1g/100ml緩衝液)である。

【0375】

この基質を、反応時のpHを一定に保つために、フィターゼの希釈に用いたものと同じ緩衝液で調製する。

【0376】

反応を、1MのHClによって停止させる。

【0377】

インキュベーション

50

インキュベーション容量：1.5または3.0 mlのフィチン酸塩+0.25 mlの酵素+3.25または1.75 mlの緩衝液、37℃で、全容量5.0 ml。

【0378】

異なる時点（0分、30分、60分、90分）に0.5 mlのサブ試料を採取する。

【0379】

サブサンプリングの前に、各サブ試料について、1 MのHClを0.2 ml用いてエッペンドルフ管を準備する。インキュベーションで得たサブ試料にHClを混ぜることで、反応を停止させる。HPLC分析まで、サブ試料0.7 mlをそれぞれ4℃で保管する。

【0380】

HPLC法

フィチン酸塩およびイノシトール異性体の高速イオンクロマトグラフィ（HPLC）による分析。この方法は、SkoglundおよびCarlssonら（J. Agric. Food Chem., 45（1997）, 451～436 5. J. Agric. Food Chem., 46（1998）, 1877～1882；およびJ. Agric. Food Chem., 49（2001）, 11695～1701に記載されている。使用したカラムは、4×50 mmのプレカラムを有する、Dionexから入手した強アニオン交換体（4×250 mm）であった。溶媒AはMilli Q水、溶媒Bは1 NのHClを水に入れて調製したものである。勾配は、30分間でBを2.5%から4.9%に続いて、流量0.8 ml/分で50%でのアイソクラティック3分間、2.5%でのアイソクラティック2分間である。それぞれの試行を35分間にする。フィターゼは理論的に可能なIP異性体をそれほど多くは生成しないため、試行を合計25分間に短縮することもできる。溶離液を、流量0.4 ml/分で、0.1%のFe(NO₃)₃・9H₂Oと2%の過塩素酸（HClO₄）とを含有する水溶液を用いて、インラインで誘導体化した。フィチン酸塩およびIP異性体を、290 nmでポジティブピークとして検出した。これは、フィチン酸塩-Fe³⁺-ClO₄⁻錯体が形成されることによるものである。60%過塩素酸溶液は、Sigmaから購入した。

【0381】

結果

結果を図14～17に示す。

【0382】

データの概要

本発明のすべての酵素が好ましい特徴を示した。

【0383】

本発明のフィターゼは、試験した全pHレベルでフィチン酸塩を分解した。

【0384】

本発明の酵素はpH 5.5において非常に高い活性を示す。

【0385】

BP 110およびBP 111は、pH 2.5および3.5において同様の活性を示す。

【0386】

BP 110およびBP 111は、pH 2.5および3.5のどちらでも、インキュベーションに添加されたすべてのフィチン酸塩を90分後に分解する。

【0387】

BP 112は、pH 2.5および3.5のどちらでも、インキュベーションに添加されたフィチン酸塩の75%を90分後に分解する。

【0388】

本発明の酵素は、pH 2.5でRonozymeおよびNatuphosよりも優れた特徴を示す（少なくとも図17参照）。（図14～16で見られるよりも酵素濃度が高いため、ここでブティアウクセラ（Buttiauxella）BP 17を参照用に示す。）

10

20

30

40

50

【0389】

実施例5. 液化物におけるフィチン酸の加水分解

フィチン酸の判定:

フィチン酸含有量: 5%スラリー(乾燥試料の場合)のpHをpH10に調整することで、試料からフィチン酸を抽出した後、イオン交換カラムを用いるHPLC法で測定した。NaOH勾配系を用いて、フィチン酸をカラムから溶出させた。液体中のフィチン酸含有量を、フィチン酸の標準と比較して計算した。

【0390】

結果

異なる熱安定性BP変異体フィターゼ、すなわちBP110、BP111、BP112によって、従来の乾燥粉末液化プロセス(ソース: Illinois River Energy, Monroe, Illinois)から得た全粒トウモロコシ(corn)液化物のフィチン酸の加水分解に対して温度がおよぼす影響を調べた。32% ds(「乾燥固体」)全粒トウモロコシ(corn) ds. トウモロコシ(corn)液化物のpHをpH5.0に調整し、85℃から89℃に保たれた水浴に入れた。温度の平衡後、BP-フィターゼを4.0 FTU/g ds. トウモロコシ(corn)となるように添加した。次に、20分の時点で試料を採取し、10mMの水酸化ナトリウム(1~10倍に希釈)を添加して酵素反応を停止させた。続いて希釈試料を濾過し、HPLCを用いてそのフィチン酸塩誘導体特性(IP1~IP6)を分析した。図18および図19のHPLCクロマトグラムに、3種類の変異体から得たフィターゼはいずれも、85℃より高い温度でフィチン酸の加水分解を触媒することが明らかに示された。全粒トウモロコシ(corn)液化物のフィチン酸含有量(フィチン酸(IP6)および中間体のIP1~IP5)は1.7% ds. トウモロコシ(corn)であり、図18のデータは、95%を超えるフィチン酸が、現状の液化条件下で熱安定性フィターゼによって加水分解されたことを示した。有意に、89℃でインキュベートした試料のHPLC特性から、BP-111フィターゼ変異体が他の2種類の変異体由来のフィターゼよりも高い熱安定性を呈することが示された(図19のBP-110およびBP-112を参照のこと)。

【0391】

実施例6

トリコデルマ・リーセイ(*Trichoderma reesei*)におけるアスペルギルス・ツビンゲンシス(*Aspergillus tubingensis*)リパーゼ3の発現

1. トランスフォーメーションに使用する発現コンストラクト&株

Invitrogenから入手したpDONR(商標)221プラスミドDNA(カタログ番号12536-017)をドナーベクターとして使用した。アスペルギルス・ツビンゲンシス(*Aspergillus tubingensis*)リパーゼ3ゲノムDNA含有pDONR221::lip3(図20)をトリコデルマ・リーセイ(*T. reesei*)ゲートウェイ目的ベクターpTrex3G(国際公開第05/001036号パンフレットに詳細に記載されている)に組み換え、最終的な発現コンストラクトATlipase3Trex(図21)を得た。

【0392】

発現カセットは、トリコデルマ・リーセイ(*T. reesei*)セロビオヒドロラーゼ1(cbh1)遺伝子のプロモーターおよびターミネーター領域を含んでいた。また、これは、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)アセトアミダーゼ、amdS遺伝子を、トリコデルマ・リーセイ(*T. reesei*)のトランスフォーメーション用の選択可能なマーカーとして含んでいた。

【0393】

アスペルギルス・ツビンゲンシス(*Aspergillus tubingensis*)リパーゼ3ゲノムDNAは、配列番号7に示すアミノ酸配列を有するリパーゼ3脂肪分解酵素をコードする。

【0394】

本明細書で使用する「リパーゼ3」という用語は、配列番号7に示すアミノ酸配列など、配列番号8に示すアミノ酸配列を含む脂肪分解酵素を示す。配列番号7は、シグナル *seq* を含有し、配列番号8はシグナル配列を持たない成熟リパーゼタンパク質である。

【0395】

トランスフォーメーションには、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) すなわち、2つの分泌されるセロビオヒドロラーゼであるCBHIおよびCBHIIと、2つの分泌されるエンドグルカナーゼであるEGIおよびEGIIとをコードする遺伝子を欠失させた非GMM株RL-P37の誘導体株を使用した。

【0396】

発現ベクター *pTrex3g* .

以下、本発明による遺伝子の発現に使用できるベクター *pTrex3g* の構築について説明する。

【0397】

このベクターは、64のヘキサマー制限酵素認識配列を含有する伸長させたマルチプルクローニング部位を有する *pUC118* ファージミドベースのベクター (*Brosius*, J. (1989) *DNA* 8:759) である大腸菌 (*E. coli*) ベクター *pSL1180* (*Pharmacia Inc.*, *Piscataway*, NJ, USA) をベースにしたものである。これは、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) *cbh1* 遺伝子のプロモーター・ターミネーター領域間の所望のオープンリーディングフレームのGateway技術 (*Invitrogen*) を用いた挿入を可能にするためのGateway目的ベクター (*Hartley*, J. L., *Temple*, G. F. and *Brasch*, M. A. (2000) *Genome Research* 10:1788~1795) として設計された。また、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) のトランスフォーメーション時に選択可能なマーカーとして用いられる *Aspergillus nidulans* (*amdS* 遺伝子) も含有する。

【0398】

pTrex3g の詳細は以下のとおりである。このベクターは、大きさが10.3kbである。

【0399】

pSL1180 のポリリンカー領域に挿入したのは、以下のDNAセグメントである。

1. トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) *cbh1* 遺伝子のプロモーター領域由来のDNAの2.2bpのセグメント

2. クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*CmR*) および *ccdB* 遺伝子をフランキングするいずれかの末端に *attR1* および *attR2* 組換え部位を含む *Invitrogen* から取得した1.7kbのGatewayリーディングフレームAカセット

3. トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) *cbh1* 遺伝子のターミネーター領域由来のDNAの336bpのセグメント

4. 天然のプロモーターおよびターミネーター領域とともに *Aspergillus nidulans* (*amdS* 遺伝子) を含有するDNAの2.7kbのフラグメント。

【0400】

2. トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) の4遺伝子欠失宿主株のトランスフォーメーション

Aspergillus tubingensis (*A. tubingensis*) リパーゼ3遺伝子を含有する発現コンストラクト *ATlipase3Trex* を、PDS-1000ヘリウムシステム (*BioRad* カタログ番号165-02257) を用いる粒子ボンバードメントによる遺伝子銃でのトランスフォーメーションまたは電気穿孔を使用して、トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) 株にトランスフォームした。真菌DNAのみまた

10

20

30

40

50

は全発現プラスミドを含むPCR産物を、遺伝子銃でのトランスフォーメーションおよび電気穿孔による形質転換体の生成に使用した。

【0401】

A. 電気穿孔によるトランスフォーメーション

トランスフォーム対象となるトリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) 宿主株を、PDAプレート上で5日間、完全に孢子形成されるまで成長させた。2つのプレートからの孢子を1.2Mのソルビトールで収集し、ミラクロスで濾過して寒天を除去した。孢子を50mlのファルコンチューブに移し、50mlの水を用いて5~6回繰り返し遠心処理して洗浄した。1.2Mのソルビトール溶液を用いて、孢子を少量(2×ペレット容量未満)に再懸濁させた。次に、この孢子懸濁液を氷上に保持した。90ulの孢子懸濁液のアリコートを経電気穿孔キュベット(E-shot, Invitrogenの0.1cmの標準電気穿孔キュベット)に取った。10~20ulのDNAコンストラクト(プラスミド図4またはPCR産物)を孢子懸濁液に加え、電気穿孔を16kV/cm、25μF、50Ωに設定した。電気穿孔後、孢子懸濁液を氷上に残し、1.0Mのソルビトール5部およびYEPD1部に再懸濁させ、250rpmで振盪しながら28℃で一晩インキュベーションして発芽させた。翌日、孢子発芽体をアセトアミド含有寒天板に蒔いた。形質転換体を採取し、個々にアセトアミド寒天板に移した。

10

【0402】

B. 粒子ボンバードメントによるトランスフォーメーション(遺伝子銃でのトランスフォーメーション)

20

トリコデルマ・リーセイ (*T. reesei*) の4遺伝子が欠失した株の孢子の懸濁液を調製した。200ulの孢子の懸濁液を最少培地(MM)アセトアミドプレートの中に広げた。(MMアセトアミドプレートは、以下の組成であった。0.6g/lアセトアミド; 1.68g/l CsCl; 20g/lグルコース; 20g/l KH₂PO₄; 0.6g/l CaCl₂ 2H₂O; 1ml/l 1000×微量元素溶液; 20g/l Noble寒天、pH5.5。1000×微量元素溶液は、5.0g/l FeSO₄ 7H₂O; 1.6g/l MnSO₄; 1.4g/l ZnSO₄ 7H₂Oおよび1.0g/l CoCl₂ 6H₂Oを含有していた。孢子懸濁液を滅菌フードにてMMアセトアミド培地の表面で1時間乾燥させた。トランスフォーメーションについては、製造業者の指示に従った。60mgのタングステン粒子を微量遠心管に入れた。1mlのエタノールを加え、15秒間静置した。エタノールを除去し、粒子を滅菌dH₂Oで3度洗浄した上で、250ulの50%(v/v)滅菌グリセロールを加えた。25ulのタングステン粒子懸濁液を微量遠心管に入れた。連続的に攪拌しながら、プラスミドDNAを5ul(100~200ng/ul)と、2.5MのCaCl₂を25ulと、0.1Mのスペルミジンを10ulとを加えた。この粒子を3秒間遠心処理した。上清を除去し、粒子を200ulの100%エタノールで洗浄し、3秒間遠心処理した。上清を除去した。24ulの100%エタノールを加えてピペットで混合し、粒子のアリコート8ulを取り出して、デシケーターに保持したマイクロキャリアディスクの中心に乗せた。このタングステン/DNA溶液が乾燥したら、マイクロキャリアディスクを、孢子を含むMMアセトアミドのプレートと一緒にボンバードメントチャンバに設置した。ボンバードメントのプロセスについては、製造業者の指示どおり実施した。タングステンDNA粒子でプレート上の孢子にDNAを導入した後、プレートを28℃でインキュベートした。トランスフォームされたコロニーをMMアセトアミド培地の新鮮なプレートに移し、28℃でインキュベートした。

30

40

【0403】

3. マイクロタイタープレートでの形質転換体の成長

MMアセトアミドプレートでの5日間の成長後、電気穿孔または遺伝子銃によるトランスフォーメーションで得られ、安定した形態を示している形質転換体を、96ウェルのマイクロタイタープレートでグルコース/ソホロースを含む200ulの限定培地に接種した。グルコース/ソホロース(1リットルあたり)を含む限定培地は、NH₄2SO₄を5

50

gと、PIPPS緩衝液を33gと、Casアミノ酸を9gと、 KH_2PO_4 を4.5gと、 CaCl_2 （無水）を1gと、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を1gとで構成され、milli-Q H_2O を用いて50%NaOHでpHを5.50に調整して966.5mLにしたものであった。滅菌後、Mazu 5mL、グルコース／ソホース60%を26mLと400×トリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）微量金属を2.5mLとを加えた。マイクロタイタープレート酸素成長チャンバにて28℃で5日間インキュベートした。

【0404】

実施例7

本発明に用いるのに適した発現宿主細胞は、セロビオヒドロラーゼI（CBHI、Cel7a）、セロビオヒドロラーゼII（CBHII、Cel6a）、エンドグルカナーゼI（EGI、Cel7b）、エンドグルカナーゼII（EGII、Cel5a）をコードする遺伝子が、分子遺伝子技術での欠失または破壊によって失活したトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）の株であってもよい。この株（4遺伝子欠失株）は、他のトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）分泌タンパク質をコードする遺伝子の過発現の宿主として有用である。

【0405】

好ましくは、本発明に用いるのに適した宿主細胞は、国際公開第2005/001036号パンフレットおよび米国特許出願公開第28026376 A1号明細書に記載の方法を用いて、株RL-P37のトリコデルマ・リーセイ（*Trichoderma reesei*）細胞由来のものであってもよい。

【0406】

本発明に用いるのに適したトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）株は、トリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）RL-P37の公に利用可能な株由来のものであってもよい。トリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）株RL-P37は、国際公開第05/001036号パンフレットに記載されているように、修飾されてトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）株1A52を形成してもよい。トリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）株1A52は、米国特許出願公開第20080026376号明細書に記載されているように修飾され、本発明において使用可能なトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）細胞を形成してもよい。

【0407】

RL-P37は、後述するように修飾されてトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）株1A52を形成するものであってもよい。

【0408】

使用するトリコデルマ・リーセイ（*T. reesei*）宿主株は、以前はGenencor International, Inc.によって市販のセルラーゼ調製物の製造に用いられていた公に利用可能な株RL-P37由来のものであってもよい。この株の誘導および特徴付けについては、すでに刊行物に記載されている（Sheir-Neiss, G. およびMontenecourt, B. S. (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46~53; 米国特許第4,797,361号明細書）。これは、いくつかの突然変異誘発ステップの結果として野生型株（QM6a）から得られたセルラーゼ過産生突然変異体株である。

【0409】

1) pyr4突然変異体株の単離

プラスミドDNAでのトランスフォーメーション用の株RL-P37を調製するために、pyr4遺伝子にnul1変異を有する誘導体を単離する必要があった。

【0410】

pyr4遺伝子は、ウリジンの生合成に必要な酵素であるオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードする。有毒なインヒビターである5-フルオロオロト酸（FOA）が、野生型細胞によってウリジンに取り込まれ、細胞を汚染する。しかしながら、p

10

20

30

40

50

pyr 4 遺伝子のない細胞はこのインヒビターに耐性であるが、成長にウリジンが必要とする。したがって、FOAを用いてpyr 4 突然変異体株を選択することが可能である。実用上、トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 株RL-P37の胞子を2mg/mlのウリジンと1.2mg/mlのFOAとを含有する固体培地の表面に広げる。自然発生的なFOA耐性コロニーが3~4日以内で表れた。成長にウリジンが必要とするFOA耐性突然変異体を同定した。特異的に欠陥pyr 4 遺伝子を有する突然変異体を同定するために、プロトプラストを生成し、野生型pyr 4 遺伝子を含むプラスミドでトランスフォームした (Smith, J. L., Bayliss, F. T. and Ward, M. (1991) Curr. Genet. 19:27~33)。トランスフォーメーション後、ウリジンを含まない培地にプロトプラストを播種した。トランスフォーメーションされたコロニーの以後の成長には、プラスミドを持つpyr 4 遺伝子による欠陥pyr 4 遺伝子の補完が見られた。このようにして、株GC69を株RL-P37のpyr 4 突然変異体として同定した。

10

【0411】

2) CBH1コード遺伝子を欠失するよう設計されたプラスミドの構築

CBH1タンパク質をコードするcbh1遺伝子を、株RL-P37のゲノムDNAから、この遺伝子用に公開配列に基づいて設計されたオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによってクローニングした (Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwock, S., Myambo, K. and Innis, M. (1983) Biotechnology 1:691~696)。cbh1遺伝子は、6.5kb Pst Iフラグメントにあり、このベクターのカナマイシン耐性遺伝子を置き換えてpUC4KのPst I部位に挿入された (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, USA)。得られたプラスミドであるpUC4K::cbh1をHind IIIで切断し、大きいほうのフラグメントを単離して再ライゲートし、pUC4K::cbh1ΔH/Hを得た。この手法では、cbh1コード配列全体と約1.2kbの5'フランキング配列および1.5kbの3'フランキング配列を除去した。元のPst Iフラグメントの両端から約1kbのフランキングDNAが残った。トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) pyr 4 遺伝子を、pUC18におけるゲノムDNAの6.5kbのHind IIIフラグメントとしてクローニングし、pTpyr2を形成した (Smith, J. L., Bayliss, F. T. およびWard, M. (1991) Curr. Genet. 19:27~33)。プラスミドpUC4K::cbh1ΔH/HをHind IIIで切断し、末端を仔ウシ腸管粘膜由来アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。このDNAを、pyr 4 遺伝子を含有する6.5kbのHind IIIフラグメントでライゲートして、pΔCBH1pyr4を得た。

20

30

【0412】

EcoRIでpΔCBH1pyr4が消化されると、いずれかの末端でcbh1ローカスのフランキング領域からなる大きなフラグメントが遊離し、中央ではpyr 4 遺伝子がcbh1コード配列を置き換えた。このフラグメントのトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 由来ではない唯一のDNAは、pUC4Kのマルチプルクローニング部位由来の21bpのフラグメントであった。

40

【0413】

3) トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) のcbh1遺伝子の欠失

Smithら、(1991)が概説した方法で、株GC69の菌糸から単離されたプロトプラストをEcoRI消化プラスミドpΔCBH1pyr4でトランスフォームした。安定した形質転換体を得て、cbh1遺伝子が欠失したものを後述するようにして同定した。

【0414】

形質転換体から全DNAを単離し、Pst Iで消化し、アガロースゲル電気泳動を実施して、膜フィルタにブロットした。次に、P³²標識pΔCBH1pyr4を用いてフィル

50

タをハイブリダイズし、オートラジオグラフィによってハイブリダイゼーションを観察した。このプローブが、トランスフォームされていない株の天然の *cbh1* および *pyr4* 遺伝子とハイブリダイズされた。一形質転換体 (株 P37PΔCBHI) において、ダブルクロスオーバー統合イベントが発生した場合、予測されるハイブリダイゼーションのパターンを観察した。すなわち、*pΔCBH1pyr4* から株 RL-P37 の *cbh1* ローカスで得られた単一コピーの大きな *EcoRI* フラグメントの統合により、*cbh1* 遺伝子が欠失した。

【0415】

使用したプローブが放射線標識した *plntCBHI* であること以外は、上述のようにしてサザン解析を実施した。このプラスミドは、*pUC4K::cbh1ΔH/H* で欠失した領域内に *cbh1* ローカス由来の 2 kb の *BglII* フラグメントを含む *pUC* ベクターで構成される。このプラスミドは、株 GC69 の *cbh1* ローカスにハイブリダイズされたが、株 P37PΔCBHI 由来の DNA にはハイブリダイズされなかった。このことから、*cbh1* 遺伝子が欠失し、*pΔCBH1pyr4* からの *pUC* DNA フラグメントが欠失株によって取り込まれなかったことが確認される。

【0416】

等電点電気泳動ゲルでの分泌されるタンパク質の分離による解析で、CBHI タンパク質が株 P37PΔCBHI によって産生されなかったことが示された。

【0417】

4) P37PΔCBHI の *pyr4 null* 突然変異体の生成 *cbh1* 遺伝子を欠いた形質転換体 (P37PΔCBHI) の胞子を、FOA 含有培地に広げた。次に、上記のセクションで説明した方法を用いて、この形質転換体の *pyr4* 欠失誘導体を得た。この *pyr4* 欠損株を、P37PΔCBHI *Pyr⁻26* とした。サザン解析によって、株 P37PΔCBHI *Pyr⁻26* を選択すると自然発生的な欠失が起こることが示された。この欠失は、株 P37PΔCBHI の *cbh1* ローカスで統合された *pyr4* 遺伝子ならびに、フランキング DNA を、ゲノム DNA の 6.5 kb の *PstI* フラグメントの部分を超えてもともとクローニングされた *cbh1* ローカスから完全に除去した。

【0418】

5) *cbh2* 遺伝子を欠失するよう設計されたベクターの構築 CBHI1 タンパク質をコードするトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) の *cbh2* 遺伝子を、ゲノム DNA の 4.1 kb の *EcoRI* フラグメントとしてクローニングした (Chen et al., 1987, Biotechnology 5:274~278)。この 4.1 kb のフラグメントを *pUC4XL* の *EcoRI* 部位間に挿入した。後者のプラスミドは、制限エンドヌクレアーゼ部位がここに示した順序の対称パターンで配置されたマルチプルクローニング部位を含む *pUC* 誘導体 (R. M. Berk, Genencor International Inc. によって作製) である。*EcoRI*、*BamHI*、*SacI*、*SmaI*、*HindIII*、*XhoI*、*BglII*、*Clal*、*BglII*、*XhoI*、*HindIII*、*SmaI*、*SacI*、*BamHI*、*EcoRI*。プラスミド *pPΔCBHI1* が作製され、*HindIII* 部位 (CBHI1 翻訳開始部位の 3' の 74 bp) および *Clal* 部位 (CBHI1 の最終コドンの 3' の 265 bp) 間の *cbh2* クローンの 1.7 kb の中央領域が除去され、以下のようにして得られるトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) *pyr4* 遺伝子を含む 1.6 kb の *HindIII* - *Clal* DNA フラグメントと置き換えられた。トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) *pyr4* 遺伝子を 1.6 kb の *NheI* - *SphI* フラグメントの *pTpyr2* から切除し、*pUC219* (マルチプルクローニング部位を伸長させて *BglII*、*Clal* および *XhoI* の制限部位を含むようにした *pUC119* 由来; Wilson et al., 1989, Gene 77:69-78) の *SphI* と *XbaI* 部位との間に挿入して、*p219M* を生成した (Smith et al., 1991, Curr. Genet. 19:27~33)。一方の末端に 7 bp の DNA を有し、他方の末端に 6 bp の DNA を有する、*pUC219* マルチプルクローニング部位由来の

10

20

30

40

50

HindIII-ClaIフラグメントとしてpyr4遺伝子を除去し、cbh2遺伝子のHindIIIおよびClaI部位に挿入してプラスミドpPΔCBHIIを形成した。

【0419】

このプラスミドをEcoRIで消化すると、一方の末端でcbh2ローカスから0.7 kbのフランキングDNAを有するフラグメント、他方の末端ではcbh2ローカスから1.7 kbのフランキングDNAが遊離して、真ん中ではトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) pyr4遺伝子が遊離した。トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 由来ではないこのフラグメントのDNAだけが、pyr4遺伝子のいずれかの末端でのpUC219マルチプルクローニング部位の6 bpおよび7 bpのフラグメントであった。

10

【0420】

6) 株P37PΔCBHIPyr⁻26からのcbh2遺伝子の欠失

上記の3で概説した方法で、株P37PΔCBHIPyr⁻26のプロトプラストを生成し、EcoRI消化pPΔCBHIIでトランスフォームした。安定した形質転換体を振盪フラスコで培養し、培養上清中のタンパク質を等電電気泳動によって調べた。どのCBHII (CBHIも) タンパク質をも産生しなかったひとつの形質転換体 (P37PΔΔCBH67で表記) を同定した。

【0421】

株P37PΔΔCBH67からDNAを抽出し、EcoRIおよびAsp718で消化し、アガロースゲル電気泳動を実施した。このゲルからのDNAを膜フィルタにブロットし、³²P標識したpPΔCBHIIとハイブリダイズした。野生型cbh2遺伝子を含有する4.1 kbのEcoRIフラグメントが、トランスフォームしていない対照株由来のDNAに観察された。対照的に、株P37PΔΔCBH67では、単一の4.1 kbのバンドが除去され、約0.9および3.1 kbの2つのバンドに置き換わった。これは、pPΔCBHIIからの大きめのEcoRIフラグメントの単一のコピーが厳密にcbh2ローカスに統合され、cbh2遺伝子を欠失したのであれば、想定されたパターンである。

20

【0422】

同じDNA試料をEcoRIで消化し、上記のようにサザン解析を実施した。この例では、プローブは³²P標識されたpIntCBHIIであった。このプラスミドは、プラスミドpPΔCBHIIで欠失した、cbh2 DNAのそのセグメントの中からのcbh2遺伝子コード配列の一部を含有する。株P37PΔCBH67由来のDNAとのハイブリダイゼーションは見られないことから、cbh2遺伝子が欠失し、pPΔCBHIIのpUCプラスミドフラグメントがこの株を取り込んでいないことを確認するものである。

30

【0423】

7) 株P37PΔΔCBH67のpyr4 null突然変異体の選択 cbhI遺伝子およびcbh2遺伝子の両方が欠失した形質転換体 (P37PΔΔCBH67) の胞子を、FOAを含有する培地に広げた。次に、上記のセクション1で説明した方法を用いて、この形質転換体のpyr4欠損誘導体を得た。このpyr4欠損株をP37PΔΔCBH67Pyr⁻1と示す。サザン解析では、株P37PΔΔCBH67Pyr⁻1を選択したときに自然発生的な欠失が生じたことが示された。この欠失では、もともとクローニングされたゲノムDNAの4.1 kbのEcoRIフラグメントの範囲をこえて、株P37PΔΔCBH67のcbh2ローカスで統合されていたpyr4遺伝子とcbh2ローカスからのフランキングDNAが完全に除去されることが示された。pyr4遺伝子のいずれかの末端に存在するpUC219マルチプルクローニング部位由来のDNAの短い (6 bpおよび7 bp) フラグメントもこの欠失のゲノムからは除去されていた。

40

【0424】

8) eg12遺伝子を破壊するよう設計されたプラスミドの構築

EG11 (以前はEG111とも呼ばれていた) をコードするeg12遺伝子が、トリ

50

コデルマ・リーセイ (T. reesei) からクローニングされ、そのDNA配列が公開されている (Saloheimo et al., 1988, Gene 63: 11~21)。本発明者らは、pUC219のPstI部位とXhoI部位との間に挿入されたゲノムDNAの約4kbのPstI-XhoIフラグメントとして、株RL-P37から遺伝子を得た。pTpyr2から得たゲノムDNAの2.7kbのSalIフラグメントに存在するトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) pyr4遺伝子を、EGIIコード配列内のSalI部位に挿入し、プラスミドpEGII::P-1を作製した。これによって、EGIIコード配列が破壊されたが、配列の欠失は生じなかった。プラスミドpEGII::P-1をHindIIIおよびBamHIで消化して、一方の末端の5bpと他方の末端の16bp (いずれもpUC219のマルチプルクローニング部位由来である) 以外はトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) だけから誘導されるDNAの線形フラグメントを得ることが可能である。

10

【0425】

9) 株P37PΔCBH67Pyr⁻1のegl2遺伝子の破壊

株P37PΔCBH67Pyr⁻1を、事前にHindIIIおよびBamHIで消化しておいたpEGII::P-1でトランスフォームし、安定した形質転換体を選択した。この形質転換体から全DNAを単離し、サザン解析を用いて株を同定した。この株では、pyr4およびegl2遺伝子を含むプラスミドDNAのフラグメントが、egl2ローカスで統合され、結果としてEGIIコード配列を破壊していた。プローブとして、egl2遺伝子を含むトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) DNAの約4kbのPstIフラグメントを用いて、サザン解析を実施した。株P37PΔΔ67P⁻1から単離したDNAをサザン解析用にPstIで消化したら、オートラジオグラフ上に単一の4kbのバンドとしてegl2ローカスが可視化された。しかしながら、egl2遺伝子が破壊された形質転換体の場合、このバンドが失われ、予想どおり2つの新たなバンドに置き換わった。DNAをBglIIまたはEcoRVで消化すると、egl2遺伝子に対応するバンドのサイズが、トランスフォームされていないP37PΔΔ67P⁻1株と、egl2が破壊された形質転換体との間で約2.7kb (挿入されたpyr4フラグメントのサイズ) だけ大きくなった。この後者の形質転換体は、この時点でcbh1、cbh2、egl2遺伝子が欠失しており、これを株B31と表記した。さらにサザン解析を実施したところ、pEGII::P-1のpUC DNAフラグメントがこの株に取り入

20

30

【0426】

10) 株B31のpyr4 null突然変異体の選択

cbh1、cbh2、egl2遺伝子が欠失した形質転換体 (B31) の胞子を、FOA含有培地に広げた。次に、上記のセクション1で説明した方法を用いて、この形質転換体のpyr4欠損誘導体を得た。このpyr4欠損株をB31 P6と表記した。サザン解析を実施したところ、株B31 P6を選択したときに自然発生的な欠失が生じたことが明らかになった。この欠失は、株B31のegl2ローカスで統合されていた大部分のpyr4遺伝子を除去したが、egl2ローカスのフランキングDNAに伸長しなかった。

【0427】

11) egl1遺伝子を欠失するために消化されるプラスミドの構築

トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) のegl1遺伝子がクローニングされ、その遺伝子のDNA配列が公開されている (Penttilä et al., 1986, Gene 45: 253~263; van Arsdell et al., 1987, Biotechnology 5: 60~64)。本発明者らは、pUC100 (オリゴヌクレオチドがマルチプルクローニング部位に挿入されて、BglII、ClaI、XhoIの制限部位を付加しているpUC18の誘導体) のHindIII部位で挿入されたゲノムDNAの4.2kbのHindIIIフラグメントとして、トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 株RL-P37からこの遺伝子を得て、pUCEGIを得た。EGIコード配列の中央に近い位置からコード配列の3'末端を越える位

40

50

置まで伸長している約1 kbのE c o R Vフラグメントを除去し、p T p y r 2 から得たp y r 4 遺伝子を含むトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) DNAの3.5 kbのS c a l フラグメントで置き換えた。得られるプラスミドをp P Δ E G I と呼んだ。

【0428】

プラスミドp P Δ E G I をH i n d l l l で消化して、いずれかの末端にe g l 1 遺伝子のセグメントを有するトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) ゲノムDNAだけを含み、E G I コード配列の一部を置き換えるp y r 4 遺伝子を中央に有するDNAフラグメントを放出させることが可能であった。

【0429】

12) 株B31P6におけるe a l 1 遺伝子の欠失

10

e g l 1 フランキング領域に対してp y r 4 遺伝子の向きだけが異なる2つの形態のp P Δ E G I を構築した。株B31P6を、両形態のプラスミドをH i n d l l l で消化した後にその混合物でトランスフォームした。安定した形質転換体から全DNAを抽出し、H i n d l l l で消化し、サザン解析を実施した。使用したプローブは放射線標識したp U C E G I であった。欠失されていないe g l 1 遺伝子を表す株B31P6からDNAの4.2 kbのフラグメントへのハイブリダイゼーションを観察した。形質転換体(株1A52)を同定したところ、そこにはこの4.2 kbが存在せず、約6.8 kbのフラグメントに置き換わっていた。これは、E G I コード配列の一部の欠失と、この位置でのp y r 4 の挿入につながるe g l 1 ローカスで予測されたように、p P Δ E G I からの大きめのH i n d l l l フラグメントを正確に統合した場合に想定されるパターンである。p U C プラスミドをサザン解析のプローブとして使用して、p P Δ E G I のp U C DNAフラグメントが株1A52に取り込まれていないことを確認した。

20

【0430】

トリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 株1A52を修飾して、本発明で使用可能なトリコデルマ・リーセイ (T. reesei) 細胞を形成してもよい。

【0431】

実施例8 フィターゼとリパーゼとの組み合わせをアミラーゼおよびキシラナーゼと一緒に補充した食餌のカニユーレ処置した仔ブタでの栄養塩消化率。

【0432】

この試験は、U n i v e r s i t y o f I l l i n o i s、U S Aで実施した。

30

【0433】

材料および方法

外科的にカニユーレ処置した仔ブタにおける、組み合わせでフィターゼ、アミラーゼ、キシラナーゼの上にリパーゼを補ったトウモロコシ (c o r n) /大豆粕ベースの食餌の回腸エネルギーおよびタンパク質消化率、全消化管エネルギー消化率、全消化管C aおよびP貯留を評価した。処置の構成は以下のとおりとした。

- ・陽性対照。栄養塩が適切な食餌。
- ・陰性対照。陽性対照と比べて、飼料のD E / k g を150 k c a l、カルシウム0.15%、利用可能なPを0.12%に抑えた。
- ・フィターゼ (500 F T U / k g)。
- ・フィターゼ (500 F T U / k g)、アミラーゼ (1800 u / k g) およびキシラナーゼ (2000 u / k g)。
- ・フィターゼ (500 F T U / k g)、アミラーゼ (1800 u / k g)、キシラナーゼ (2000 u / k g) およびリパーゼ (3000 L I P U / k g)。

40

【0434】

1方格あたり食餌が6回、間隔が6回で、二組の6×6のラテン方格に12頭の去勢ブタを無作為に割り当てた。個々のブタを耳タグで識別した。

【0435】

陽性対照および陰性対照の食餌配合物と計算で得た組成を表3に示す。トウモロコシ (c o r n) デンプンを犠牲にして、陰性対照 (N C) に酵素産物を補って食餌を混合した

50

。基本的な食餌は、トウモロコシ (c o r n)、大豆粕、トウモロコシ (c o r n) D D G Sを主成分とするものであった。0.4%の酸化クロムを消化できないマーカーとして食餌に加えた。

【0436】

【表7】

表 3. 食餌配合物および栄養の明細

成分	PC	NC
	------(%)-----	
トウモロコシ(corn)	51.05	57.05
大豆粕 48%	24.00	21.75
DDGS	3.50	3.50
ホエー、乾燥	12.00	12.00
魚粉	4.00	4.00
ダイズ油	3.00	0.00
デンプンまたは酵素	0.05	0.05
リン酸ニカルシウム	0.85	0.10
石灰石	0.60	0.60
塩	0.40	0.40
リジン-HCl	0.20	0.20
DL-メチオニン	0.00	0.00
L-トレオニン	0.05	0.05
プレミックス ¹	0.30	0.30
合計	100.00	100.00
計算栄養塩組成物		
DE(kcal/kg)	3,570	3,420
NE(kcal/kg)	2,500	2,360
デンプン	31.12	34.70
NSP	8.87	9.05
CP(%)	20.54	19.97
粗脂肪(%)	6.16	3.40
カルシウム(%)	0.81	0.64
Av.リン(%)	0.40	0.28
Dig.リジン(%)	1.19	1.14
Dig.メチオニン(%)	0.32	0.32
Dig.TSAA(%)	0.66	0.65
Dig.トレオニン(%)	0.74	0.71

¹完全な食餌 1kg あたり以下の量のビタミンを提供: ビタミン A、10,990IU; ビタミン D3、1,648IU; ビタミン E、55IU; ビタミン K、4.4mg; チアミン、3.3mg; リボフラビン、9.9mg; ピリドキシン、3.3mg; ビタミン B12、0.044mg; D-パントテン酸、33mg; ナイアシン、55mg; 葉酸、1.1mg; ビオチン、0.17mg; Cu、硫酸銅として 16mg; Fe、硫酸鉄として 165mg; I、ヨウ素酸カリウムとして 0.36mg; Mn、硫酸マンガンとして 44mg; Se、亜セレン酸ナトリウムとして 0.3mg; Zn、酸化亜鉛として 165mg。

【0437】

この研究で使用したすべてのブタは、系統 337 の成熟オスと C22 のメスとを交尾させて得たものであった (P i g I m p r o v e m e n t C o m p a n y, F r a n k l i n, K Y)。平均初期体重 12.5 kg (SD = 2.15) の去勢ブタを使用した。ブタの遠位回腸に外科的に T-カニューレを取り付けた。手術後、ブタをそれぞれの

小屋に収容した。動物には実験開始まで従来の離乳後食餌を与えた。飼料は、エネルギー要求量（すなわち $106 \text{ kcal ME/kg BW}^{0.75}$ ）を維持できると想定して、1日3回毎日与えた。ブタのBWを記録する際、各期間の最初に飼料の許容量を調整した。

【0438】

酵素産物を食餌と混合して、それぞれの期間に7日間経口投与した：順応に4日間、糞便回収に1日間、回腸消化管内容物回収に2日間。回腸消化管内容物試料を6日目と7日目に8時間回収した。簡単に説明すると、ケーブルの束でビニール袋をカニユーレの筒に取り付け、袋に流入する消化管内容物を回収した。袋が消化管内容物で一杯になるか、30分ごとに少なくとも1回、袋を取り外した。回収した試料を -20°C で保存して、消化管内容物におけるアミノ酸の細菌の分解を防いだ。実験終了時、冷凍した回腸試料を室温で自然解凍し、動物および食餌内で混合し、サブ試料を回収して化学分析を実施した。回腸消化管内容物試料を凍結乾燥させ、微粉碎してから化学分析した。

10

【0439】

回腸試料の乾燥物質を分析した（手順930.15；AOAC、2005）。回腸試料の総エネルギー濃度をボンベ熱量計で測定した（Parr 6300熱量計、Parr Instruments Co., Moline, IL）。硝酸－過塩素酸湿潤灰試料調製（手順968.088D；AOAC、2005）後に食餌のおよび回腸消化管内容物試料のCr含有量をICP法（手順990.08；AOAC、2005）で測定した。これらの値を用いて、回腸消化係数を計算した。強制空気オーブンで糞便試料を乾燥させ、微粉碎した上で分析した。これらの試料を、DM、総エネルギー、粗タンパク質、Ca、P

20

【0440】

SASのPROC MIXED法（SAS Institute Inc., Cary, NC）を用いてラテン方格法としてデータを分析した。モデルには、食餌処置、動物期間、ブロックを含めた。ペアにしたt検定を用いて平均を分けた。それぞれの囲いで、すべての計算の実験単位を考慮した。統計的有意性の判断には α レベル0.05を使用した。

【0441】

結果

フィターゼを添加しても、陰性対照と比較して回腸エネルギー消化率（図23A）は増えなかったが、フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼおよびフィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼ+リパーゼを添加すると、それぞれ2.95%および9.28%増えた。これらの変化は、フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼバックグラウンドに対する純粋にリパーゼの添加だけによる6.3%の効果を示している。同様に、粗タンパク質の回腸消化率は、フィターゼを補充しても陰性対照の食餌と比較して増えなかった（図23B）が、フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼを補充すると、陰性対照（+5.6%）およびフィターゼを補充した場合（+4.0%）と比較して粗タンパク質消化率が有意に増加した。フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼの上にリパーゼを追加で補充すると、陰性対照（+10.7%）、フィターゼ補充（+9.1%）、フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼ（+4.9%）の場合と比較して粗タンパク質消化率がさらに高まった。

30

40

【0442】

全消化管レベル（図24）では、フィターゼを含めてもフィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼでも、エネルギー消化率には影響しなかった。フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼを含めた場合に回腸から糞便レベルに差が小さくなったのは驚くべきことではなかった。なぜなら、大腸の微生物活性によってブタにおけるエネルギー消化率の最初の差が解消されることが多いためである。対照的に、この組み合わせにリパーゼを添加すると、他の処理よりも糞便エネルギー消化係数が大きくなったことから、大腸の微生物によってすら、これがなければ消化されなかったであろう栄養塩の放出および吸収が示唆される。フィターゼ+キシラナーゼ+アミラーゼ+リパーゼの組み合わせで、陰性対照飼料と比較して全消化管エネルギー消化率が4.7%増加した。

50

【0443】

フィターゼ（＋32%および＋293%）、フィターゼ＋キシラナーゼ＋アミラーゼ（＋36%および＋323%）、フィターゼ＋キシラナーゼ＋アミラーゼ＋リパーゼ（＋45%および＋334%）での食餌の全Ca（図25A）およびP貯留（図25B）の相対的な増分も、陰性対照の食餌と比較して現段階での研究ではっきりしていた。フィターゼを含めることによるCaおよびPの消化率の変化は想定されたが、キシラナーゼ＋アミラーゼ＋リパーゼを添加するとさらに改善されたことから、フィターゼ、アミラーゼおよびキシラナーゼを含む食餌のCaおよびPの貯留を高めるにあたってのリパーゼの主な役割が示された。これらの増分は、対照飼料およびフィターゼそれ自体よりも有意に大きかった。これは、リパーゼがCaおよびP貯留に対しておよぼさらなる効果を示すものである。

10

【0444】

まとめると、フィターゼ＋アミラーゼ＋キシラナーゼの上にリパーゼを添加することで、陰性対照、フィターゼ添加およびフィターゼ＋アミラーゼ＋キシラナーゼ添加と比較して、回腸レベルでのエネルギーおよびタンパク質消化率が増加し、全消化管レベルでのエネルギー消化率も増加した。同様に、フィターゼ＋アミラーゼ＋キシラナーゼの上にリパーゼを添加すると、陰性対照ならびに、フィターゼを添加した食餌と比較して、全消化管CaおよびP貯留が増加した。本特許に含まれる *in vitro* の例は、リパーゼを添加することで生じたこれらの消化率の増分が、主に食餌用カルシウムに対するリパーゼの競合によって促進されるフィターゼ活性の増加によるものであることを示している。

20

【0445】

実施例9．酸性条件でのトウモロコシ（corn）－ダイズ食餌での遊離脂肪酸生成

リパーゼによるトウモロコシ（corn）－ダイズ食餌における遊離脂肪酸生成の研究で得られた結果

pH約2．8で、異なる組み合わせのリパーゼおよびフィターゼを用いて、飼料試料を40℃でインキュベートする。

【0446】

試薬：

適切な試薬およびその濃度は以下のとおりとした。フィターゼアッセイ緩衝液：0．25Mの酢酸ナトリウム、1mMのCaCl₂、0．01%のTween 20、pH5．5。ペプシン溶液：2000U/mlのペプシン（Sigma P7000）を含有する0．75MのHCl。飼料試料には、60．01%のトウモロコシ（corn）、31．52%の大豆粕、48、4%のダイズ油、0．4%の塩、0．2%のDLメチオニン、1．16%の石灰石、1．46%のリン酸二カルシウム、1．25%のVIT/MIN混合物を含む基本的なトウモロコシ（corn）－ダイズ食餌を使用した。

30

【0447】

酵素：

本明細書に記載したようなリパーゼ3。本明細書に記載したようなPhyzyme。TfuIIIリパーゼは、*Bacillus subtilis*で発現される*Thermobifida fusca*（Tfu_0883；NCBI受託番号YP_288944．1）由来の細菌クチナーゼである。材料および方法で説明したようにして、リパーゼアッセイを用いてTfuIIIを分析した。さらに、同じアッセイを用いて酵素を分析したが、pH条件をpH5．5ではなくpH7．0に変更した。pH7．0で測定したリパーゼ活性を、材料および方法のリパーゼアッセイで説明したのと同じ定義を用いて、LIP7Uと表記する。pH5．5で測定したリパーゼ活性（LIPU）とpH7．0で測定したリパーゼ活性（LIP7U）との比は、1：1．4であった。

40

【0448】

Ronozyme P-CTおよびNatuphosは、市販の真菌フィターゼである。試料を乾燥生成物として得た。試料1gを最初に50mlのフィターゼアッセイ緩衝液に再懸濁させ、マグネチックスターラーを用いて20分間抽出した。抽出混合物を最終的

50

に100mlになるまでフィターゼアッセイ緩衝液で満たし、ガラス繊維フィルタで濾過した。材料および方法で説明したフィターゼアッセイに従って、最終抽出物のフィターゼ活性を測定した。

【0449】

リパーゼ試料をH₂Oに入れ、リパーゼ3は酵素活性30LIU/ml、TfuiIは30LIU/mlまで希釈した。

【0450】

フィターゼ試料をフィターゼアッセイ緩衝液に入れて酵素活性5FTU/mlまで希釈した。

【0451】

酸性pHでのin vitroインキュベーション：

以下の酵素の組み合わせをin vitroインキュベーションで評価した。リパーゼ3、リパーゼ3+Ronozyme P、リパーゼ3+Natuphos、リパーゼ3+Phyzyme、TfuiI、TfuiI+Ronozyme P、TfuiI+Natuphos、TfuiI+Phyzyme、リパーゼまたはフィターゼなし。

【0452】

各インキュベーションについて、飼料試料1gを50ml容のネジ蓋式の管に秤量した。それぞれの酵素溶液100μlずつにH₂Oを加えて合計1mlにしたものを、それぞれの管に加えた。次に、ペプシン溶液0.5mlを各管に加え、内容物を慎重に混合した。5つのガラスのビー玉を加えた上で、振盪した水浴中で試料を40℃で45分間インキュベートした。インキュベーション後、管を3500rpmで10分間遠心処理した。「リパーゼなし、かつフィターゼなし」でのインキュベーションの上清のpHを測定した。最後に、試料を液体窒素中で冷凍し、凍結乾燥機に一晩入れておいた。すべてのインキュベーションを二重に実施した。

【0453】

遊離脂肪酸測定：

インキュベーション時に生成された遊離脂肪酸の量を、NEFA-HR(2)キット(WAKO Chemicals GmbH)を用いて測定した。試料を室温に置き、96%エタノール20mlを加えた。試料を手作業で再懸濁させた上で、ロータリーホイールで室温にて1時間混合した。混合後、試料を3500rpmで10分間遠心処理した。上清を96%エタノールで5倍に希釈した上で、試料中の遊離脂肪酸を測定した。110μlのNEFA試薬R1を37℃で5分間平衡化した上で、15μlの希釈試料を加え、反応混合物を37℃で10分間インキュベートした。55μlのNEFA試薬R2を加え、37℃でさらに10分間インキュベーションを継続した。その後、OD_{520nm}を測定した。NEFA標準(WAKO Chemicals GmbH)から作製した標準曲線を用いて、遊離脂肪酸の含有量を計算した。

【0454】

結果：

遊離脂肪酸測定の結果を図29に示す。この図は、トウモロコシ(corn)ーダイズ食餌における遊離脂肪酸生成を示している。産生された遊離脂肪酸(FFA)の量を、リパーゼまたはフィターゼを加えていないブランク値に合わせて補正する。リパーゼなし、かつフィターゼなしのインキュベーションのpHを測定したところpH2.8であったため、本例でのすべてのインキュベーションの代表的なものと仮定した。これは、インキュベーションが極めて酸性度の高い条件で実施されたことを示している。リパーゼ3単独またはPhyzyme、NatuphosまたはRonozyme Pとの組み合わせで、TfuiIを単独またはPhyzyme、NatuphosまたはRonozyme Pとの組み合わせで含むすべての試料と比較して、FFAの有意な放出が示される。これは、リパーゼ3がブタの胃またはニワトリの砂嚢の酸性環境での脂肪の加水分解において極めて効果的であろうことを明らかに示すものである。

【0455】

実施例 10. アッセイ混合物にカルシウムを加えることがフィターゼ活性に対しておよぼす影響ならびに、 CaCl_2 含有アッセイに遊離脂肪酸を加えることによる影響

カルシウムの濃度を上げてのフィチン酸-カルシウム錯体形成の研究で得られた結果ならびに、遊離脂肪酸を加えることによるフィターゼ活性の反転。

【0456】

背景：

フィチン酸は、カルシウムなどの二価のミネラルとの間で、容易にキレート形成可能である。このフィチン酸塩-ミネラル錯体は、不溶性沈殿物として存在することもあれば、可溶性錯体として存在することもあり、フィターゼによる加水分解に対して潜在的に耐性である。遊離脂肪酸は、フィチン酸のフィターゼ耐性形態の形成量の減少ならびに、これに伴う放出されるフィチン酸塩-Pの増加につながる Ca -石鹸を形成することで、競合的キレート剤として潜在的に機能することがある。

10

【0457】

試薬：

適切な試薬およびその濃度は以下のとおりとした。アッセイ緩衝液：0.25 Mの酢酸ナトリウム、3% Triton X-100 (w/v)、pH 5.5。フィチン酸塩溶液：アッセイ緩衝液中の9.1 mMのフィチン酸ナトリウム塩水和物 (Sigma P0109)。 CaCl_2 溶液：アッセイ緩衝液中の0.3 Mの CaCl_2 。FFA溶液：96%エタノールに溶解させた40.8 mg/ml パルミチン酸-ステアリン酸混合物 (Sigma 09586)。エタノール：96%エタノール。

20

【0458】

酵素：

本明細書に記載したような Phyzyme. Ronozyme P-CT および Natuphos は、市販の真菌フィターゼである。本明細書に記載したような BP17。試料を乾燥生成物として得た。試料 1 g を最初に 0.25 M の酢酸ナトリウム、1 mM の CaCl_2 、0.01% の Tween 20、pH 5.5 に再懸濁させ、マグネチックスターラーを用いて 20 分間抽出した。抽出混合物を最終的に 100 ml になるまで 0.25 M の酢酸ナトリウム、1 mM の CaCl_2 、0.01% の Tween 20、pH 5.5 で満たし、ガラス繊維フィルタで濾過した。材料および方法で説明したフィターゼアッセイに従って、最終抽出物のフィターゼ活性を測定した。

30

【0459】

フィターゼ試料を、0.25 M の酢酸ナトリウム、1 mM の CaCl_2 、0.01% の Tween 20、pH 5.5 に入れ、酵素活性 0.3 FTU/ml まで希釈した。

【0460】

フィターゼによるフィチン酸加水分解：

0.5 ml のエタノールを、12 ml 容の試験管で、1.4 ml のアッセイ緩衝液および 1 ml のフィチン酸塩溶液と混合した。混合物を 37°C で 5 分間水浴中で平衡化した上で、0.1 ml のフィターゼ溶液を添加して反応を開始した。ブランク測定のために、フィターゼ溶液の代わりに 0.1 ml のアッセイ緩衝液を加えた。37°C で 1 時間のインキュベーション後、2.5 M の HCl を 0.75 ml 添加して、反応を停止させた。すべてのインキュベーションを二重に実施した。

40

【0461】

CaCl_2 濃度を上げてのフィターゼによるフィチン酸加水分解：

適切な容量の CaCl_2 溶液を、12 ml 容の試験管で、最終アッセイ容量が 3 ml になるまで 0.5 ml のエタノール、1 ml のフィチン酸塩溶液およびアッセイ緩衝液と混合した。混合物を 37°C で 5 分間水浴中で平衡化した上で、0.1 ml のフィターゼ溶液を添加して反応を開始した。ブランク測定のために、フィターゼ溶液の代わりに 0.1 ml のアッセイ緩衝液を加えた。37°C で 1 時間のインキュベーション後、2.5 M の HCl を 0.75 ml 添加して、反応を停止させた。すべてのインキュベーションを二重に実施した。

50

【0462】

15mMの CaCl_2 の存在下、FFA濃度を上げてのフィターゼによるフィチン酸の加水分解：

適切な容量のFFA溶液を、12ml容の試験管で、容量が0.5mlになるまでエタノールと混合した。最終アッセイ容量が3mlになるまで、0.15mlのカルシウム溶液、1mlのフィチン酸塩溶液およびアッセイ緩衝液を加えた。混合物を37℃で5分間水浴中で平衡化した上で、0.1mlのフィターゼ溶液を添加して反応を開始した。ブランク測定のために、フィターゼ溶液の代わりに0.1mlのアッセイ緩衝液を加えた。37℃で1時間のインキュベーション後、2.5MのHClを0.75ml添加して、反応を停止させた。すべてのインキュベーションを二重に実施した。

10

【0463】

フィターゼ活性の測定：

Konelab分析装置にて、リン試薬(Thermo Scientific)を用いて、加水分解試料中の無機リン酸塩濃度を測定した。180 μl のリン試薬を5 μl の試料と混合し、37℃で4分間インキュベートした上で、OD_{340nm}を測定した。sCal Konelab CalibratorおよびNortrol Konelab Control(Thermo Scientific)を用いて、リン酸塩の含有量を計算した。ブランク測定を結果から減算することで、放出された無機リン酸塩としてフィターゼ活性を計算した。すべての活性を CaCl_2 が存在しない試料に対する相対値として計算した。

20

【0464】

結果

図30は、フィチン酸とカルシウムとのフィターゼ耐性錯体の生成ならびに、遊離脂肪酸を加えることによる反転を示す。図30Aは、 CaCl_2 濃度を高めることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。図30Bは、遊離脂肪酸を、15mMを含有する反応混合物に加えることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。

【0465】

CaCl_2 濃度を上げたときのフィチン酸加水分解での結果を図30Aに示す。44種類のフィターゼすべてについて、 CaCl_2 濃度が上がるにつれてフィターゼ活性の低下が観察される。Phyzyme、BP17、Ronozyme Pでは、活性低下が5Mの CaCl_2 で開始されるのに対し、Natuphosは5mMで活性が増加し、15mMの CaCl_2 で活性低下が開始される。20mMの CaCl_2 では、Phyzyme、BP17、Ronozyme Pにフィターゼ活性は観察されず、20mMを超える CaCl_2 濃度では、すべてのフィチン酸が、少なくともPhyzyme、BP17、Ronozyme Pの加水分解に対して錯体耐性で結合されることが示される。Natuphosの場合、30mMの CaCl_2 でフィターゼ活性の有意な低下が観察されるのに対し、60mMの CaCl_2 濃度は、Natuphos加水分解に対する錯体耐性ですべてのフィチン酸を結合するのに必要であるように見える。遊離脂肪酸を、15mMの CaCl_2 を含有する反応混合物に加えることによる、Phyzyme、BP17、Ronozyme Pのフィターゼ活性に対する影響を、図30Bに示す。15mMの CaCl_2 を含有する反応混合物に遊離脂肪酸を加えると、遊離脂肪酸の量が増えるにつれてフィターゼは次第に活性を取り戻す。遊離脂肪酸濃度に応答した3種類のフィターゼ間の小さな差が観察されるが、3種類すべてが25mMの遊離脂肪酸で100%活性を取り戻す。これは、遊離脂肪酸がカルシウムを競合的に結合することで、フィターゼ耐性フィチン酸-カルシウム錯体の形成を防ぐ機能を有し得ることを明らかに示すものである。遊離脂肪酸は、本明細書で例示したように単一の成分として加えてもよいし、トリグリセリド基質に対するリパーゼの作用によって形成することも可能である。

30

40

【0466】

実施例11 リパーゼインキュベーションに続くフィターゼアッセイ-アッセイ混合物にカルシウムを加えることがフィターゼ活性に対しておよぼす影響ならびに、 CaCl_2 含

50

有アッセイにリパーゼ反応ミックスを加えることによる影響

カルシウムの濃度を上げてのフィチン酸-カルシウム錯体形成の研究で得られた結果ならびに、リパーゼ3によって産生される遊離脂肪酸を加えることによるフィターゼ活性の反転。

【0467】

背景：

実施例11では、15mMのCaCl₂を含有するフィターゼ反応混合物に遊離脂肪酸を加えることによるフィターゼ活性に対する影響について説明した。この例では、同様の実験を実施するが、遊離脂肪酸はリパーゼ3によって産生される。トリグリセリドエマルジョンをリパーゼ3とともにインキュベートし、この混合物の画分を後に30mMのCaCl₂を含有するフィターゼ反応混合物に加え、フィターゼ活性に対する影響を観察する。

10

【0468】

試薬：

適切な試薬およびその濃度は以下のとおりとした。リパーゼ試料緩衝液：50mMの酢酸ナトリウム、pH5.0、0.1%のBSA(w/v)、1.2%のNaCl(w/v)。トリグリセリド基質：2%のトリオクタン酸グリセリル(v/v)、0.3%のNaCl(w/v)、13%のTriton X-100(w/v)、120mMの酢酸ナトリウム、pH5.0。フィターゼアッセイ緩衝液：0.25Mの酢酸ナトリウム、pH5.5。フィチン酸塩溶液：アッセイ緩衝液中9.1mMのフィチン酸ナトリウム塩水和物(Sigma P0109)。CaCl₂溶液：アッセイ緩衝液中0.3MのCaCl₂。エタノール：96%エタノール。

20

【0469】

酵素：

本明細書に記載したようなリパーゼ3およびPhyzyme。リパーゼ3試料をリパーゼ試料緩衝液に入れ、酵素活性10LIPU/mlまで希釈した。フィターゼ試料を、0.25Mの酢酸ナトリウム、1mMのCaCl₂、0.01%のTween 20、pH5.5に入れ、酵素活性0.3FTU/mlまで希釈した。

【0470】

リパーゼ反応混合物：

30

5mlのトリグリセリド基質を、12ml容の試験管で、1.0mlのリパーゼ溶液と混合した。ブランク混合物用に、リパーゼ溶液の代わりに1.0mlのリパーゼ試料緩衝液を加えた。混合物を連続的に攪拌しながら30℃で120分間水浴中でインキュベートした。以後のフィターゼアッセイで、混合物をそれぞれリパーゼ反応混合物またはブランク反応混合物として直接使用した。

【0471】

ブランク反応混合物を含む、CaCl₂濃度を上げてのフィターゼによるフィチン酸加水分解：

適切な容量のCaCl₂溶液を、12ml容の試験管で、最終アッセイ容量が3mlになるまで1.3mlのブランク反応混合物、1mlのフィチン酸塩溶液およびアッセイ緩衝液と混合した。混合物を37℃で5分間水浴中で平衡化した上で、0.1mlのフィターゼ溶液を添加して反応を開始した。ブランク測定のために、フィターゼ溶液の代わりに0.1mlのアッセイ緩衝液を加えた。37℃で1時間のインキュベーション後、2.5MのHClを0.75ml添加して、反応を停止させた。

40

【0472】

30mMのCaCl₂およびリパーゼ反応混合物の存在下、フィターゼによるフィチン酸加水分解：

1.3mlのブランク反応混合物またはリパーゼ反応混合物を、12ml容の試験管で、最終アッセイ容量が3mlになるまで0.3mlのカルシウム溶液、1mlのフィチン酸塩溶液およびアッセイ緩衝液と混合した。混合物を37℃で5分間水浴中で平衡化した

50

上で、0.1 ml のフィターゼ溶液を添加して反応を開始した。37℃で1時間のインキュベーション後、2.5 M の HCl を 0.75 ml 添加して、反応を停止させた。

【0473】

フィターゼ活性の測定：

Konelab 分析装置にて、リン試薬 (Thermo Scientific) を用いて、加水分解試料中の無機リン酸塩濃度を測定した。180 µl のリン試薬を 5 µl の試料と混合し、37℃で4分間インキュベートした上で、OD_{340nm}を測定した。sCal Konelab Calibrator および Nortrol Konelab Control (Thermo Scientific) を用いて、リン酸塩の含有量を計算した。ブランク測定を結果から減算することで、放出された無機リン酸塩としてフィターゼ活性を計算した。すべての活性を CaCl₂ が存在しない試料に対する相対値として計算した。

10

【0474】

結果

図31は、フィチン酸とカルシウムとのフィターゼ耐性錯体の生成ならびに、リパーゼを含むリパーゼ反応混合物を加えることによる反転を示す。図31Aは、CaCl₂濃度を高めることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。図31Bは、リパーゼ反応混合物を、30 mM の CaCl₂ を含有するフィターゼ反応混合物に加えることによるフィターゼ活性に対する影響を示す。

【0475】

20

ブランクリパーゼ反応混合物の存在下（リパーゼ存在せず）で CaCl₂ 濃度を上げたときのフィチン酸加水分解での結果を図31Aに示す。CaCl₂ 濃度が上がるにつれてフィターゼ活性の低下が観察され、30 mM の CaCl₂ でフィターゼ活性が有意に低下し、40 mM の CaCl₂ での残りの活性はない。このカルシウム阻害特性は、実施例11で示す対応の曲線とは異なる。理由は、リパーゼ反応混合物でトリグリセリド基質を乳化するために適用した Triton X-100 の量であり、これが実施例11で説明した実験と比較した場合にフィターゼ反応混合物の Triton X-100 が2倍多くなることにつながる。Triton X-100 濃度の変化によって、フィチン酸とカルシウムとの間で錯体形成の特性が変化する。

【0476】

30

リパーゼ反応混合物を、30 mM の CaCl₂ を含有するフィターゼ反応混合物に加えることによる結果を図31Bに示す。リパーゼを含むリパーゼ反応混合物を加えると、リパーゼを加えていない試料に比してフィターゼ活性が有意に増加する。

【0477】

これは、トリグリセリド基質でのリパーゼ活性によって産生される遊離脂肪酸がカルシウムを競合的に結合することで、フィターゼ耐性フィチン酸-カルシウム錯体の形成を防ぐ機能を有し得ることを明らかに示すものである。フィチン酸-カルシウム錯体が形成されなければ、さらに多くの量のフィチン酸をフィターゼによる分解に一層容易に利用でき、フィターゼ活性の増加につながる。

【0478】

40

動物では、リパーゼ活性の結果としてのフィターゼ活性の増加が、P および Ca 貯留量の増加ならびに見かけ上のアミノ酸消化率の増加につながる (Ravindran, V. et al, Br. Poult. Sci., 41, 193~200 (2000) および Selle, P. H. et al, Livestock Science, 124, 126~141 (2009))。これによって、フィターゼの上にリパーゼを補充していない動物と比較した場合に、P および Ca 貯留量が増加するとともにエネルギー代謝率が増加し、見かけ上のアミノ酸消化率も増える。

【0479】

実施例12 飼料におけるリパーゼの pH 特性

飼料におけるリパーゼ3および腓リパーゼの pH 特性についての研究で得られた結果

50

リパーゼ 3 および腓リパーゼの pH 特性を遅くするために、pH の異なる緩衝液を使用して、飼料試料をリパーゼ 3 および腓リパーゼとともに 40 °C でインキュベートする。

【0480】

酵素：

本明細書に記載したようなリパーゼ 3。ブタ膵臓からのパンクレアチンのような腓リパーゼ (Sigma P7545)。リパーゼ 3 試料を H₂O に入れ、酵素活性 300 LI PU/ml まで希釈した。パンクレアチン試料を H₂O に入れ、濃度 2 mg/ml まで希釈した。

【0481】

試薬：

適切な緩衝液およびその濃度は以下のとおりとした。0.25 M の HCl ; 0.5 M のグリシン-HCl、pH 2.5 ; 0.5 M のグリシン-HCl、pH 3.5 ; 0.5 M のリン酸ナトリウム、pH 6.5 ; 0.5 M のリン酸ナトリウム、pH 7.5 ; 0.5 M の Tris、pH 8.5 ; 1 M の NaHCO₃、pH 10。他の試薬は以下のとおりとした。TDC 溶液：タウロデオキシコール酸ナトリウム (Sigma T0875) を H₂O に入れて 80 mM まで希釈した。飼料試料には、60.01 % のトウモロコシ (corn)、31.52 % の大豆粕、48.4 % のダイズ油、0.4 % の塩、0.2 % の DL メチオニン、1.16 % の石灰石、1.46 % のリン酸二カルシウム、1.25 % の VIT/MIN 混合物を含む基本的なトウモロコシ (corn) -ダイズ食餌を使用した。

【0482】

pH が異なる緩衝液での in vitro インキュベーション：

各インキュベーションについて、トウモロコシ (corn) -ダイズ飼料試料 1 g を 50 ml 容のネジ蓋式の管に秤量した。0.1 ml の酵素溶液に続いて、0.1 ml の TDC 溶液およびそれぞれの緩衝液 1.8 ml を、それぞれの管に加えた。5 つのガラスのビー玉を加えた上で、振盪した水浴中で試料を 40 °C で 120 分間インキュベートした。インキュベーション後、管を 3500 rpm で 10 分間遠心処理し、上清の pH を測定した。その後、試料を液体窒素中で冷凍し、凍結乾燥機に一晩入れておいた。すべてのインキュベーションを二重に実施した。

【0483】

遊離脂肪酸測定：

インキュベーション時に生成された遊離脂肪酸の量を、NEFA-HR (2) キット (WAKO Chemicals GmbH) を用いて測定した。試料を室温に置き、96 % エタノール 20 ml を加えた。試料を手作業で再懸濁させた上で、ロータリーホイールで室温にて 1 時間混合した。混合後、試料を 3500 rpm で 10 分間遠心処理した。上清を 96 % エタノールで 5 倍に希釈した上で、試料中の遊離脂肪酸を測定した。110 μl の NEFA 試薬 R1 を 37 °C で 5 分間平衡化した上で、15 μl の希釈試料を加え、反応混合物を 37 °C で 10 分間インキュベートした。55 μl の NEFA 試薬 R2 を加え、37 °C でさらに 10 分間インキュベーションを継続した。その後、OD_{520nm} を測定した。NEFA 標準 (WAKO Chemicals GmbH) から作製した標準曲線を用いて、遊離脂肪酸の含有量を計算した。

【0484】

結果：

図 32 は、トウモロコシ (corn) -ダイズ食餌で測定したリパーゼ 3 および腓リパーゼの pH 特性を示す。リパーゼ 3 の濃度は飼料 30 LI PU/g であり、腓リパーゼの濃度は飼料 0.2 mg/ml であった。活性を、産生された遊離脂肪酸の測定最大量に対する相対値として示す。

【0485】

異なる緩衝液の pH は、リパーゼ 3 および腓リパーゼのそれぞれについて、以下のとおりとした。0.25 M の HCl で pH 3.41 および pH 3.02 を提供 ; 0.5 M のグリシン-HCl、pH 2.5 で pH 3.99 および pH 3.76 を提供 ; 0.5 M のグリ

10

20

30

40

50

シン- HCl 、 pH 3.5で pH 4.93および pH 5.18を提供；0.5Mのリン酸ナトリウム、 pH 6.5で pH 6.45および pH 6.45を提供；0.5Mのリン酸ナトリウム、 pH 7.5で pH 7.26および pH 7.22を提供；0.5Mの Tris 、 pH 8.5で pH 8.33および pH 8.18を提供；1Mの NaHCO_3 、 pH 10で pH 9.95および pH 10.07を提供。リパーゼ3の場合、飼料の pH 最適値は、低めと高めの両方の pH で活性が低下する pH 4.0に見られる。 pH 3.4が評価した最低 pH で、 pH をさらに下げれば活性はおそらく低下しつづける。膵リパーゼの場合、飼料の pH 最適値は低めと高めの両方の pH で活性が低下する pH 8.2に見られる。結論として、リパーゼ3の pH 特性は、膵リパーゼの pH 特性とは極めて異なる。さらに、リパーゼ3の pH 特性は、リパーゼ3がブタの胃またはニワトリの砂嚢の酸性環境での脂肪の加水分解において極めて効果的であろうことを示している。

10

【0486】

実施例13 リパーゼ、フィターゼ、リパーゼ+フィターゼの組み合わせを補った食餌 vs. 対照食餌のブロイラー鶏におけるリンおよびカルシウムの回腸消化率および全消化管貯留。

【0487】

材料および方法

リパーゼまたはフィターゼ自体、リパーゼおよびフィターゼの組み合わせを補った食餌 vs. 陰性対照の食餌を与えたブロイラー鶏におけるPおよびCaの回腸消化率ならびに、全消化管貯留を評価するための実験を実施した。食餌（表4）は、トウモロコシ（c o r n）および大豆粕を主成分にしたもので、トウモロコシ（c o r n）DDGS、コーングルテンミール、ダイズ油を含有していた。

20

【0488】

【表 8】

表 4. 食餌の組成および計算した分析(給餌時 g/kg)

成分	プリスターター (0-14 d; g/kg)	陰性対照 (14-21 d; g/kg)
トウモロコシ(corn)	498.3	496.8
トウモロコシ(corn) DDGS	50.0	50.0
コーングルテンミール、60%	50.0	50.0
大豆粕、48%	311.9	312.2
トウモロコシ(maize)/コムギ デンプン	2.0	2.0
ダイズ油	40.0	40.0
リジン HCl	3.8	3.8
DL- メチオニン	2.7	2.7
L-トレオニン	1.0	1.0
不活性マーカー	3.0	3.0
塩	3.6	3.6
石灰石	13.8	3.0
リン酸ニカルシウム	16.4	13.5
微量ミネラル - ビタミンプレミックス	3.5	3.5
Space (酵素)	0.0	14.9
計算した分析		
代謝可能なエネルギー、kcal/kg	3.140	3.100
粗タンパク質、g/kg	240	240
消化可能なリジン、g/kg	12.6	12.6
消化可能なメチオニン、g/kg	6.4	6.4
消化可能なメチオニン+システイン、g/k	9.0	9.0
消化可能なトレオニン、g/kg	7.9	7.9
カルシウム、g/kg	10.5	5.7
利用可能なリン、g/kg	4.3	3.8

【0489】

実験での設計は、6つの複製ケージ（1ケージあたり8羽）に以下のようにして各々無作為に割り当てて、6回の食餌処置で構成した

1. 陰性対照（NC）
2. NC+リパーゼ（1, 000 LIPU/kg）
3. NC+リパーゼ（3, 000 LIPU/kg）
4. NC+フィターゼ（500 FTU/kg）
5. NC+フィターゼ（500 FTU/kg）+リパーゼ（1, 000 LIPU/kg）
6. NC+フィターゼ（500 FTU/kg）+リパーゼ（3, 000 LIPU/kg）

【0490】

環境制御した部屋で、電気加熱した電池式の育雛器に1日齢のブロイラーのヒヨコを無作為に割り当てた。ヒヨコに一定の蛍光照明を当て、食餌および水を自由に摂取できるようにしておいた。これらの鳥に、14日目まではプリスターターの食餌を与えた。この日齢で、体重を元にして鳥に食餌処置を割り当て、飼育ケージに移した。鳥には14日目から21日目まで実験食餌を与えた。第1週目は温度を31℃に維持した後、次第に下げて3週目までに22℃にした。

【0491】

孵化後17日目から20日目まで飼料の摂取と各ケージの全排泄物を測定した。各ケー

ジの排泄物を貯め、ブレンダーで混合し、サブサンプリングした。各サブ試料を凍結乾燥させ、0.5 mmのふるいに通るように粉碎して、分析するまで気密性のプラスチック容器で-4℃で保管した。食餌および排泄物試料を、乾燥物質(DM)、カルシウム(Ca)、亜リン酸(P)について分析した。

【0492】

21日目、各複製ケージから2羽の鳥を選び、ペントバルビタールナトリウムを心臓内注射して安楽死させた。小腸をすみやかに露出させ、蒸留水でプラスチック容器の中に静かにフラッシュして回腸の下半分の内容物を回収した。回腸は、臍卵黄管憩室から回盲結合部分に40 mm近い点まで延在する小腸の一部であると定義した。消化管内容物をケージの中に貯め、凍結乾燥させ、0.5 mmのふるいに通るように粉碎し、DM、チタン、Ca、Pについて実験室で分析するまで気密性の容器に入れて-4℃で保管した。

10

【0493】

SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) のPROC MIXED法を用いて、ANOVAでデータを分析した。モデルには、食餌処理の固定作用とブロックのランダムな作用とを含めた。ペアにしたt検定を用いて平均を分けた。それぞれの囲いで、すべての計算の実験単位を考慮した。統計的有意性の判断にはαレベル0.05を使用した。

【0494】

結果

図33は、フィターゼが陰性対照と比較してリン回腸消化率を有意に高めなかったが、予想どおり6.0%の数字の増分を生じたことを示す。リパーゼは、1,000および3,000 LI PU/kgの両方で、陰性対照と比較して回腸リン消化率に何ら効果を生まなかった。対照的に、リパーゼ+フィターゼの組み合わせでは、陰性対照に比して回腸リン消化率を、リパーゼ包含量1,000 LI PU/kgで14.3%、3,000 U/kgで10.6%と有意に高めることが可能であった。リパーゼ+フィターゼの組み合わせは、リパーゼを1,000 u/kgで含ませた場合にのみ、フィターゼ処置と比較して、回腸リン消化率を7.8%の差で有意に高めるものである。

20

【0495】

図34は、どの酵素処置でも、陰性対照の食餌と比較して回腸カルシウム消化率に有意な効果がないことを示す。それにもかかわらず、フィターゼ+リパーゼの組み合わせで数字的に最高のCa消化率値が観察され、リパーゼを1,000 u/kgおよび3,000 u/kgで含ませたときに、それぞれ陰性対照の食餌で得られた値の118.3%および115.6%という値を呈した。

30

【0496】

図35は、リパーゼを含ませてもフィターゼを含ませても、陰性対照と比較して全消化管リン貯留の有意な差につながらなかったことを示す。それにもかかわらず、フィターゼで、陰性対照と比較してリン貯留の数字に9.7%の増分を生じた。リパーゼ+フィターゼの組み合わせは、陰性対照と比較して、リパーゼを1,000および3,000 LI PU/kgで補ったときにそれぞれリン貯留を13.4%および16.0%と有意に増加させた。

40

【0497】

図36は、リパーゼを含ませてもフィターゼを含ませても、陰性対照と比較して全消化管カルシウム貯留の有意な差につながらなかったことを示す。しかしながら、フィターゼと3,000 LI PU/kgとの組み合わせで、陰性対照と比較してCa貯留が有意に17.7%増加した。

【0498】

合成時、現時点の研究では、リパーゼとフィターゼのどちらもPおよびCa消化率に対して有意な効果を生じなかった。しかしながら、フィターゼと1,000 LI PU/kgのリパーゼとを組み合わせると、陰性対照と比較して回腸および全消化管リン貯留が増加し、フィターゼを含ませた場合と比較して回腸リン消化率が増加した。フィターゼと3,

50

000LIPU/kgのリパーゼとを組み合わせると、陰性対照と比較して、回腸および全消化管リン貯留が増加し、全消化管Ca貯留も増加した。カルシウムおよびリンの吸収および利用時におけるこれらのフィターゼの上にあるリパーゼの増分的な効果は、主に胃腸管でのリパーゼによる遊離脂肪酸の生成と関連しているように見える。これは、本明細書に記載の*in-vitro*の実施例で確認したように、カルシウムとの競合を促進し、フィターゼ活性を改善するものである。

【0499】

【表 9】

特許手続上の微生物の寄託の国際的
承認に関するブダペスト条約
(国際様式)

ダニスコ・グローバル・
イノベーション
ソケリタアンティエ 20
カントビク 02460
フィンランド

10

本葉末部の国際寄託当局によっ
て規則 7.1 に従って発行された
原寄託の件の受託証

I. 微生物の表示

寄託者が付した識別のための番号：
P 1 - 2 9

国際寄託当局の受託番号：
NCIMB 4 1 2 4 8

20

II. 科学的性質および／または分類学上の位置

I 欄の微生物には分類学上の位置についての提案が添付されていた。

III. 受領および受託

当国際寄託当局は 2 0 0 4 年 9 月 2 2 日に受領した I 欄の微生物を受託
する。

30

V. 国際寄託当局

名称：NCIMB L t d.,

住所：ファーガソンビルディング,
クレイブストーンエステート,
バックスバーン, アバディーン,
AB21 9YA
スコットランド, イギリス国

40

署名

2 0 0 4 年 1 1 月 1 日

【表 1 0】

特許手続上の微生物の寄託の国際的
承認に関するブダペスト条約
(国際様式)

ダニスコ・グローバル・
イノベーション
ソケリテタアンティエ 20
カントビク 02460
フィンランド

10

本葉末部の国際寄託当局によっ
て規則 10.2 に従って発行され
た生存証明書

I. 寄 託 者

名称：上記のとおり

II. 微生物の表示

国際寄託当局が付した受託番号：

NCIMB 41248

寄託又は送付日

2003年9月22日

20

住所：

III. 生 存 証 明

II 欄の微生物の生存について2004年9月23日に試験された。
この日時には微生物が生存していた。

30

V. 国際寄託当局

名称：NCIMB Ltd.,

住所：ファーガソンビルディング,
クレイプストーンエステート,
バックスバーン, アバディーン,
AB21 9YA
スコットランド, イギリス国

40

署 名

2004年11月1日

【0 5 0 1】

【表 1 1】

特許手続上の微生物の寄託の国際的
承認に関するブダペスト条約
(国際様式)

ダニスコ・バイオテクノロジー
ランゲブローガーデ 1,
PO Box 17,
DK-1001, コペンハーゲン
デンマーク

10

本葉末部の国際寄託当局によっ
て規則 7.1 に従って発行された
原寄託の件の受託証

I. 微生物の表示

20

寄託者が付した識別のための番号：

国際寄託当局の受託番号：

大腸菌 (*Escherichia coli*)K12 DH5 α -pLIP4

NCIMB 40863

II. 科学的性質および／または分類学上の位置

I 欄の微生物には分類学上の位置についての提案が添付されていた。

30

III. 受領および受託

当国際寄託当局は 1997 年 2 月 24 日に受領した I 欄の微生物を受託
する。

V. 国際寄託当局

名称：NCIMB Ltd.,

40

住所：セントマーチャードライブ 23,
アバディーン, スコットランド,
イギリス国
AB2 1RY

署名

1997 年 3 月 6 日

【表 1 2】

特許手続上の微生物の寄託の国際的
承認に関するブダペスト条約
(国際様式)

ダニスコ・バイオテクノロジー
ランゲブローガーデ 1,
PO Box 17,
DK-1001, コペンハーゲン
デンマーク

10

本葉末部の国際寄託当局によっ
て規則 10.2 に従って発行され
た生存証明書

I. 寄託者

名称:

住所: 上記のとおり

II. 微生物の表示

国際寄託当局が付した受託番号:

NCIMB 40863

寄託又は送付日

1997年2月24日

20

III. 生存証明

II 欄の微生物の生存について1997年2月28日に試験された。
この日時には微生物が生存していた。

30

V. 国際寄託当局

名称: NCIMB Ltd.,

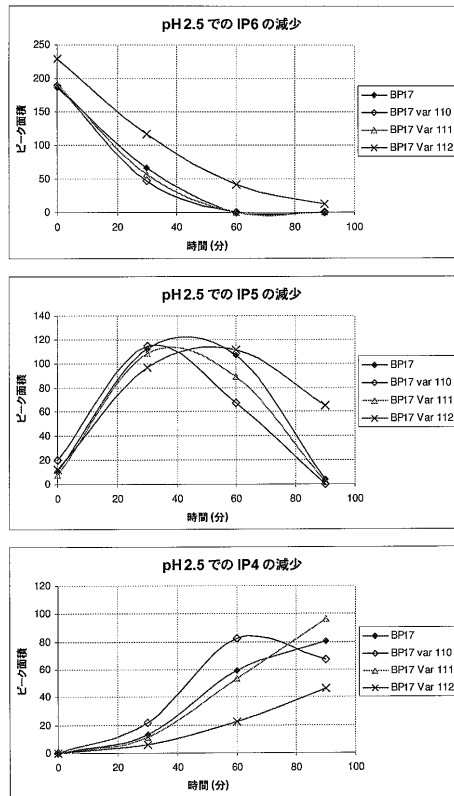
住所: セントマーチャードライブ 23,
アバディーン, スコットランド,
イギリス国
AB2 1RY

40

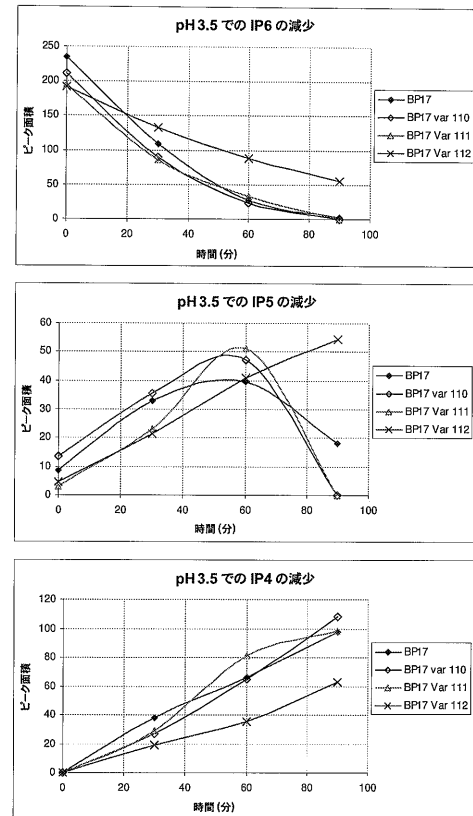
署名

1997年3月6日

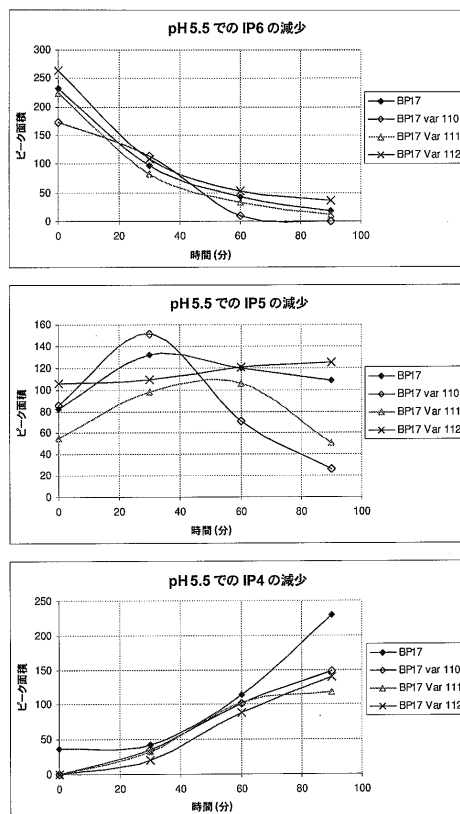
【図 14】



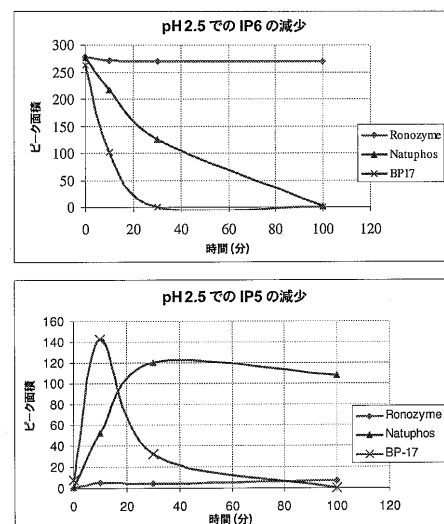
【図 15】



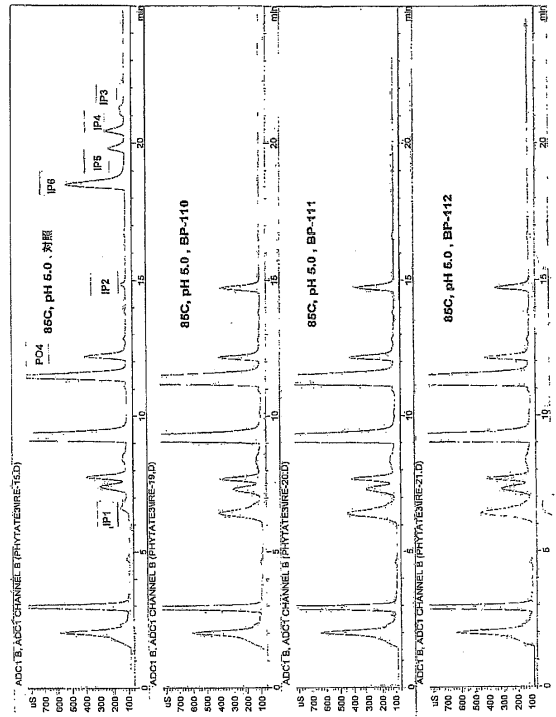
【図 16】



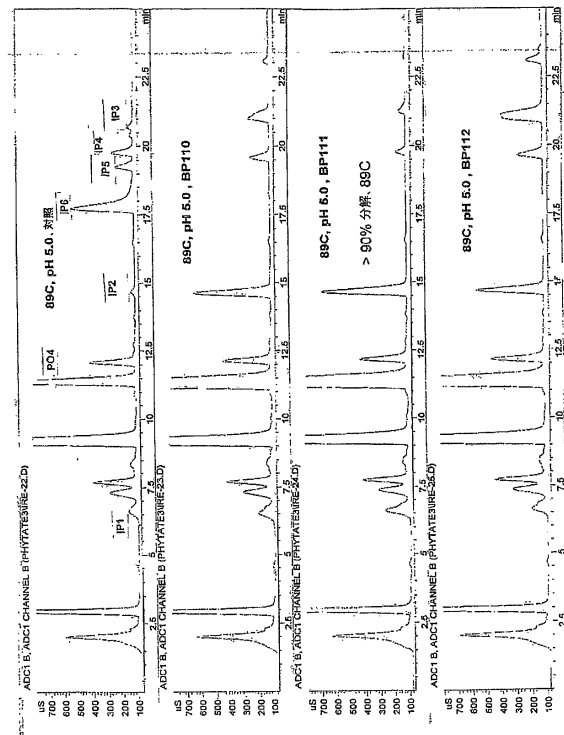
【図 17】



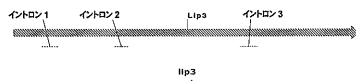
【図 18】



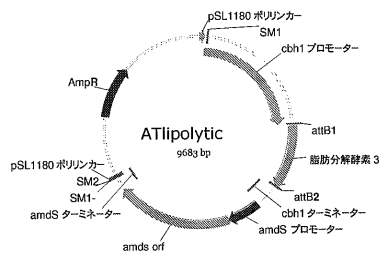
【図 19】



【図 20】



【図 21】



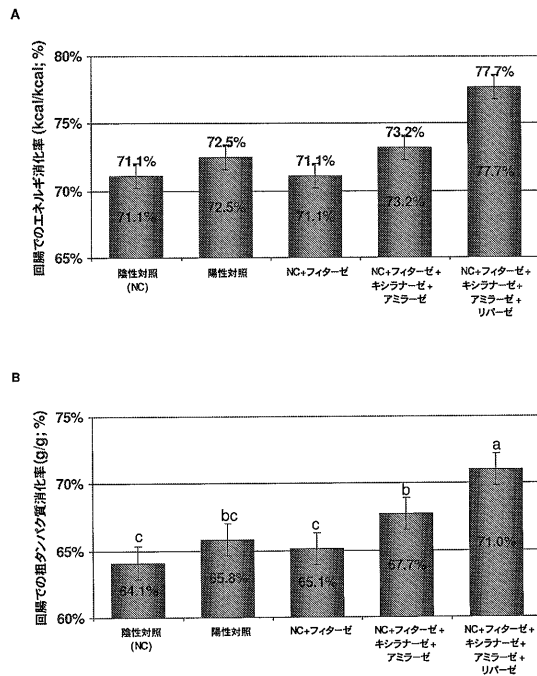
【図 22】

野生型ブチアウセラ (*Buttiauxella*) sp. P1-29 フィターゼ (配列番号 11) の配列をコードする核酸配列

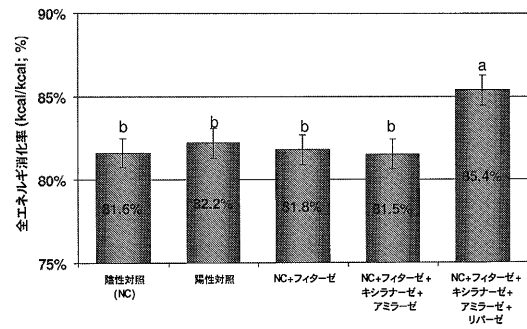
```

AAGCACTCCCGCTTCAGGCTACCGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCCGCCAGGGGTGCGAGC
ACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTAACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAT
TGGGTTATATCAGCCACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGTTT
CAACAACAGGGCATTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACAACTCAATTTATGCTGGGCGAGCGT
TGATCAGCGCACGCTTAAACTGGCGAAGCTTCTGGCAGGGCTTGCTCCGAATGTCATTTAACTA
TTCACCAACAGCAGGACATCAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGCGACCTGTTCA
ATGGATAAACTCAGGTCCAACAGGCGGTTGAAAAAGAGCTCAAAACCCCATTTGATAATCTGAATCA
GCACTATATTCCTTTCTGGCCTTGATGAATACGACCCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTGAGA
AACACAGCGCGGATAAAAGCTGTGATTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGCGATAAAAGATAAT
GGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTCGTCTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGTGGA
ATATGCGCAAGGGATGCGCAAGCGGCGTGGGGGAATATTCATTACAGCAAGAGTGGCGTCGCTAC
TGAACTGCATAACGTCAGTTTGATTGATGGCAGCAGCGCTTATATCGCCAGACATAACGGCAGC
CCTTTATTGAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCGAATGCCACCGAAAGCAAACTGCTGATATCTC
ACCTGACAATAAGATCTGTTTATGCGGACAGCATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA
ACATGCGCTGGAGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGCGGCGCTTTAGTCTTTGAGCGT
TTGGCCGATAAGTCAGGGAACAATATGTTAGCGTGAGCATGGTGATCAGACTCTCGAGCAGTTGCG
CTCCCAACACCACTTAGCCTTAATCAACCTCGCGGAAGCGTACAGTAAAAATCCTGGCTGTAACG
ATCAGACGGCTGAAGGATANTGCCCGCTGTCGAGTTCAGTCTCGGNGGTTAGCCAAGCGTGAACCA
GGCTGCCAGCTACAGTAA
  
```

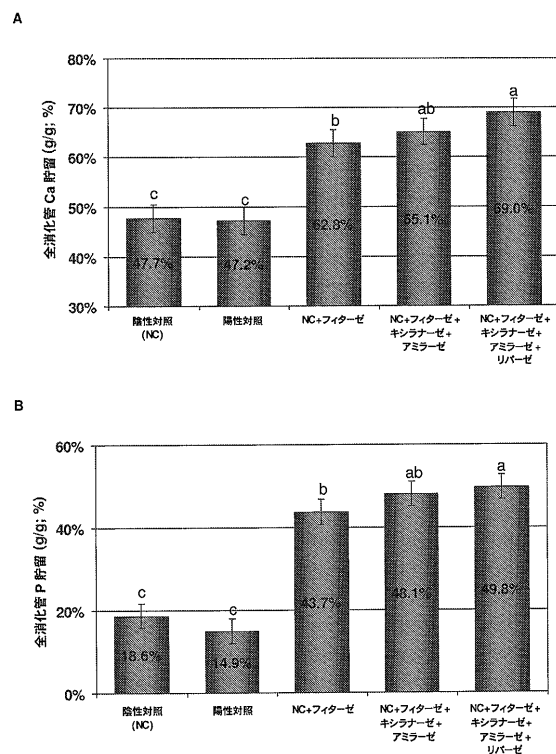
【図 23】



【図 24】



【図 25】



【図 26】

配列番号 12

```

1  MKAILIPFLS  LLILPTQSA  FAQSEPELKL  ESVIVSRHG  VRAPTKATQL
51  MQDVTPDAMP  TWPVKLGWLT  PRGGELIAYL  GHYQRQRIVA  DGLLAKKGCP
101 QSGQVAIIAD  VDERTRKTGE  AFAAGLAPDC  AITVHTQADT  SSPDPLFNPL
151 KTGVCQLDNA  NVTDAILSRA  GGSIAFTGTH  RQTAFRELER  VLNFPQSNLC
201 LKREKQDESC  SLTQALPSEL  KVSADNVSLT  GAVSLASMLT  EIFLLQQAQG
251 MPEPGWGRIT  DSHQWNLLS  LHNAQPYLLQ  RPEVARSRRA  TPLLDLIKTA
301 LTPHPQKQA  YGVTLPTSVL  FIAGHDTNLA  NLGGAELNWL  TLPQPDNTP
351 PGGELVFERW  RRLSDNSQWI  QVSLVPQTLQ  QMRDKTPLSL  NTPPGVEKLT
401 LAGCEERNAQ  GMCSLAGFTQ  IVNEARIPACSL

```

野生型大腸菌 (*E.coli*) フィターゼ (シグナル配列をボールドで)

【図 27】

配列番号 13

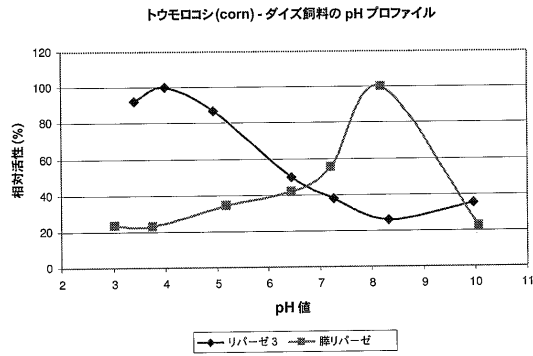
```

1  QSEPELKLES  VVIVSRHGVR  APTKATQLMQ  DVTPDAMPWI  PVKLGWLTIPR
51  GGELIAYLGH  YQRQLVADG  LLAKKGCPQS  GQVAIADVD  ERTKRTGEAF
101 AAGLAPDCAI  TVHTQADTSS  PDPLFNPLKT  GVCQLDNANV  TDAILSRAGG
151 SIADFTGHRQ  TAFRELERVL  NFPQSNLCLK  REKQDESCSL  TQALPSELKV
201 SADNVSLTGA  VSLASMLTEI  FLLQQAQGM  EPGWGRITDS  HQWNLLSLH
251 NAQFYLLQRT  PEVARSRATP  LLDLIKALT  PHPPQKQAYG  VTLPTSVLFI
301 AGHDTNLANL  GGAELNWL  PGQPDNTPPG  GELVFERWRR  LSDNSQWIVQ
351 SLVEFTLQOM  RDKTPLSLNT  PPGEVKLTIA  GCEERNAQGM  CSLAGFTQIV
401 NEARIPACSL

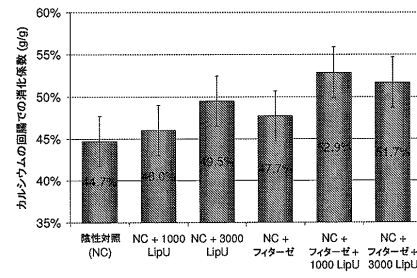
```

成熟大腸菌 (*E.coli*) フィターゼ

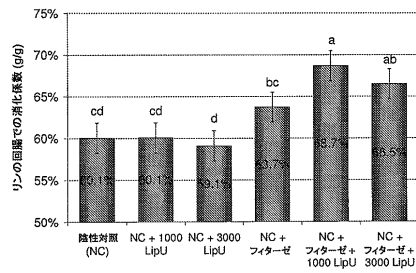
【図 3 2】



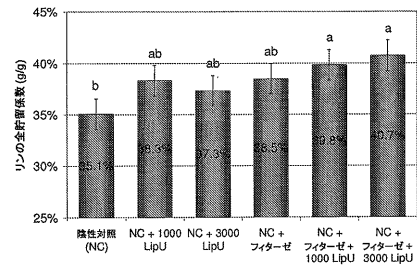
【図 3 4】



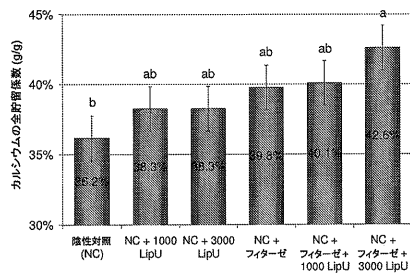
【図 3 3】



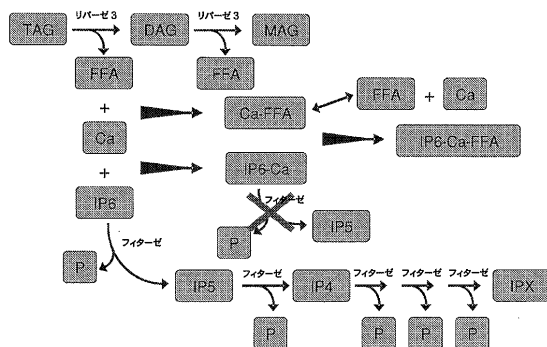
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



【配列表】

0005829603000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 0922467.6
 (32)優先日 平成21年12月23日(2009.12.23)
 (33)優先権主張国 英国(GB)
 (31)優先権主張番号 61/312,413
 (32)優先日 平成22年3月10日(2010.3.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)
- (72)発明者 リッケ・ホーフ・ロレンツェン
 デンマーク国デーコーー8220プラパント, エトヴィンラルスヴェーイ38
- (72)発明者 ペーター・ブラムステッド
 イギリス国ウィルトシャー エスエヌ8 1エーエー, マールバラ, マーケットハウスアリスパー
 リーコートハイストリート, ダニスコ(ユー・ケイ)・リミテッド
- (72)発明者 ルイス・フェルナンド・ロメロ・ミラン
 イギリス国ウィルトシャー エスエヌ8 1エーエー, マールバラ, マーケットハウスアリスパー
 リーコートハイストリート, ダニスコ(ユー・ケイ)・リミテッド
- (72)発明者 スーザン・エム・マドリッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94030, ミルブレイ, ボニートウェイ211イー1
- (72)発明者 チェリー・リン
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94087, サニーバイル, アーブルコート1020
- (72)発明者 マイケル・ウォード
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94114, サンフランシスコ, トゥエンティーフォースストリ
 ート4372
- (72)発明者 マースト・ラヤビ・サルカヒ
 デンマーク国デーコーー8230オービヘイ, カスタニアレー9ペー

審査官 坂田 誠

- (56)参考文献 国際公開第98/045453 (WO, A1)
 特表2008-516597 (JP, A)
 国際公開第2007/128160 (WO, A1)
 国際公開第2007/082693 (WO, A1)
 国際公開第2007/136553 (WO, A1)
 YEASTURE, 2007年 8月13日, URL, <https://web.archive.org/web/20070813065459/http://www.cenzone-europe.com/Eng/YeastureEn.htm>
 Eun-Young Kim, Selection of Lactobacillus sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs, The Journal of General and Applied Microbiology, 2007年, Vol.53, 111-117
 The effect of xylanase, phytase and lipase supplementation on the performance of broiler chickens fed a diet with a high level of rice bran., 17th Annual Australian Poultry Science Symposium, 2005年, Vol.17, 305-307, URL, <http://sydney.edu.au/vetscience/apss/documents/2005/APSS2005-mulyantini-pp305-307.pdf>

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A23K 1/00-3/04
 C12N 9/14
 C12N 9/20