

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4307713号  
(P4307713)

(45) 発行日 平成21年8月5日(2009.8.5)

(24) 登録日 平成21年5月15日(2009.5.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 11/02	(2006.01)	C 12 N 11/02
C 12 N 11/14	(2006.01)	C 12 N 11/14
C 12 P 7/64	(2006.01)	C 12 P 7/64

請求項の数 5 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2000-526622 (P2000-526622)  
 (86) (22) 出願日 平成10年12月16日 (1998.12.16)  
 (65) 公表番号 特表2002-500007 (P2002-500007A)  
 (43) 公表日 平成14年1月8日 (2002.1.8)  
 (86) 國際出願番号 PCT/DK1998/000554  
 (87) 國際公開番号 WO1999/033964  
 (87) 國際公開日 平成11年7月8日 (1999.7.8)  
 審査請求日 平成17年12月13日 (2005.12.13)  
 (31) 優先権主張番号 1527/97  
 (32) 優先日 平成9年12月23日 (1997.12.23)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 500586299  
 ノボザイムス アクティーゼルスカブ  
 デンマーク国、デーコーー 2880 バグ  
 スバエルト、クロシェイバイ 36  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100092624  
 弁理士 鶴田 準一  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100108110  
 弁理士 日野 あけみ  
 (74) 代理人 100108903  
 弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酵素の固定化方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a )  $20 \sim 1000 \text{ m}^2 / \text{g}$  の表面積、 $200 \sim 1000 \mu\text{m}$  の粒径を有し、  
 (1) 親水性若しくは疎水性の液体又はその混合物中で不溶性であり、親水性表面を有する無機性材料、  
 (2) 親水性若しくは疎水性の液体又はその混合物中で不溶性であり、疎水性の表面を提供するために有機性部分で覆われた無機性材料、又は  
 (3) 有機性ポリマー樹脂、

から選択される材料を含んで成る粒子状の多孔性担体を流動床中で流動化すること、  
 b ) 酵素を担体に固定するために、酵素を含む液体培体を噴霧によって流動床中に導入すること、ここで、当該液体は前記担体の凝集が起こらないような量で導入される、及び  
 c ) 流動床中の担体から液体培体の揮発性成分を除去すること、  
 を含んで成る、自由水を欠く主に有機性の培体中での使用のための固定化酵素調製物の製造方法。

## 【請求項 2】

- a ) 担体に酵素を吸着させるために、その酵素を含む液体培体を、親水性若しくは疎水性の液体又はその混合物中で不溶性であり、 $20 \sim 1000 \text{ m}^2 / \text{g}$  の表面積、 $200 \sim 1000 \mu\text{m}$  の粒径、及び疎水性表面を有する粒子状の多孔性担体と接触させること、  
 b ) 吸湿性物質を導入して、過剰な液体の吸収による担体の凝集を抑制すること、及び  
 c ) 流動床中の前記産物から、液体培体の揮発性成分及び吸湿性物質を除去すること、

10

20

ここで、前記吸湿性物質は、過剰な液体を吸収する能力のある、親水性の、粒状の微粉碎された任意の成分である、を含んで成る、自由水を欠く主に有機性の培体中の使用のための、固定化酵素調製物の製造方法。

**【請求項 3】**

段階(1)の無機性材料がシリカ、ゼオライト、アルミナ及びカオリיןから成る群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記液体培体が水性培体である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記酵素がリバーゼである、請求項1に記載の方法。 10

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

**発明の分野**

本発明は本質的に自由水を欠く主に有機性の培体中の使用のための固定化酵素調製物の製造方法、及び有機合成のための固定化酵素調製物の使用に関する。

**発明の背景**

固定化酵素は有機合成のために使用されることが知られている。

**【0002】**

最も一般的な固定化酵素は、本質的に自由水を欠く主に有機性の培体中のエステル化反応のために使用されるリバーゼである。 20

欧州特許第140542号B2は、酵素を含む液体が、担体を前記液体中に分散させること、及び磁気攪拌器での攪拌により混合することによって弱陰イオン交換樹脂担体との接触をもたらし、それによって酵素が担体上に固定化される方法を記載している。固定化は、その後に酵素・担体の真空乾燥が続く。

**【0003】**

国際公開第95/22606号は、酵素を含む液体が、混合器中で前記液体を担体上に噴霧すること、その後に続けて環境条件で一晩の乾燥をすることにより、多孔性シリカ担体との接触をもたらす方法を記載している。

従来技術において記載されている工業的固定化方法において、前記担体又は支持材料はカラム形の吸着容器内に据えられ、そして酵素を含む液体は、担体上への酵素の十分な吸着が得られるまで再循環する。次の吸着段階で、酵素・担体産物を盆の中にすくい取ることによってカラムを空にする。前記産物を次に真空下室温で14~16時間の周期で盆に据えることによって乾燥させる。 30

**【0004】**

国際公開第94/26883号は、酵素をNaCl、ソーダ、及びシリカを含み、保護的な外層によって前記産物を任意にコートしている多孔性材料上に吸収されることにより、粉じんの無い酵素顆粒の製造方法を記載している。一般的に酵素の固定化は、顆粒化が完全に異なる目的を達成するので酵素の顆粒化と比較されるべきではなく、すなわち、それが水層中の顆粒の崩壊及び/又は酵素の溶解により、水溶液に運ばれうる酵素を供給するための、非飛散性の材料を提供するからである。酵素の固定化は、酵素産物を、その酵素が固定されるが機能的であり、そしてその酵素がそれを適用した溶媒に遊離しないように、担体上に固定化することに関する。 40

**【0005】**

当業界で知られた固定化方法は、困難な及び手動の段階を含み、そして大変な設備投資を必要とし(例えば真空室)、これは、今度は柔軟性のない製造法及び製品が高価なことを意味する。

**発明の要約**

本発明は、標準的な多目的の製造装置によって有意に能力を増大し、そして人件費を減少させる、工業的な酵素の固定化のための、代わりの方法を提供する。

**【0006】**

50

このように本発明は、本質的に自由水を欠く主に有機性の培体中の使用のための、固定化酵素調製物の製造方法を提供し、これは第1の観点において：

- a ) 流動床において特定の多孔性担体を流動化すること、
- b ) 酵素を担体に固定するために、酵素を含む液体培体を噴霧によって流動床に導入すること、及び
- c ) 流動床中の担体から液体培体の揮発性成分を除去すること、  
を含んで成る。

#### 【0007】

第2の観点において、本発明は：

- a ) 担体に酵素を吸着させるために、その酵素を含む液体培体を実質的に疎水性の表面を有する特定の多孔性担体と接触させること、
- b ) 過剰な液体の吸収によって担体の凝集を抑制するために、吸湿性物質を導入すること、及び
- c ) 流動床中の前記産物から、液体培体の揮発性成分及び吸湿性物質を除去すること、  
を含んで成る。

#### 【0008】

終わりに、第3の観点において、本発明は：

- a ) 担体に酵素を固定するために、噴霧によって酵素を含む液体培体の酵素を実質的に親水性の表面を有する特定の多孔性担体上に導入すること（ここで前記液体は、前記担体の凝集が実質的に起きないような量で導入される）、
- b ) 流動床中の前記産物から、液体培体の揮発性成分を除去すること、  
を含んで成る。

#### 発明の詳細な説明

##### 担体

本発明の態様において、前記担体は特定の多孔性材料である。その粒子は、ふさわしくは直径が200～1000μm、好ましくは400～700μmの大きさであり；20～1000m<sup>2</sup>/g、好ましくは100～700m<sup>2</sup>/gの表面積を有し、そして100～500nm、好ましくは100～300nmの細孔サイズを有する。

#### 【0009】

前記担体の粒子は無機性、有機性、又は無機性及び有機性両方の材料を含みうる。前記担体は更に、親水性又は疎水性の表面を有することがある。

本発明の第1の態様において、前記担体の粒子は、親水性若しくは疎水性の液体又はそれらの混合物に本質的に不溶である、実質的に親水性の表面を有する無機性材料を含んで成る。好ましい担体はシリカ（例えばManville, USA のセライト）、ゼオライト（例えばDe qussa, GermanyのWessalith MS330）、アルミナ、セラミック（例えばYoshihiko Hirose等が開示したもの（3<sup>rd</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, La Grande Motte, France, 1997, p238に起因））及びカオリン（米国特許第5,614,401号に開示された、酸、熱水及びベーキング処理にかけられたカオリン）に基づくことがある。

#### 【0010】

本発明の第2の態様において、前記担体の粒子は第1の態様において記載した様な親水性の無機性材料を含んで成り、そして実質的に疎水性の表面を有する有機性の部分、例えば日本特許第09000257-A号に記載の様なもので覆われ、ここでは、酸処理されたカオリン担体が、N-フェニル-α-アミノプロピルトリメトキシシランを用いてコートされた。更なる担体が日本特許08126489-A号に記載され、ここで水に不溶の担体が、酵素を用いてジスルフィド結合を形成するポリマーでコートされる。担体の第3の型が、Biotechnology Techniques vol.3 No 5 345～348に記載され、ここでセラミック担体がポリエチレンアミン、ポリエチレンイミン又は3-アミノプロピルトリエトキシシランでコートされ、そして3つの表面型の全てがグルタルアルデヒド重合を経由して酵素を共有結合させている。

10

20

20

30

40

50

## 【0011】

本発明の第3の態様において、前記担体の粒子は本質的に疎水性の表面を有する有機性ポリマー樹脂を含んで成る。その樹脂は吸着樹脂、好ましくはポリアクリレート、ポリメタクリレート（例えばポリメタクリル酸メチル）、ジビニルベンゼンと架橋したポリスチレン、ポリウレタン又はポリプロピレンであることができ、あるいはその樹脂は、イオン交換樹脂、好ましくは陰イオン交換樹脂、例えば弱塩基性陰イオン交換樹脂であることができる。好ましい陰イオン交換樹脂は、Rohm & Haas のフェノール型デュオライト（Duolite）樹脂である。

## 【0012】

更に本担体はデンマーク特許第4429018号-Aに開示された様な、再生したキトサンから製造されうる。

10

## 酵素

本発明に従う固定化されるべき酵素は、自由水を本質的に欠く培体中の使用のために適当なあらゆる酵素であることができる。最も一般的に使用される酵素はリパーゼであり、そして本発明の特定の態様において、前記リパーゼはフミコラ（Humicola）{サーモミセス（Thermomyces）としても知られている}、シュードモナス（Pseudomonas）、カンジダ（Candida）、リゾムコール（Rhizomucor）属の菌株、好ましくはH.ラヌギノサ（H. lanuginosa）{米国特許第4,810,414号及び欧州特許第305216号に記載されているように、引用によって本明細書に組入れるサーモミセス・ラヌギノサ（Thermomyces lanuginosa）としても知られている}、C.アンタルクチカ（C. antarctica）又はR.ミエーイ（R. miehei）の種由来でありうる。

20

## 【0013】

更に前記リパーゼは基質としてのトリグリセリドとの相互作用において、位置的に部位特異的（すなわち1,3特異的）又は非特異的である。前記酵素は更に、本固定化工程の間のグルタルアルdehyド処理によって、共有結合により架橋されうる。

## 酵素を含む液体培体

前記の酵素を含む液体培体は親水性培体、好ましくは水性である。この様に、それは20%以上の水、好ましくは40%以上の水、更に好ましくは50%以上の水、更に好ましくは60%以上の水、更に好ましくは70%以上の水、更に好ましくは80%以上の水、更に好ましくは80%以上の水、更に好ましくは90%以上の水、例えば95%以上の水を含む。それは他の有機性の又は生物学的な物質を含みうる。この様に、それは発酵液又は、例えば限外濾過若しくはタンパク質沈澱、他の水性培体中の分離及び再溶解による発酵液の精製によって得られる酵素の濃縮溶液でありうる。それは更に、水性培体中に溶解した実質的に純粋な酵素でありうる。本発明の特別な態様において、前記の酵素を含む水性の液体は、固定化する前に蒸発の様な水を除去する高価な処理段階にかけられず、または非水性溶媒、例えばアルコールの様な有機溶媒、例えば（ポリ）エチレングリコール及び/又は（ポリ）プロピレングリコールの添加にもかけられなかった。

30

## 固定化方法

親水性表面を有する担体上の酵素の固定化

前記の理論に拘束されること無く、実質的に親水性の表面を有する担体上の酵素の固定化は、その酵素を吸着しないことがなく、しかし前記液体の除去の結果として表面の孔における酵素の析出があり、そして前記酵素が溶解されることが予期される。

40

i. 本発明の1つの態様において、実質的に親水性の表面を有する担体上の酵素の固定化は、この様に標準的な混合装置（例えばLoediger, Germany）内で処理されがあり、ここで酵素を含む液体が、混合の間、例えばポンプ（例えば標準的な蠕動ワトンマーローポンプ）につながった噴霧器を用いて噴霧器によって乾燥した細孔及び特定の担体に導入される。

## 【0014】

前記液体は、前記担体の凝集が実質的に起こらない様な量で加えられ、この様にそれに続く酵素-担体産物の乾燥が標準的な流動床装置、例えばUni-Glatt 流動床装置（Glatt, G

50

ermany) 内で、前記産物の流動化によって可能にされ、それによって揮発性成分が除去されるべきである。

iii. 本発明の第2の態様において、実質的に親水性の表面を有する担体上での酵素の固定化は、標準的な流動床装置、例えばUni-Glatt 流動床装置内で代わりに処理されることがあり、ここで乾燥した細孔及び特定の担体は流動化され、そして環境温度で酵素を含む液体は、例えばポンプ(例えば標準的な蠕動ワトソン・マーローポンプ)に結合した噴霧器を用いて、噴霧によって流動化した担体に導入される。この態様における固定化及び乾燥は同時に行われる。

#### 疎水性表面を有する担体上での固定化

前記の理論に拘束されること無く、実質的に疎水性の表面を有する担体上での酵素の固定化が、前記表面上での酵素の吸着に関係することが予期される。本固定化は、前記表面における部分と前記酵素が形成する水素結合、イオン結合又は共有結合によって可能となる。

iii. 本発明の第3の態様において、実質的に疎水性の表面を有する担体上での酵素の固定化は、この様に標準的な混合装置内で処理されがあり、ここで酵素を含む液体は、ペースト又はスラリーを形成する程度の量において、乾燥した細孔及び特定の担体に導入される。前記ペースト又はスラリーは、前記酵素が吸着する間混合される。吸着の段階に統いて、前記担体より粒度が小さい吸湿性のある特定の物質が前記スラリー又はペーストに導入される。前記物質は過剰な液体の吸着によって、前記酵素・担体の凝集を防ぎ、それによって、続く前記酵素・担体産物の乾燥を、標準的な流動床装置、例えばUni-Glatt 流動床装置(Glatt, Germany)内の前記産物の流動化によって可能にし、それによって揮発性成分及び、必要ならば前記吸湿性物質を除去する。前記吸湿性物質は、過剰な液体を吸収する能力のある、親水性の、粒状の微粉碎された成分部分、例えばシリカ(例えばハイパーフローセライト)、カオリン、アルミナ、ゼオライト又はセラミックである。吸湿性物質の除去は、前記吸湿性物質を通過させるが、前記の酵素・担体を保持する適当な細孔サイズを有するフィルターを流動床の上層に挿入することによって達成される。100~900μm、好ましくは200~400μmの細孔サイズが使用されうる。

iv. 本発明の第4の態様において、実質的に疎水性の表面を有する担体上の酵素の固定化は、標準的な流動床装置、例えばUni-Glatt 流動床装置(Glatt, Germany)内で代わりに処理されがあり、ここで乾燥した細孔及び特定の担体は流動化され、そして環境温度で酵素を含む液体は、例えばポンプ(例えば標準的な蠕動ワトソン・マーローポンプ)に結合した噴霧器を用いて、噴霧によって流動化した担体に導入される。この態様における固定化及び乾燥は同時に行われる。

#### i 及び iii の混合段階のための共通の特徴

混合器内の担体上の酵素の固定化は、環境温度で行われうる。混合時間は、このサイズの装置のために、5~60分、好ましくは10~30分が適當である。

#### i , ii , iii 及び iv の流動床段階のための共通の特徴

流動床装置内の適當な空気吸い込み流は、酵素・担体のサイズ及び密度、担体の量並びに流動床装置に依存するであろう。更に前記空気吸い込み流は、流れが酵素・担体の流動を保つのに十分であるが、酵素・担体を“噴出”しないような強さであるべきの上限を有する。

#### 【0015】

揮発性成分を除去するための吸い込み口の空気の適當な温度は、前記酵素の熱安定性(不活性温度)に主に依存するであろう。その温度は40~90、好ましくは50~70、例えば60でありうる。より高い高い温度は、より短い固定化及び乾燥の時間を提供する。

更に、装置、空気吸い込み流及び空気の温度を固定する場合、酵素・担体の固定化及び/又は乾燥のための時間消費は酵素・担体の量に依存するであろう。前記固定化/乾燥の工程は、空気吸い込み口の温度及び空気吹き出し口の温度を測定することによって監視されうる。前記酵素・担体は湿氣があるが、吹き出し口の温度は、熱吸収及び揮発性成分の蒸

10

20

30

40

50

発のために吸い込み口の温度よりも低い。典型的には、定常状態の蒸発は固定化／乾燥工程の間起り、吹き出し口の温度が、揮発性成分の蒸発（すなわち熱吸収）が一定の速度で起こることを示す、吸い込み口の温度より低い温度に固定されている。固定化／乾燥工程の終了時に、吹き出し口の温度は上昇し始め、そして吸い込み口の温度に近づき、これは、熱吸収が減少し、そしてこのように酵素・担体の湿気がなくなったことを示している。同時の固定化及び乾燥のために流動床を用いるとき、その乾燥工程は、酵素を含む液体が流動床中に噴霧されている間起り、そしてその酵素を含む液体の吸い込みが終了した後に、適当に5～30分間延長されうる。

## 【0016】

本発明の重要な観点は、他のより大きな標準装置を適用することによって、固定化工程を容易に拡大することができる。このように、上記の前記装置を設定する範囲は、より大きな規模の装置を最適化するために調節されうる。10

## 固定化した酵素調製物の使用

本発明の文脈における固定化した酵素調製物は、本質的に自由水を欠く培体内の有機物質の加水分解、合成又は修飾のために使用されうる。前記物質は、食物製品における、例えば植物又は動物油／脂肪を含んで成ることもある。

## 【0017】

従って、本発明は、本質的に自由水を欠く反応培体内で有機化合物を、本発明に従って製造される固定化酵素と接触させることを含んで成る前記有機化合物の酵素的修飾方法を含む。20

本発明の好ましい態様において、固定化したリパーゼ酵素、例えば1,3特異的リパーゼは、本質的に自由水を欠く培体内でのエステル交換反応のために使用される。前記エステル交換反応は第1の反応物及び第2の反応物を、例えば図1～3に示した様な置換反応を起こす、前記の固定化したリパーゼと接触させることを含んで成る、脂肪酸の置換のために使用されうる。

## 【0018】

前記の第1の反応物は脂肪酸エステル、好ましくはトリグリセリド又はトリグリセリドの混合物でありうる。

前記の第2の反応物は、前記の第1の反応物と異なる別の脂肪酸エステル、好ましくはトリグリセリド又はトリグリセリドの混合物でありうる。更に前記の第2の反応物は、アルコール又は遊離脂肪酸でありうる。30

## 【0019】

本発明のこの好ましい態様における前記培体は、有機溶媒を含んで成り、又はそれは本質的にトリグリセリドから成りうる。

本発明の前記使用法は食物製品、例えばマーガリン又はココアバターの代替物の製造において適用されうる。

本発明を、以下の限定しない例によって例示する。

## 例

リパーゼアッセイ：

本脂質分解活性は、基質としてトリグリセリドを用いて決定されうる。この方法は本酵素によるトリグリセリドの加水分解に基づき、そしてそのアルカリ消費が時間の関数として記録される。40

## 【0020】

1リパーゼ単位(LU)は、標準的な条件下(すなわち30.0；pH7.0；乳化剤としてアラビアゴム及び基質としてトリグリセリドを用いる)、1分当たり1mmoleの滴定可能な酪酸を遊離する酵素量として定義される。

より詳細にこの分析方法を記載しているAF95/5のフォルダーはデンマークのNovo Nordiskに請求することで入手可能であり、このフォルダーは引用によって本明細書に組入れられる。

エステル交換アッセイ

10

20

30

40

50

a) 200mgのトリラウリン( Fluka )及び571mgのミリスチン酸( 8 モル当量のミリスチン酸)( Merck )を20mlのヘプタンに溶解した。3mlの飽和NaCl溶液を加え、そしてその混合物を封をした容器内で、環境温度で24時間攪拌した。

b) 前記の固定化酵素( 50mg )を飽和NaCl溶液( 水の活性 = 0.75 )で相平衡にしたガスを用いて、デシケーター( 密封的に閉じた容器 )内で24時間水平衡した。

c) 0分時において、水平衡化した固定化酵素及び基質を封をした容器内で混合し、これを40の振盪槽内に据えた。100μlの試料を、0, 10, 20, 30, 40, 50及び60分時においてシリンジを用いて封をした容器から回収した。前記試料をアセトン/アセトニトリルの50/50(%V/V)混合物を用いて希釈( 1 : 5 体積:体積 )し、そしてHPLCシステムで解析した。

10

#### 【0021】

HPLC系での解析 :

d) 前記HPLC系を5μm( 125 × 4mm )カラム( Merck )を端に取り付けたLiChrosphere 100 RPC18で装備した。50/50(%V/V)のイソクラティックアセトニトリル/アセトン溶液を1ml/分の流速を持つ移動相として選択した。

e) 20μlの試料を注射し、そして形成した産物[ 1, 2 - ジラウロイル - 3 - ミリストイル - グリセロール( 産物 1 )及び 1, 3 - ジミリストイル - 2 - ラウロイル - グリセロール( 産物 2 )]を2気圧及び30の温度での蒸発的な光散乱検出( Sedex 55, Sede re, France )によって測定した。

20

f) 形成した産物の量を、試料の測定値と、1, 2 - ジラウロイル - 3 - ミリストイル - グリセロール及び1, 3 - ジミリストイル - 2 - ラウロイル - グリセロールの外部標準曲線を比較することによって評価した。

#### 【0022】

エステル交換反応工程の割合は、単位量において算出されることがあり、ここで1単位は、1分当たりのトリラウリンに組込まれた1μmoleのミリスチン酸として定義される。あるいは、エステル交換反応工程の効果を、産物1及び産物2へのトリラウリンの変換の%において示すことがあり、これは :

#### 【0023】

#### 【化1】

30

$$\% \text{ 変換}_{T=i} = \left[ \frac{\text{産物 } 1 \text{ のmole} + \text{産物 } 2 \text{ のmole}}{\text{T } = 0 \text{ でのトリラウリンのmole}} \right]_{T=i} \cdot 100\%$$

#### 【0024】

によって算出され、ここで*i*はサンプルがインキュベーション容器( 段階c )から回収される時間を示す。

40

#### 例1

揮発性液体の除去 / 蒸発が同時の、流動床中でのゼオライトを基にした担体上へのリバーゼの吸着

フミコラ・ラヌギノサリバーゼの400gの溶液( 693KLU/ml )を、Uni-Glatt( Glatt, Germany )流動床装置内の二路噴霧器を用いて1kgのゼオライト( Wessalith MS330; 0.5 ~ 0.9mm; Degussa, Germany )上に噴霧した。前記リバーゼ溶液を蠕動ポンプ( ワトソン - マーロー )を経由して適用した。100m³/時の空気流により吸い込み口の空気の温度は60であり、そして本産物の温度は40であった。固定化が終了した後、本産物を、流動床中で更に5分間乾燥した。

#### 【0025】

50

本固定化工程を分子間エステル交換アッセイで試験し、これは24時間後に53%のトリラウリンの変換を計測した。

#### 例2

揮発性液体の除去／蒸発が同時の、流動床中でのシリカを基にした担体上へのリバーゼの吸着

フミコラ・ラヌギノサリバーゼ発酵溶液の94gの溶液(693KLU/ml)を100gの脱鉛化水で希釈し、そして二路噴霧器(自家製)を用いて、Uni-Glatt(Glatt, Germany)流動床装置内の200gのセライトR648(Manville, USA)上に噴霧した。前記リバーゼ溶液を蠕動ポンプ(ワトソン・マーロー)を経由して適用した(流速238g/時)。吸い込み口の空気の温度及び産物の温度は例1に示したものと同一であった。固定化が終了した後、本産物を流動床中で更に5分間乾燥した。10

#### 【0026】

本固定化工程を分子間エステル交換アッセイで試験し、これは24時間後に12%のトリラウリンの変換を計測した。

#### 例3

混合器内での吸着性樹脂上へのリバーゼの吸着及びそれに続く乾燥助剤としてハイパーフローセライト(HFC)を用いる流動床中の乾燥

フミコラ・ラヌギノサリバーゼの94gの溶液(693KLU/ml)を260gの脱鉛化水で希釈した。本溶液を5Lの混合器(Loediger, Germany)内で250gの吸着性の樹脂(巨大多孔性ジビニルベンゼン架橋ポリスチレン、Purolite AP 1090; イギリスのPurolite)に加えた。前記懸濁液を環境温度及び30RPMで20分間混合した。20gのハイパーフローセライト(HFC)を残査溶液に吸収させるために加え、前記混合物がUni-Glatt装置内で流動化するようにした。例1に記載したのと同一の条件を用いて、前記混合物を20分間乾燥した。この終わりに、前記HFCを、樹脂の粒子を維持するために流動床の上層の300μmのフィルターを用いて吸着性の樹脂から分離し、同時にHFCは噴出した。20

#### 【0027】

産物の活性：

0~60分間の本割合は3,9U/g産物と計測された。

#### 例4

揮発性液体の乾燥と同時の、流動床中の吸着性樹脂上へのリバーゼの吸着

フミコラ・ラヌギノサリバーゼ(693KLU/ml)の94gの溶液(693KLU/ml)を200gの脱鉛化水で希釈し、そして二路噴霧器を用いてUni-Glatt(Glatt, Germany)流動床装置内の200gの吸着性樹脂(巨大多孔性ジビニルベンゼン架橋ポリスチレン、Purolite AP 1090; イギリスのPurolite)に噴霧した。前記リバーゼ溶液を蠕動ポンプ(ワトソン・マーロー)を経由して適用した(流速238g/時)。吸い込み口の空気の温度及び産物の温度は、それぞれ50°及び30°であった。固定化が終了した後、本産物を流動床中で更に5分間乾燥した(流速100m³/時)。30

#### 【0028】

本固定化工程を分子間エステル交換アッセイで試験し、これは24時間後に36%のトリラウリンの変換を計測した。40

#### 例5

揮発性液体の乾燥と同時の、流動床中のカオリンを基にした担体上へのリバーゼの吸着

フミコラ・ラヌギノサリバーゼの94gの溶液(693KLU/ml)を300gの脱鉛化水で希釈し、そして二路噴霧器(自家製)を用いて、Uni-Glatt(Glatt, Germany)流動床装置内の、200gのカオリン担体[BIOFIX SC(500~250); イギリスのECC社]上に噴霧した。前記リバーゼ溶液を蠕動ポンプ(ワトソン・マーロー)経由で適用した(流速238g/時)。吸い込み口の空気の温度及び産物の温度は、それぞれ50°及び30°であった。固定化が終了した後、本産物を流動床中で更に5分間乾燥した(流速100m³/時)。50

## 【0029】

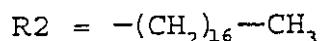
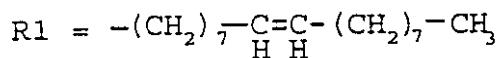
本固定化工程を分子間エステル交換アッセイで試験し、これは24時間後に34%のトリラウリンの変換を計測した。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、第1の反応物(反応物1)が第2の反応物(反応物2)、例えば遊離脂肪酸と反応し、反応において置換基R1及びR2が交換される、リバーゼによって触媒される酸加水分解の例を示す。R1及びR2は、例として：

## 【化2】

10

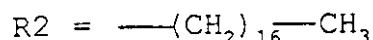
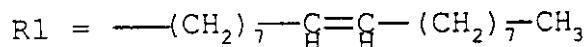


でありうる。

【図2】 図2は、第1の反応物(反応物1)、例えばトリグリセリドが第2の反応物(反応物2)、例えば別のトリグリセリドと反応し、反応において置換基R1及びR2が交換される、リバーゼによって触媒される分子間エステル交換反応の例を示す。R1及びR2は例として：

20

## 【化3】

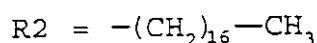
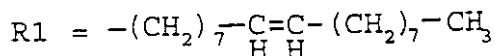


でありうる。

【図3】 図3は、第1の反応物(反応物1)、例えばトリグリセリドが第2の反応物(反応物2)、例えばアルコールと反応し、反応において置換基R1及びR2が交換される、リバーゼによって触媒されるアルコール分解の例を示す。R1及びR2は例として：

30

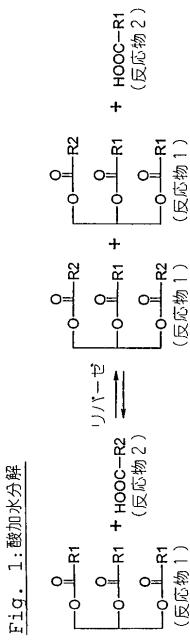
## 【化4】



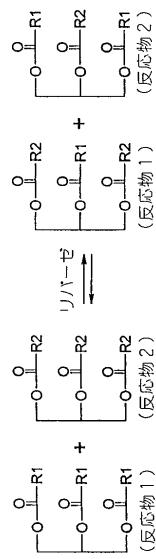
40

でありうる。

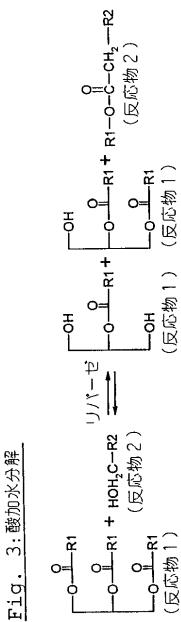
【図1】



【図2】



【図3】



---

フロントページの続き

(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100082898  
弁理士 西山 雅也

(74)代理人 100081330  
弁理士 樋口 外治

(72)発明者 クリストンセン , モルテン ウルツ  
デンマーク国, デーコー - 2800 リュンビュー , リュンバーケン 52

(72)発明者 キルク , オレ  
デンマーク国, デーコー - 2830 ビルム , ビスブ ペデルスバイ 4

(72)発明者 ペデルセン , クリスチャン  
デンマーク国, デーコー - 2610 レドウレ , 3 . テーホー , バルヘイサレ 89

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特表平09-508803 (JP, A)  
特開平09-000257 (JP, A)  
特開平02-138986 (JP, A)  
Biotechnol.Bioeng., Vol.36(1990)p.83-91

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 11/00-11/18

JSTPlus/JST7580(JDreamII)

BIOSIS/WPI(DIALOG)