

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年2月12日(12.02.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/020159 A1

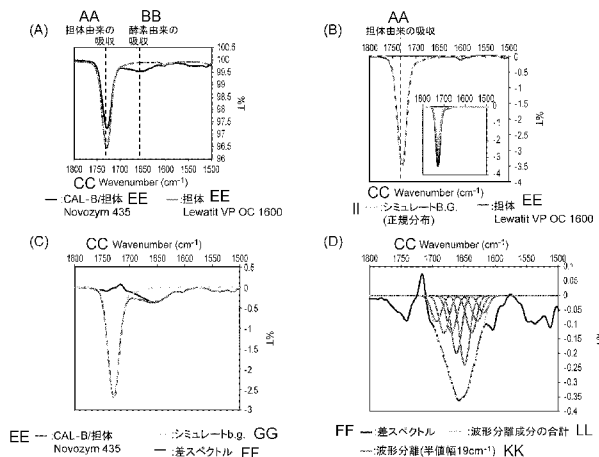
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/35 (2014.01) C12N 11/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/070917
- (22) 国際出願日: 2014年8月7日(07.08.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-166686 2013年8月9日(09.08.2013) JP
特願 2014-053718 2014年3月17日(17.03.2014) JP
- (71) 出願人: 宇部興産株式会社 (UBE INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 鈴木 克生 (SUZUKI Katsuki); 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 宇部興産株式会社内 Yamaguchi (JP). 吉田 洋一 (YOSHIDA Youichi); 〒7558633 山口県宇部市大字小串1978番地の96 宇部興産株式会社内 Yamaguchi (JP).

- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 MY PLAZA (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN, METHOD FOR MANUFACTURING SAME, AND METHOD FOR EVALUATING PROTEIN ACTIVITY

(54) 発明の名称: タンパク質及びその製造方法、並びにタンパク質活性評価方法



AA Carrier-derived absorption
BB Enzyme-derived absorption
CC Wavenumber (cm⁻¹)
EE Carrier
FF Difference spectrum
GG Simulation b.g.
II Simulation B.G. (normal distribution)
KK Waveform separation (half-width 19 cm⁻¹)
LL Sum of waveform separation components

(57) Abstract: The present invention pertains to a method for manufacturing a protein, the method being provided with an inspection process including: a step for approximating, to one or more normal distributions, a protein-derived infrared absorption band that appears, in a protein infrared absorption spectrum, in the vicinity of 1500-1600 cm⁻¹ or 1600-1700 cm⁻¹; a step for calculating an index value indicating the degree of spread of the infrared absorption band on the basis of the normal distribution; and a step for comparing the index value with a threshold value set in advance and selecting, as a non-defective product, a protein for which the degree of spread of the infrared absorption band is less than the threshold value.

(57) 要約: 本発明は、タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、1500~1600 cm⁻¹付近又は1600~1700 cm⁻¹付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンドを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、当該正規分布に基づいて赤外吸収バンドの広がり度合いを示す指標値を算出するステップと、指標値を予め設定された閾値と比較し、閾値よりも赤外吸収バンドの広がり度合いが小さいタンパク質を良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える、タンパク質の製造方法に関する。

WO 2015/020159 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, 添付公開書類:
MR, NE, SN, TD, TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

タンパク質及びその製造方法、並びにタンパク質活性評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質及びその製造方法、並びにタンパク質活性評価方法に関する。本発明はまた、固定化リパーゼ及び再生固定化リパーゼ及びそれらの製造方法、並びにリパーゼ活性評価方法にも関する。本発明は更に、固定化ペルオキシダーゼ及びその製造方法、並びにペルオキシダーゼ活性評価方法にも関する。本発明は更にまた、抗体及びその製造方法、並びに抗体活性評価方法にも関する。

背景技術

[0002] 従来、タンパク質の活性評価は、実際に触媒反応等を行いその活性を測定すること等によるものであった。

[0003] 例えば、脂肪酸等の各種カルボン酸と、モノアルコール及び多価アルコール等のアルコール類とのエステル化反応、複数のカルボン酸エステル間のエステル交換反応等の反応に工業的に幅広く使用されている固定化リパーゼは（例えば、特許文献1を参照）、その調製条件、反応への使用等により触媒活性が充分ではなくなることがあるが、固定化リパーゼの触媒活性の評価は、実際にエステル交換反応等を行い、その活性を測定すること等により行われている。

[0004] 一方、固定化リパーゼのリパーゼの高次構造を解析した例が知られている。例えば、非特許文献1には、円偏光二色性（CD）法、拡散反射フーリエ変換赤外分光（DRIFT）法及びトリプトファン残基蛍光法による固体粒子上に固定化されたリパーゼの構造解析法が記載されている。非特許文献2には、酵素を用いたバイオディーゼル生産における、原料、水分の存在又は不在、及びバイオディーゼルとの接触が、Novozym（登録商標）435の触媒的、酵素的及び物理的な安定性に及ぼす影響について解析したこと

が記載されている。非特許文献3には、固定化されたシュード・モナス (*Pseudomonas cepacia*) 由来のリパーゼの初期活性及び二次構造に対する、有機溶媒による予備処理の影響を解析したことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2011-207975号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：ChemPhysChem, 10巻, p. 1492-1499 (2009年)

非特許文献2：Catalysis Today, 213巻, p. 73-80 (2013年)

非特許文献3：Process Biochemistry, 45巻, p. 1176-1180 (2010年)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 現在、タンパク質は工業的プロセスの触媒として、また医薬としても幅広く利用されている。タンパク質の活性が低下するとプロセス全体の効率の低下、治療効果の低下等につながるため、その活性を評価して十分な活性のあるタンパク質を提供することは極めて重要である。

[0008] また、活性が充分ではないタンパク質には、例えばタンパク質の含水率を調整すること等により、活性を再生することができる場合（本明細書中、「可逆的変性」とも称する。）と、活性を再生することができない場合（本明細書中、「非可逆的変性」とも称する。）とがある。

[0009] 従来のタンパク質の活性の評価は、実際に触媒反応等を行いその活性を測定すること等によるものであった。このような評価方法では、タンパク質の活性が充分ではない場合に、可逆的変性と非可逆的変性のいずれに起因する

か評価することは困難である。

[0010] また、実際に触媒反応等を行うことなく、タンパク質の活性評価を行い得る方法の選択肢は未だ充分ではない。例えば、工業的に利用される固定化リパーゼの場合、非特許文献1～3には、固定化リパーゼのリパーゼの高次構造と触媒活性との関係について記載されている。しかしながら、非特許文献1には、多孔性樹脂担体にリパーゼC a l Bを固定化したN o v o z y m（登録商標）435（n o v o z y m e社製）では、当該多孔性樹脂担体由来の強い吸収が、リパーゼ由来の吸収と隣接するため、赤外吸収スペクトル測定では構造解析は行えないと記載されている。

[0011] また、非特許文献2には、定量的データではないものの、反応への使用によって活性が低下したリパーゼでは、 α -ヘリックスが減少したこと、及び β -シートが増大したことが記載されている。非特許文献3には、有機溶媒で処理することで、 α -ヘリックス、及び β -シートが構造変化したことが記載されているが、非特許文献2とは逆に、構造変化に伴い活性が向上したことが記載されている。

[0012] このように、リパーゼの構造変化と触媒活性との相関について逆の報告がなされているのが現状であり、赤外吸収スペクトル測定から触媒能評価を行い得るか否かは明らかではない。また、非特許文献1～3のいずれにも可逆的変性と非可逆的変性を見分ける技術手段に関し、記載乃至示唆はされていない。

[0013] 本発明はこのような事情に鑑みてなされたものであり、十分な活性を有するタンパク質を得ることができるタンパク質の製造方法及び当該製造方法により得られたタンパク質を提供することを目的とする。本発明はまた、実際に活性測定を行う必要なく、タンパク質の活性を評価することのできるタンパク質活性評価方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、タンパク質の赤外吸収スペクトルにおける特定の波数の赤外吸収バンドを正規分布で近似し、その正規分布に基づいて算出した赤外吸

収バンドの広がり具合を示す指標値が、タンパク質の活性又はタンパク質の潜在的な活性を反映することを見出した。すなわち、当該指標値に基づいてタンパク質を選抜することにより、十分な活性があるタンパク質が得られることを見出した。本発明はこの新規な知見に基づくものである。

[0015] すなわち、本発明は、タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンド（本明細書中、「吸収バンドⅡ」ともいう。）又は $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンド（本明細書中、「吸収バンドⅠ」ともいう。）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さいタンパク質を良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える、上記タンパク質の製造方法に関する。

[0016] 本発明のタンパク質の製造方法によれば、上記検査工程を備えているため、活性のあるタンパク質を製造することができる。また、タンパク質活性の可逆的変性と非可逆的変性を見分けることができるため、活性を再生可能なタンパク質を得ることもできる。

[0017] 上記指標値は、上記赤外吸収バンドを単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅であってもよい。半値幅は上記赤外吸収バンドの広がり具合と相関するため、半値幅を指標値として、活性のあるタンパク質、又は活性を再生可能なタンパク質を選抜することが可能である。

[0018] 上記指標値は、上記赤外吸収バンドを複数の正規分布に波形分離し、上記赤外吸収バンドのピークトップ位置付近の1又は複数の正規分布の面積の総和を、上記赤外吸収バンドの端付近の1又は複数の正規分布の面積の総和で割った値（本明細書中、「吸収バンド面積比」ともいう。）であってもよい。吸収バンド面積比は上記赤外吸収バンドの広がり具合と相関するため、吸収バンド面積比を指標値として、活性のあるタンパク質、又は活性を再

生可能なタンパク質を選抜することが可能である。

- [0019] 吸収バンド面積比は、上記赤外吸収バンドを、いずれも上記赤外吸収バンドのピークトップ位置付近に頂点を有し、かつ、互いに異なる半値幅を有する2つの正規分布に波形分離し、上記2つの正規分布のうち半値幅が小さい方の正規分布の面積を、半値幅が大きい方の正規分布の面積で割った値であってもよい。
- [0020] 吸収バンド面積比は、上記赤外吸収バンドを $A_1 \sim A_n$ の n 個（ n は3以上の整数）の正規分布に波形分離し、上記 n が偶数のとき、 $A_{n/2}$ 及び $A_{n/2+1}$ の少なくとも一方又は両方の面積の総和を $A_1 \sim A_{n/2-1}$ 及び $A_{n/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値であつてもよく、上記 n が奇数のとき、 $A_{(n+1)/2}$ の面積を $A_1 \sim A_{(n+1)/2-1}$ 及び $A_{(n+1)/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値であつてもよい。
- [0021] 上記赤外吸収スペクトルは、減衰全反射法により測定されたものであることが好ましい。これにより、上記指標値によるタンパク質の選抜をより精度よく行うことができる。
- [0022] 本発明はまた、上記タンパク質の製造方法により得られたタンパク質を提供する。本発明のタンパク質は、上記製造方法により得られたものであるため、活性を有する、又は十分な活性を再生可能である。
- [0023] 本発明は、樹脂担体にリパーゼが固定化されてなる固定化リパーゼの製造方法であつて、固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）又は $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅡ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化リパーゼを良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える、製造方法にも関する

。

[0024] 本発明の固定化リパーゼの製造方法によれば、算出した指標値を閾値と比較して、閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり度合いが小さい固定化リパーゼを選抜するステップを有しているため、触媒活性がある、又は触媒活性を再生可能な固定化リパーゼを得ることができる。

[0025] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠを単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅（本明細書中、「指標値1」ともいう。）であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 70 cm^{-1} 以下となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0026] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠを、吸収バンドⅠの面積と、2つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 47 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 82 cm^{-1} ）の2つの正規分布に波形分離し、 A_1 の面積を A_2 の面積で割った値（本明細書中、「指標値2」ともいう。）であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が0.27以上となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0027] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠを、吸収バンドⅠの面積と、3つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1680 cm^{-1} 、半値幅 50 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 50 cm^{-1} ）及び A_3 （ピーク位置 1631 cm^{-1} 、半値幅 50 cm^{-1} ）の3つの正規分布に波形分離し、 A_2 の面積を A_1 及び A_3 の面積の総和で割った値（本明細書中、「指標値3」ともいう。）であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が0.9以上となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0028] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠを、吸収バンドⅠの面積と、5つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1685 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1670 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）、 A_3 （ピーク位置 16

56 cm⁻¹、半値幅30 cm⁻¹)、 A_4 (ピーク位置1641 cm⁻¹、半値幅30 cm⁻¹) 及び A_5 (ピーク位置1626 cm⁻¹、半値幅30 cm⁻¹) の5つの正規分布に波形分離し、 A_3 の面積を A_1 、 A_2 、 A_4 及び A_5 の面積の総和で割った値 (本明細書中、「指標値4」ともいう。) であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が0.35以上となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0029] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠを、吸収バンドⅠの面積と、8つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 (ピーク位置1692 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_2 (ピーク位置1682 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_3 (ピーク位置1670 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_4 (ピーク位置1658 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_5 (ピーク位置1648 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_6 (ピーク位置1638 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_7 (ピーク位置1629 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹) 及び A_8 (ピーク位置1619 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹) の8つの正規分布に波形分離し、 A_4 及び A_5 の面積の総和を A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_6 、 A_7 及び A_8 の面積の総和で割った値 (本明細書中、「指標値5」ともいう。) であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が0.6以上となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0030] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠを、吸収バンドⅠの面積と、8つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 (ピーク位置1692 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_2 (ピーク位置1682 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_3 (ピーク位置1670 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_4 (ピーク位置1658 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_5 (ピーク位置1648 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_6 (ピーク位置1638 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹)、 A_7 (ピーク位置1629 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹) 及び A_8 (ピーク位置1619 cm⁻¹、半値幅19 cm⁻¹) の8つの正規分布に波形分離し、 A_4 及び A_5 の面積の総和を A_2 、 A_3 及び A_8 の面積の総和で割った値 (本明細書中、「指標値6」と

もいう。)であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が1.2以上となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0031] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠⅠを単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅(本明細書中、「指標値7」ともいう。)であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 44 cm^{-1} 以下となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0032] 本発明の固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が、吸収バンドⅠⅠを、吸収バンドⅠⅠの面積と、3つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 B_1 (ピーク位置 1570 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1})、 B_2 (ピーク位置 1545 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1})及び B_3 (ピーク位置 1518 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1})の3つの正規分布に波形分離し、 B_2 の面積を B_1 及び B_3 の面積の総和で割った値(本明細書中、「指標値8」ともいう。)であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が1.2以上となる固定化リパーゼを良品として選抜してもよい。

[0033] 上記固定化リパーゼは、エステル交換活性又はエステル加水分解活性を有するものであってもよい。

[0034] 上記赤外吸収スペクトルは、減衰全反射法により測定されたものであることが好ましい。これにより、上記指標値による固定化リパーゼの選抜をより精度よく行うことができる。

[0035] 上記リパーゼは、バルクホルデリア・セパシア(*Burkholderia cepacia*)又はカンジダ・アンタークティカ(*Candida antarctica*)由来のリパーゼであってもよい。

[0036] 本発明はまた、上記固定化リパーゼの製造方法により得られた固定化リパーゼを提供する。本発明の固定化リパーゼは、上記製造方法により得られたものであるため、触媒活性を有する、又は十分な触媒活性を再生可能である。

[0037] 本発明は、シリカ担体にペルオキシダーゼが固定化されてなる固定化ペルオキシダーゼの製造方法であって、固定化ペルオキシダーゼの赤外吸収スペ

クトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠⅠ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり（度合い）を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり（度合い）が小さい固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える、製造方法にも関する。

[0038] 本発明の固定化ペルオキシダーゼの製造方法によれば、算出した指標値を閾値と比較して、閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり（度合い）が小さい固定化ペルオキシダーゼを選抜するステップを有しているため、触媒活性がある、又は触媒活性を再生可能な固定化リパーゼを得ることができる。

[0039] 本発明の固定化ペルオキシダーゼの製造方法では、上記指標値が指標値7であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 75 cm^{-1} 以下となる固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜してもよい。

[0040] 本発明の固定化ペルオキシダーゼの製造方法では、上記指標値が指標値8であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が0.45以上となる固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜してもよい。

[0041] 上記赤外吸収スペクトルは、減衰全反射法により測定されたものであることが好ましい。これにより、上記指標値による固定化ペルオキシダーゼの選抜をより精度よく行うことができる。

[0042] 本発明はまた、上記固定化ペルオキシダーゼの製造方法により得られた固定化ペルオキシダーゼを提供する。本発明の固定化ペルオキシダーゼは、上記製造方法により得られたものであるため、触媒活性を有する、又は十分な触媒活性を再生可能である。

[0043] 本発明は、抗体の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠⅠ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を

、 1 又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい抗体を良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える、抗体の製造方法にも関する。

[0044] 本発明の抗体の製造方法によれば、算出した指標値を閾値と比較して、閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい抗体を選抜するステップを有しているため、十分な力価のある抗体を得ることができる。

[0045] 本発明の抗体の製造方法では、上記指標値が指標値 1 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 65 cm^{-1} 以下となる抗体を良品として選抜してもよい。

[0046] 本発明の抗体の製造方法では、上記指標値が指標値 6 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 0.98 以上となる抗体を良品として選抜してもよい。

[0047] 本発明の抗体の製造方法では、上記指標値が指標値 8 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 0.85 以上となる抗体を良品として選抜してもよい。

[0048] 上記赤外吸収スペクトルは、減衰全反射法により測定されたものであることが好ましい。これにより、上記指標値による抗体の選抜をより精度よく行うことができる。

[0049] 本発明はまた、上記抗体の製造方法により得られた抗体を提供する。本発明の抗体は、上記製造方法により得られたものであるため、十分な力価を有する。

[0050] 本発明はまた、リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼから、リパーゼ活性の一部又は全部が再生された再生固定化リパーゼを製造する製造方法であって、固定化リパーゼは、樹脂担体にリパーゼが固定化されたものであり、上記リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンド（

吸収バンド I 1) 又は $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンド I）を、1 又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり（度合い）を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり（度合い）が小さい上記リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜するステップと、を含む選抜工程を備える、再生固定化リパーゼの製造方法にも関する。

[0051] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法によれば、算出した指標値を閾値と比較して、閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり（度合い）が小さい固定化リパーゼを選抜するステップを有しているため、リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼの中でも可逆的変性であるものを選抜することができる。すなわち、十分な触媒活性を再生可能な固定化リパーゼを得ることができる。

[0052] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値 1 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 70 cm^{-1} 以下となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0053] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値 2 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 0.27 以上となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0054] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値 3 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 0.9 以上となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0055] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値 4 であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 0.35 以上となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

い。

[0056] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値5であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が0.6以上となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0057] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値6であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が1.2以上となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0058] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値7であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が 44 cm^{-1} 以下となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0059] 本発明の再生固定化リパーゼの製造方法では、上記指標値が指標値8であり、上記選抜するステップにおいて、上記指標値が1.2以上となる固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜してもよい。

[0060] 上記再生固定化リパーゼの製造方法は、上記選抜工程で選抜された固定化リパーゼを水又は含水有機溶媒にて処理する再生工程を備えていてもよい。上記選抜工程で選抜された固定化リパーゼは、上記再生工程を経ることによって、リパーゼ活性を再生できる。

[0061] 上記固定化リパーゼは、エステル交換活性又はエステル加水分解活性を有するものであってもよい。

[0062] 上記赤外吸収スペクトルは、減衰全反射法により測定されたものであることが好ましい。これにより、上記指標値による固定化リパーゼの選抜をより精度よく行うことができる。

[0063] 上記リパーゼは、バルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) 又はカンジダ・アンタークティカ (*Candida*

ant arctica) 由来のリパーゼであってもよい。

[0064] 本発明はまた、上記再生固定化リパーゼの製造方法により得られた再生固定化リパーゼを提供する。本発明の再生固定化リパーゼは、上記製造方法により得られたものであるため、十分な触媒活性を有する、又は十分な触媒活性を再生可能である。

[0065] 本発明は、タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅡ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さいタンパク質を活性のあるタンパク質と評価するステップと、を含む評価工程を備える、タンパク質活性評価方法ということもできる。

[0066] 本発明はまた、樹脂担体にリパーゼが固定化されてなる固定化リパーゼのリパーゼ活性評価方法であって、固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅡ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化リパーゼを、リパーゼ活性のある固定化リパーゼと評価する、又はリパーゼ活性の一部若しくは全部を再生できる可能性のある固定化リパーゼと評価するステップと、を含む評価工程を備える、リパーゼ活性評価方法ということもできる。

[0067] 本発明は更に、シリカ担体にペルオキシダーゼが固定化されてなる固定化ペルオキシダーゼのペルオキシダーゼ活性評価方法であって、固定化ペルオ

キシダーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅡ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化ペルオキシダーゼを、ペルオキシダーゼ活性のある固定化ペルオキシダーゼと評価するステップと、を含む評価工程を備える、ペルオキシダーゼ活性評価方法ということもできる。

[0068] 本発明は更にまた、抗体の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅡ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい抗体を活性のある抗体と評価するステップと、を含む評価工程を備える、抗体活性評価方法ということもできる。

[0069] 本発明は、本発明の固定化リパーゼ、又は再生固定化リパーゼを用いた、リパーゼによる触媒反応を経て製造される化合物の製造方法にも関する。上記固定化リパーゼ、又は再生固定化リパーゼは、十分な触媒活性を有するか、又は十分な触媒活性を再生可能であるため、当該化合物の製造効率が向上する。

[0070] 上記化合物は、エステル交換反応又はエステル加水分解反応を経て製造されるものであってもよい。また、上記化合物は、ポリカーボネートジオール（メタ）アクリレート化合物であってもよい。

発明の効果

- [0071] 本発明によれば、十分な活性を有するタンパク質を得ることができるタンパク質の製造方法及び当該製造方法により得られたタンパク質を提供できる。また、本発明によれば、実際に活性測定を行う必要なく、タンパク質の活性を評価することのできるタンパク質活性評価方法を提供できる。
- [0072] 本発明によれば、触媒活性の可逆的変性と非可逆的変性を見分けることができ、十分な触媒活性を有する固定化リパーゼを得ることができる固定化リパーゼの製造方法及び当該製造方法により得られた固定化リパーゼを提供できる。
- [0073] また、本発明によれば、触媒活性の可逆的変性と非可逆的変性を見分けることができ、十分な触媒活性を有する再生固定化リパーゼを得ることができる再生固定化リパーゼの製造方法及び当該製造方法により得られた再生固定化リパーゼを提供できる。
- [0074] さらに、本発明によれば、実際に活性測定を行う必要なく、リパーゼ活性のある固定化リパーゼ、又はリパーゼ活性の一部若しくは全部を再生できる可能性のある固定化リパーゼを見分けることのできるリパーゼ活性評価方法を提供できる。
- [0075] 本発明の固定化リパーゼ、又は再生固定化リパーゼは、十分な触媒活性を有する、又は十分な触媒活性を再生可能であるため、リパーゼによる触媒反応を経て製造される化合物の製造用途に好適に用いられる。
- [0076] 本発明によれば、触媒活性の可逆的変性と非可逆的変性を見分けることができ、十分な触媒活性を有する固定化ペルオキシダーゼを得ることができる固定化ペルオキシダーゼの製造方法及び当該製造方法により得られた固定化ペルオキシダーゼを提供できる。
- [0077] 本発明によれば、実際に活性測定を行う必要なく、ペルオキシダーゼ活性のある固定化ペルオキシダーゼ、又はペルオキシダーゼ活性の一部若しくは全部を再生できる可能性のある固定化ペルオキシダーゼを見分けることのできるペルオキシダーゼ活性評価方法を提供できる。
- [0078] 本発明によれば、十分な力価を有する抗体を得ることができる抗体の製造

方法及び当該製造方法により得られた抗体を提供できる。

[0079] 本発明によれば、実際に活性測定を行う必要なく、抗体の力価を評価することのできる抗体活性評価方法を提供できる。

図面の簡単な説明

[0080] [図1]吸収バンド面積比の算出方法を説明するための説明図である。

[図2]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を単一の正規分布で近似した例を示す図である。

[図3]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を2つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図4]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を3つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図5]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を8つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図6]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を8つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図7]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を8つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図8]リパーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を8つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図9]指標値1（半値幅）とリパーゼのエステル交換反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図10]指標値1（半値幅）と指標値7（半値幅）との相関を示すグラフである。

[図11]指標値1（半値幅）とリパーゼのエステル交換反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図12]指標値2（吸収バンド面積比）とリパーゼのエステル交換反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図13]指標値3（吸収バンド面積比）とリパーゼのエステル交換反応の比活

性との相関を示すグラフである。

[図14]指標値 4（吸収バンド面積比）とリパーゼのエステル交換反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図15]指標値 5（吸収バンド面積比）とリパーゼのエステル交換反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図16]指標値 6（吸収バンド面積比）とリパーゼのエステル交換反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図17]ペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンド I I）を単一の正規分布で近似した例を示す図である。

[図18]ペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンド（吸収バンド I I）を3つの正規分布に波形分離した例を示す図である。

[図19]指標値 7（半値幅）とペルオキシダーゼの酸化反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図20]指標値 8（吸収バンド面積比）とペルオキシダーゼの酸化反応の比活性との相関を示すグラフである。

[図21]抗体由来の赤外吸収バンド（吸収バンド I 及び吸収バンド I I）を単一の正規分布で近似した例を示す図である。

[図22]抗体由来の赤外吸収バンドを8つの正規分布に波形分離した例（吸収バンド I）及び3つの正規分布に波形分離した例（吸収バンド I I）を示す図である。

[図23]各種処理を施した抗体の力価を測定した結果を示すグラフである。

[図24]指標値 1（半値幅）と抗体の力価との相関を示すグラフである。

[図25]指標値 6（吸収バンド面積比）及び指標値 8（吸収バンド面積比）と抗体の力価との相関を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0081] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0082] [タンパク質の製造方法]

本実施形態に係るタンパク質の製造方法は、少なくとも検査工程を備えるものである。当該検査工程は、タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠⅠ）又は $1600\sim1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンド（吸収バンドⅠ）を、1又は複数の正規分布に近似するステップと、当該正規分布に基づいて赤外吸収バンドの広がり（度合い）を示す指標値を算出するステップと、指標値を予め設定された閾値と比較し、閾値よりも赤外吸収バンドの広がり（度合い）が小さいタンパク質を良品として選抜するステップと、を含む。

[0083] 本実施形態に係るタンパク質の製造方法により製造されるタンパク質に、特に制限はなく、任意のタンパク質であってよい。一方、本実施形態に係るタンパク質の製造方法によれば、検査工程において活性のあるタンパク質、又は活性を再生可能なタンパク質を選抜することができるため、製造されるタンパク質としては、機能性タンパク質であることが好ましい。ここで、機能性タンパク質とは、変性等を受けていない場合に活性を有するタンパク質を意味する。また、本明細書において、「活性」とは、触媒活性、受容体等との結合活性、抗体の力価等を含む。

[0084] 活性のあるタンパク質として、例えば、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ等の触媒活性のあるタンパク質である酵素、インターフェロン、エリスロポエチン、インスリン等の医薬品としても用いられる受容体との結合活性のあるタンパク質、並びに抗体を挙げることができる。

[0085] 製造されるタンパク質は、担体に担持されたタンパク質であってもよい。なお、本明細書において「担体」とは、タンパク質を吸着等により保持することができる樹脂担体（例えば、イオン交換樹脂）及び無機担体（例えば、シリカ担体）、タンパク質と混合される増量剤、並びにタンパク質溶液における溶媒及び溶質等を含む。

[0086] 本実施形態に係る指標値は、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠの広がり（度合い）を示す。図1は、指標値（ここでは、吸収バンド面積比）の算出方法

を説明するための説明図である。以下、図1を参照しながら指標値の算出方法を説明する。なお、以下の算出方法はあくまで一例であり、種々の変形が可能である。

[0087] まず、タンパク質の赤外吸収スペクトルを測定する。ここで、タンパク質が担体に担持されたタンパク質である場合は、担体自体についても赤外吸収スペクトルを測定する。担体自体の赤外吸収スペクトルは、予め測定しておいてもよい。赤外吸収スペクトルの測定法は、透過法、拡散反射法、減衰全反射法（ATR法）が好ましく、微量タンパク質に由来する吸収スペクトルを高感度で測定するという観点から、ATR法がより好ましい。

[0088] 図1（A）は、担体に担持されたタンパク質として固定化リパーゼ（Lewatit（登録商標）VP OC 1600にCalBが担持されたNovozym（登録商標）435）を用いた場合の赤外吸収スペクトル、及び樹脂担体（Lewatit（登録商標）VP OC 1600）自体の赤外吸収スペクトルを示す。両者の差スペクトルは、タンパク質（リパーゼ）由来の赤外吸収スペクトルとなる。ただし、個別に測定した赤外吸収スペクトルの差分算出には、吸収強度を規定する必要がある場合がある。

[0089] 次に、担体由来の赤外吸収スペクトルをシミュレートする。すなわち、担体由来の赤外吸収スペクトルを正規分布で近似し、個別に測定した担体に担持されたタンパク質の赤外吸収スペクトルのバックグラウンドスペクトルとして使用できるようにする。具体的には、強度を変化させることで個別に測定した担体に担持されたタンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、担体由来の赤外吸収スペクトルにフィットさせる。図1（B）は、担体由来の赤外吸収スペクトルのシミュレートの一例を示す。

[0090] 次に、担体に担持されたタンパク質の赤外吸収スペクトルと、担体由来の赤外吸収スペクトル（シミュレート）から、差スペクトルを算出し、担体に担持されたタンパク質中のタンパク質に由来する赤外吸収スペクトルを抽出する。図1（C）は、差スペクトルの算出の一例を示す。

[0091] 差スペクトルの算出は、例えば、ガウス関数を用い、表計算ソフト（例え

ば、Microsoft Excel ; Microsoft 社製) にて行うことができる。

[0092] 次に、差スペクトルを用い、吸収バンド I 又は II を、1 又は複数の正規分布で近似する。

[0093] 差スペクトルの単一の正規分布での近似は、例えば、非線形最小二乗法により行うことができる。非線形最小二乗法は、表計算ソフト (例えば、Microsoft Excel ; Microsoft 社製) の Solver 機能を利用して、例えば、ピーク位置、半値幅及び強度を変数として行うことができる。

[0094] 単一の正規分布で近似した場合の指標値は、例えば、該正規分布の半値幅 (単位: cm^{-1}) とすることができる。この場合、指標値 (半値幅) が小さくなるほど、赤外吸収バンドの広がり具合は小さくなる。

[0095] 差スペクトルの複数の正規分布での近似は、例えば、複数の正規分布に波形分離することにより行うことができる。波形分離は、例えば、ガウス関数を用い、表計算ソフト (例えば、Microsoft Excel ; Microsoft 社製) にて行うことができる。具体的には、例えば、 $A_1 \sim A_n$ の n 個の正規分布に波形分離する場合、Solver 機能を利用し、 $A_1 \sim A_n$ の波数のバンド位置及び半値幅の初期値を指定し、非線形最小二乗法によって、 $A_1 \sim A_n$ の面積の総和と、差スペクトルの吸収バンドの面積との残差二乗和が最小になるように計算することで波形分離を行うことができる。 $A_1 \sim A_n$ の波数のバンド位置は、等間隔で指定してもよいし、異なる間隔で指定してもよい。また、 $A_1 \sim A_n$ のうち少なくとも 2 つに同一の波数のバンド位置を指定してもよい。

[0096] 波形分離する正規分布の個数 (すなわち、 n の値) は特に制限がなく、目的に応じて適宜設定してよい。タンパク質を良品として選抜する精度がより一層向上するため、 n は 2 ~ 20 であることが好ましく、2、3、5 又は 8 であることがより好ましい。

[0097] 例えば図 1 では、差スペクトルを用い、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に

現れるタンパク質（リパーゼ）由来の赤外吸収バンドを、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 、 A_6 、 A_7 及び A_8 （まとめて $A_1 \sim A_8$ とも記載する）の8つの正規分布に波形分離している。 $A_1 \sim A_8$ は、ピーク位置が約 10 cm^{-1} 間隔で隣り合う、半値幅が約 19 cm^{-1} の8つの正規分布である。また、 $A_1 \sim A_8$ の面積の総和（波形分離成分の合計）が、差スペクトルの吸収バンドの面積となるべく等しくなるように波形分離する。図1（D）は、波形分離の一例を示す。

[0098] なお、図1における、 $A_1 \sim A_8$ は、フィッティングに用いるガウス関数の初期値として、波数のバンド位置を 1692 cm^{-1} （ A_1 ）、 1682 cm^{-1} （ A_2 ）、 1670 cm^{-1} （ A_3 ）、 1658 cm^{-1} （ A_4 ）、 1648 cm^{-1} （ A_5 ）、 1638 cm^{-1} （ A_6 ）、 1629 cm^{-1} （ A_7 ）及び 1619 cm^{-1} （ A_8 ）の8点とし、またそれぞれの半値幅を 19 cm^{-1} としたものである。

[0099] 赤外吸収バンドを2つの正規分布に波形分離した場合の指標値は、例えば、赤外吸収バンドを、いずれも赤外吸収バンドのピークトップ位置付近に頂点を有し、かつ、互いに異なる半値幅を有する2つの正規分布に波形分離し、2つの正規分布のうち半値幅が小さい方の正規分布の面積を、半値幅が大きい方の正規分布の面積で割った値とすることができる。2つの正規分布の波数のバンド位置は、互いに同一であってもよい。この場合、指標値が大きくなるほど、赤外吸収バンドの広がり具合は小さくなる。

[0100] 複数（3以上）の正規分布で近似した場合の指標値は、例えば、赤外吸収バンドのピークトップ位置付近の1又は複数の正規分布の面積の総和を、赤外吸収バンドの端付近の1又は複数の正規分布の面積の総和で割った値（吸収バンド面積比）とすることができる。この場合、指標値が大きくなるほど、赤外吸収バンドの広がり具合は小さくなる。

[0101] 赤外吸収バンドを $A_1 \sim A_n$ の n 個（ n は3以上の整数）の正規分布に波形分離した場合、例えば、以下のようにして指標値を算出することができる。

（i） n が偶数のとき、 $A_{n/2}$ 及び $A_{n/2+1}$ の少なくとも一方又は両方の面積

の総和を $A_1 \sim A_{n/2-1}$ 及び $A_{n/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値を指標値とする。

(i i) n が奇数のとき、 $A_{(n+1)/2}$ の面積を $A_1 \sim A_{(n+1)/2-1}$ 及び $A_{(n-1)/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値を指標値とする。

[0102] 例えば、 n が 3 の場合、指標値は $A_2 / (A_1 + A_3)$ とすることができる。

また、例えば、 n が 5 の場合、指標値は $A_3 / (A_1 + A_2 + A_3 + A_4)$ としてもよいし、 $A_3 / (A_1 + A_4)$ としてもよいし、 $A_3 / (A_1 + A_3 + A_4)$ としてもよいし、 $A_3 / (A_1 + A_2 + A_4)$ としてもよい。また、 n が 5 以上の奇数の場合、上記 (i i) で算出される指標値は、例えば、 $A_{(n+1)/2-1} \sim A_{(n-1)/2+2}$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和を $A_1 \sim A_{(n+1)/2-2}$ 及び $A_{(n-1)/2+3} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値であってもよい。

[0103] 例えば、 n が 8 の場合、指標値は $(A_4 + A_5) / (A_2 + A_3 + A_8)$ としてもよいし、 $(A_4 + A_5) / (A_1 + A_2 + A_3 + A_6 + A_7 + A_8)$ としてもよい。また、 n が 6 以上の偶数の場合、上記 (i) で算出される指標値は、例えば、 $A_{n/2-1} \sim A_{n/2+2}$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和を $A_1 \sim A_{n/2-2}$ 及び $A_{n/2+3} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値であってもよい。

[0104] タンパク質を良品であるか否かを選抜するための閾値は、製造するタンパク質の種類、製造するタンパク質に求められる活性のレベル等に応じて適宜設定してよい。上記のようにして算出した指標値は、タンパク質の活性、又はタンパク質の潜在的な活性と線形近似可能な相関関係を有しているため、製造するタンパク質に求められる活性のレベルに応じて閾値を設定することができる。また、閾値を決定するため、製造するタンパク質について、予め指標値と活性の相関を解析しておくことが好ましい。

[0105] 閾値の例を説明する。図 1 に例示した固定化リパーゼの場合、指標値が $(A_4 + A_5) / (A_2 + A_3 + A_8)$ のときは、指標値（吸収バンド面積比）が 1

． 2（閾値）以上である固定化リパーゼは、リパーゼ活性のある固定化リパーゼと評価することができるか、又はリパーゼ活性の一部若しくは全部を再生できる可能性のある固定化リパーゼと評価することができる。閾値は 1．3 としてもよく、1．4 としてもよく、1．5 としてもよい。当該指標値は、通常大きくても 5．0 程度である。

[0106] 以上説明した指標値の算出方法は、タンパク質の種類に依存しない。すなわち、タンパク質が、例えば、リパーゼ、ペルオキシダーゼ及び抗体等の場合であっても、同様にして指標値を算出することができる。

[0107] 本実施形態に係るタンパク質の製造方法は、上述した検査工程に加えて、タンパク質を合成する工程を備えていてもよい。タンパク質の合成は、公知の手法を用いることができる。例えば、当該タンパク質をコードする DNA を発現可能に組み換えた酵母、糸状菌、動物細胞、動物等を培養又は飼育することによりタンパク質を発現させ、細胞破砕物、培地、動物の乳等から発現したタンパク質を回収（精製）することでタンパク質を合成することができる。

[0108] 本実施形態に係るタンパク質の製造方法により得られたタンパク質は、上述した検査工程を経ているため、十分な活性を有する、又は十分な活性を再生可能であり、工業的用途、医薬用途等に好適に使用できる。

[0109] 〔タンパク質活性評価方法〕

本実施形態に係るタンパク質活性評価方法は、タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、当該正規分布に基づいて赤外吸収バンドの広がり（度合い）を示す指標値を算出するステップと、当該指標値を予め設定された閾値と比較し、閾値よりも赤外吸収バンドの広がり（度合い）が小さいタンパク質を活性のあるタンパク質と評価するステップと、を含む評価工程を備える。

[0110] 本実施形態に係るタンパク質活性評価方法における指標値及び閾値については、上記固定化リパーゼの製造方法で説明したものと同様のものが例示で

きる。

[0111] 〔固定化リパーゼの製造方法〕

本明細書において、固定化リパーゼとは、樹脂担体にリパーゼを吸着等により担持させたものをいう。

[0112] リパーゼは、エステル結合の加水分解反応を触媒する酵素であればよい。

また、エステル合成反応も触媒する酵素であることが好ましい。具体的には、例えば、クリプトコッカス・エスピー (*Cryptococcus sp*) 由来のクチナーゼ、バルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) 由来のリパーゼ (例えば、Amano PS (アmanoエンザイム社製))、カンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*) 由来のリパーゼ (例えば、Novozym 435 (ノボザイム社製))、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor Miehei*) 由来のリパーゼ、サーモマイセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) 由来のリパーゼ (例えば、Lipase TL (名糖産業社製))、ムコール・ミエヘイ (*Mucor Miehei*) 由来のリパーゼが挙げられる。これらの中でも、バルクホルデリア・セパシア由来のリパーゼ、カンジダ・アンタークティカ由来のリパーゼが好ましい。

[0113] 上述したリパーゼは、上記微生物からリパーゼをコードする遺伝子を得て、酵母又は糸状菌等の適切な宿主を形質転換し、得られた遺伝子組換え体の培養物から得たものであってもよい。リパーゼの組換え発現のために使用される組換えDNA技術は、当該技術分野において公知である。

[0114] リパーゼは、上記微生物由来のリパーゼの変異体であってもよい。例えば、上記微生物由来のリパーゼのアミノ酸配列中、1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加され、かつ少なくともエステル結合の加水分解活性を有するリパーゼであってもよい。また、上記微生物由来のリパーゼに対しアミノ酸配列が90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の配列同一性を示し、かつ少なくともエステル結合の加水分解活性を有する

リパーゼであってもよい。

[0115] 樹脂担体は、大きな表面積を有することによりリパーゼの吸着量を高くできるという観点から、多孔質である多孔性樹脂担体であることが好ましい。樹脂担体としては、イオン交換樹脂、疎水吸着樹脂、キレート樹脂、合成吸着樹脂等の有機高分子等が挙げられる。これらの中でも、特に酵素の吸着力が高いという観点から、疎水性吸着樹脂が好ましい。

[0116] 樹脂担体としては、酵素の固定化に汎用されている樹脂担体を用いることができる。具体的には、例えば、ポリスチレン、ポリアクリル酸エステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリアミド等を挙げることができる。これらは共重合体であってもよく、架橋されていてもよい。中でも、ポリスチレン-共重合体、ポリ-（メタ）アクリル酸エステル、（例えばジビニルベンゼンで架橋されたポリメチルメタアクリレート）であることが好ましい。これらの樹脂担体は、マクロポーラスであり、典型的には最頻度細孔径約5～20nmを有し、かつ全表面積50～1000m²/g（窒素吸着法による）を有する。

[0117] 疎水性吸着樹脂は、市販されているものを使用してもよい。具体的には、例えば、レワチット（Lewatit（登録商標））VP OC 1600（ランクセス社製、ドイツ）、アンバーライト（Amberlite（登録商標））XAD-7HP（オルガノ社製、日本）、ダイヤイオンHP20（三菱化学製、日本）が挙げられる。

[0118] 樹脂担体へのリパーゼの固定化は、例えば、共有結合、イオン結合、物理的吸着等による担体結合法、網目構造を有する樹脂の格子にリパーゼを固定化する包括法等により行うことができる。中でも物理的吸着による担体結合法が簡便であるため好ましい。

[0119] 物理的吸着による固定化は、例えば、リパーゼの水性溶液を樹脂担体に接触させることにより行うことができる。また、リパーゼが樹脂担体に吸着し形成された固定化リパーゼを水相から分離し、次いで分離した固定化リパーゼを洗浄し、更に適切な含水率まで乾燥することを含んでもよい。

- [0120] 物理的吸着により固定化する際の温度及びpHは、固定化するリパーゼの種類等に応じて適宜設定すればよい。多くのリパーゼでは、例えば、室温及び中性に近いpHで固定化することができる。樹脂担体とリパーゼの接触時間は、通常本質的に完全な吸着に対して必要とされるような時間が選ばれる。これは典型的には1～2時間から24時間である。
- [0121] 固定化リパーゼを固定床カラム中での連続的エステル交換に用いる場合、固定化リパーゼは、球状でありかつ均一な粒子径であることが好ましい。当該粒子径は、100～5000 μm であることが好ましく、300～1000 μm であることがより好ましい。
- [0122] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法は、固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、当該正規分布に基づいて赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、指標値を予め設定された閾値と比較し、閾値よりも赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化リパーゼを良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える。
- [0123] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値1とした場合、指標値が70 cm^{-1} （閾値）以下となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、65 cm^{-1} であることがより好ましい。当該指標値は、通常小さくても55 cm^{-1} 程度である。
- [0124] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値2とした場合、指標値が0.27（閾値）以上となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、0.49であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても1.00程度である。
- [0125] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値3とした場合、指標値が0.9（閾値）以上となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、1.5であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても1.9程度である。
- [0126] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値

4とした場合、指標値が0.35（閾値）以上となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、0.40であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても0.49程度である。

[0127] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値5とした場合、指標値が0.6（閾値）以上となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、0.65であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても0.70程度である。

[0128] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値6とした場合、指標値が1.2（閾値）以上となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、1.3であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても1.4程度である。

[0129] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値7とした場合、指標値が 44 cm^{-1} （閾値）以下となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、 40 cm^{-1} であることがより好ましい。当該指標値は、通常小さくても 35 cm^{-1} 程度である。

[0130] 本実施形態に係る固定化リパーゼの製造方法において、指標値を、指標値8とした場合、指標値が1.2（閾値）以上となる固定化リパーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、1.5であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても1.7程度である。

[0131] 上記固定化リパーゼの製造方法は、常法に従ってリパーゼを樹脂担体に担持させた固定化リパーゼを得る工程を含んでいてもよい。当該工程により得られる固定化リパーゼの中には、不可逆的変性又は可逆的変性により触媒活性の低いものも含まれ得るが、上記検査工程を経ることによって、不可逆的変性と可逆的変性とを見分けることが可能となる。

[0132] 可逆的変性の場合、見かけ上触媒活性が低いものであるが、例えば、含水率を調整すること等により、触媒活性を再生することができる。

[0133] 〔再生固定化リパーゼの製造方法〕

本実施形態に係る再生固定化リパーゼの製造方法は、リパーゼ活性が減少

した固定化リパーゼから、リパーゼ活性の一部又は全部が再生された再生固定化リパーゼを製造するものである。当該製造方法は、リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい上記リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選抜するステップと、を含む選抜工程を備えるものである。

[0134] 本実施形態に係る再生固定化リパーゼの製造方法における指標値及び閾値については、上記固定化リパーゼの製造方法で説明したものと同様のものが例示できる。

[0135] 選抜工程では、指標値を指標としているため、リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼの中でも可逆的変性であるものを選抜することができる。したがって、選抜工程で選抜した固定化リパーゼは、含水率を調整すること等により、触媒活性を再生することができる。

[0136] 上記再生固定化リパーゼの製造方法は、選抜工程で選抜されたリパーゼ活性が減少した固定化リパーゼを水又は含水有機溶媒にて処理する再生工程を含んでいてもよい。再生工程を経ることにより、固定化リパーゼを適切な含水率に調整することができ、リパーゼ活性が再生する。なお、リパーゼ活性を再生できるのは、選抜工程で閾値よりも赤外吸収バンドの広がり具合が小さいものを選抜しているからである。

[0137] 水としては、超純水、蒸留水、イオン交換水、水道水、工業用水等を用いることができる。中でも、無機塩混入回避の観点から、イオン交換水、蒸留水を用いることが好ましい。含水有機溶媒としては、アセトン、エタノール、アセトニトリル、1-ブタノール等の有機溶媒に上述の水を含ませたものを用いることができる。含水有機溶媒の含水率は有機溶媒の種類により異なるが、例えば、有機溶媒としてアセトンを用いる場合、1.0%以上とする

ことができる。

[0138] 再生工程は、例えば、選抜工程で選抜された固定化リパーゼを水又は含水有機溶媒に接触させることにより行うことができる。当該接触は、例えば、温度 $-10\sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲内で、 $0.5\sim 48$ 時間の範囲内で、固定化リパーゼの含水率を指標として適宜設定して行うことができる。指標となる固定化リパーゼの含水率は、リパーゼの種類及び固定化量、樹脂担体の種類等によって異なるが、例えば、固定化リパーゼが $3.4\text{ wt\%}$ Amano P S / Lewatit の場合、含水率 5% 以上であり、Novozym（登録商標）435の場合、含水率 0.05% 以上である。

[0139] 〔固定化リパーゼのリパーゼ活性評価方法〕

本実施形態に係る固定化リパーゼのリパーゼ活性評価方法は、固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化リパーゼを、リパーゼ活性のある固定化リパーゼと評価する、又はリパーゼ活性の一部若しくは全部を再生できる可能性のある固定化リパーゼと評価するステップと、を含む評価工程を備える。

[0140] 本実施形態に係る固定化リパーゼのリパーゼ活性評価方法における指標値及び閾値については、上記固定化リパーゼの製造方法で説明したものと同様のものが例示できる。

[0141] 〔化合物の製造方法〕

本実施形態に係る化合物の製造方法は、上記固定化リパーゼの製造方法により得られた固定化リパーゼ、又は上記再生固定化リパーゼの製造方法により得られた再生固定化リパーゼを用いることを特徴とする。当該化合物は、リパーゼによる触媒反応を経て製造される化合物である。

[0142] 上記化合物としては、エステル交換反応又はエステル加水分解反応を経て製造されるものであることが好ましく、例えば、油脂類とアルコールのエス

テル交換反応による燃料ディーゼル燃料、ポリカーボネートジオール（メタ）アクリレート化合物が挙げられる。これらの化合物の中でもポリカーボネートジオール（メタ）アクリレート化合物がより好ましい。

[0143] 〔固定化ペルオキシダーゼの製造方法〕

本明細書において、固定化ペルオキシダーゼとは、シリカ担体にペルオキシダーゼを吸着等により担持させたものをいう。

[0144] ペルオキシダーゼは、ペルオキシド（ $-O-O-$ ）を酸化的に切断して2つのヒドロキシル基に分解する反応を触媒する酵素であればよい。具体的には、例えば、西洋わさび（*Horseradish peroxidase*）由来のペルオキシダーゼ（例えば、HRP（和光純薬社製））、シトクロムcペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼが挙げられる。これらの中でも、西洋わさび由来のペルオキシダーゼが好ましい。

[0145] 上述したペルオキシダーゼは、ペルオキシダーゼをコードする遺伝子を得て、酵母又は糸状菌等の適切な宿主を形質転換し、得られた遺伝子組換え体の培養物から得たものであってもよい。ペルオキシダーゼの組換え発現のために使用される組換えDNA技術は、当該技術分野において公知である。

[0146] ペルオキシダーゼは、上記ペルオキシダーゼの変異体であってもよい。例えば、上記ペルオキシダーゼのアミノ酸配列中、1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加され、かつ少なくともペルオキシドを酸化的に切断して2つのヒドロキシル基に分解する活性を有するペルオキシダーゼであってもよい。また、上記ペルオキシダーゼに対しアミノ酸配列が90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の配列同一性を示し、かつ少なくともペルオキシドを酸化的に切断して2つのヒドロキシル基に分解する活性を有するペルオキシダーゼであってもよい。

[0147] シリカ担体は、大きな表面積を有することによりペルオキシダーゼの吸着量を高くできるという観点から、多孔質である多孔性シリカ担体であることが好ましい。シリカ担体としては、例えば、MCFs、FSM-16、MCM-41、MCM-48、SBA-15等のメソポーラスシリカが挙げられ

る。これらの中でも、特に酵素の吸着量が多いという観点から、M C F s が好ましい。

[0148] シリカ担体へのペルオキシダーゼの固定化は、例えば、共有結合、イオン結合、物理的吸着等による担体結合法等により行うことができる。中でも物理的吸着による担体結合法が簡便であるため好ましい。

[0149] 物理的吸着による固定化は、例えば、ペルオキシダーゼの水性溶液をシリカ担体に接触させることにより行うことができる。また、ペルオキシダーゼがシリカ担体に吸着し形成された固定化ペルオキシダーゼを水相から分離し、次いで分離した固定化ペルオキシダーゼを洗浄し、更に適切な含水率まで乾燥することを含んでもよい。

[0150] 物理的吸着により固定化する際の温度及びpHは、固定化するペルオキシダーゼの種類等に応じて適宜設定すればよい。多くのペルオキシダーゼでは、例えば、室温及び中性に近いpHで固定化することができる。シリカ担体とペルオキシダーゼの接触時間は、通常本質的に完全な吸着に対して必要とされるような時間が選ばれる。これは典型的には1～2時間から24時間である。

[0151] 本実施形態に係る固定化ペルオキシダーゼの製造方法は、固定化ペルオキシダーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、当該正規分布に基づいて赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、指標値を予め設定された閾値と比較し、閾値よりも赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える。

[0152] 本実施形態に係る固定化ペルオキシダーゼの製造方法において、指標値を、指標値7とした場合、指標値が75 cm⁻¹（閾値）以下となる固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、70 cm⁻¹であることがより好ましい。当該指標値は、通常小さくても65 cm⁻¹程度である。

[0153] 本実施形態に係る固定化ペルオキシダーゼの製造方法において、指標値を、指標値 8 とした場合、指標値が 0.45（閾値）以上となる固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜することが好ましい。閾値は、0.50 であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても 0.70 程度である。

[0154] 本実施形態に係る固定化ペルオキシダーゼの製造方法は、常法に従ってペルオキシダーゼをシリカ担体に担持させた固定化ペルオキシダーゼを得る工程を含んでいてもよい。当該工程により得られる固定化ペルオキシダーゼの中には、不可逆的変性又は可逆的変性により触媒活性の低いものも含まれ得るが、上記検査工程を経ることによって、不可逆的変性と可逆的変性を見分けることが可能となる。

[0155] 可逆的変性の場合、見かけ上触媒活性が低いものであるが、例えば、含水率を調整すること等により、触媒活性を再生することができる。

[0156] [ペルオキシダーゼ活性評価方法]

本実施形態に係る固定化ペルオキシダーゼのペルオキシダーゼ活性評価方法は、固定化ペルオキシダーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅡを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい固定化ペルオキシダーゼを、ペルオキシダーゼ活性のある固定化ペルオキシダーゼと評価するステップと、を含む評価工程を備える。

[0157] 本実施形態に係る固定化ペルオキシダーゼのペルオキシダーゼ活性評価方法における指標値及び閾値については、上記固定化ペルオキシダーゼの製造方法で説明したものと同様のものが例示できる。

[0158] [抗体の製造方法]

本明細書において、抗体とは、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEのいずれであってもよい。また、抗原結合能を保持した抗体のフラグメント（例えば、scFV、F(ab)、F(ab')₂等）であってもよい。抗体

はまた、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、マウス抗体、ウサギ抗体、ニワトリ抗体であってもよい。

[0159] 本実施形態に係る抗体の製造方法は、抗体の赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい抗体を良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える。

[0160] 本実施形態に係る抗体の製造方法において、指標値を、指標値1とした場合、指標値が 65 cm^{-1} （閾値）以下となる抗体を良品として選抜することが好ましい。閾値は、 60 cm^{-1} であることがより好ましい。当該指標値は、通常小さくても 57 cm^{-1} 程度である。

[0161] 本実施形態に係る抗体の製造方法において、指標値を、指標値6とした場合、指標値が0.98（閾値）以上となる抗体を良品として選抜することが好ましい。閾値は、1.00であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても1.09程度である。

[0162] 本実施形態に係る抗体の製造方法において、指標値を、指標値8とした場合、指標値が0.85（閾値）以上となる抗体を良品として選抜することが好ましい。閾値は、0.90であることがより好ましい。当該指標値は、通常大きくても0.97程度である。

[0163] 本実施形態に係る抗体の製造方法は、常法に従って抗体を得る工程を含んでいてもよい。当該工程は、例えば、抗体をコードするDNAを発現可能に組み換えた酵母、糸状菌、動物細胞、動物等を培養又は飼育することにより抗体を発現させ、細胞破碎物、培地、動物の乳等から発現した抗体を回収（精製）することにより行うことができる。本実施形態に係る抗体の製造方法で上記検査工程を経ることによって、十分な力価のある抗体を製造することが可能となる。

[0164] 〔抗体活性評価方法〕

本実施形態に係る抗体活性評価方法は、抗体の赤外吸収スペクトルにおいて、吸収バンドⅠ又は吸収バンドⅠⅠを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、上記正規分布に基づいて上記赤外吸収バンドの広がりの度合いを示す指標値を算出するステップと、上記指標値を予め設定された閾値と比較し、上記閾値よりも上記赤外吸収バンドの広がりの度合いが小さい抗体を活性のある抗体と評価するステップと、を含む評価工程を備える。ここでいう抗体活性とは、例えば、抗体力価である。

[0165] 本実施形態に係る抗体活性評価方法における指標値及び閾値については、上記抗体の製造方法で説明したものと同様のものが例示できる。

実施例

[0166] 以下、試験例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

[0167] [1. 固定化リパーゼの触媒活性評価]

<ヘキシルアクリレート の定量方法>

ヘキシルアクリレートは、ガスクロマトグラフィー（内部標準法）により定量した。ガスクロマトグラフィーによる測定条件は以下のとおりである。

- ・ガスクロマトグラフ装置（GC2014，株式会社島津製作所製）
- ・分析カラム：DB-5（30m×0.53mm ID 1.0μm，株式会社島津製作所製）
- ・カラム温度：60℃→2分間保持→10℃/分→200℃→2分間保持
- ・注入口温度：200℃
- ・検出口温度（FID）：250℃
- ・キャリアーガス：ヘリウム
- ・線速度：29.4cm/秒
- ・スプリット比：1：50
- ・注入量：1.0μL
- ・保持時間

ヘキシルアクリレート：9.31分

テトラエチレングリコールジメチルエーテル（内部標準物質）：15.6分

[0168] ＜エステル交換反応の比活性の算出方法＞

上記の方法で定量した生成ヘキシルアクリレートの量を用いて、下記式に従い、各多孔性樹脂担体にリパーゼが固定化されてなる固定化リパーゼのエステル交換反応の比活性を算出した。

[数1]

$$\begin{aligned} \text{エステル交換反応の比活性} \left(\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \right) \\ = \frac{\text{ヘキシルアクリレート生成量} \left(\text{mmol} \right)}{\text{リパーゼ重量} \left(\text{g} \right) \times \text{反応時間} \left(\text{h} \right)} \end{aligned}$$

[0169] ＜含水率測定方法＞

水分計（MOC63u, 乾燥重量法, 株式会社島津製作所製）を用いて、測定条件：標準乾燥自動停止モード（120℃：水分変化率0.05%）にて、試料約1.0gを用いて、2反復測定後平均値を算出した。

[0170] ＜FT-IRスペクトルの測定方法＞

各固定化リパーゼのFT-IRスペクトルは、フーリエ変換赤外分光光度計（FTS7000e顕微UMA600; Agilent Technologies社製）を用いて測定した。

[0171] 〔試験例1：指標値の算出〕

＜吸収バンド1＞

FT-IRスペクトルの1600～1700cm⁻¹付近に現れるリパーゼ由来の吸収バンド1から以下の手順により指標値1～6を算出した。

[0172] （指標値1：単一の正規分布近似における半値幅）

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト（Microsoft Excel; Microsoft社製）を用いて単一の正規分布で近似した。FT-IRスペクトルを単一の正規分布で近似する際、まず、1800及び1575cm⁻¹の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行った。次いで、1720cm⁻¹付近に出現する多孔

性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離した。その後、 1660 cm^{-1} 付近に出現するリパーゼに由来する吸収バンドを、非線形最小二乗法によって単一の正規分布で近似し、指標値として半値幅を算出した。なお、非線形最小二乗法では、ピーク位置、半値幅及び強度を変数とした。

[0173] (指標値2: 2つの正規分布に波形分離したときの吸収バンド面積比)

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト(Microsoft Excel; Microsoft社製)を用いて波形分離し、吸収バンド面積比を求めた。FT-IRスペクトルを波形分離する際、まず、 1800 及び 1575 cm^{-1} の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行った。次いで、 1720 cm^{-1} 付近に出現する多孔性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離し、その後、 1660 cm^{-1} 付近に出現するリパーゼに由来する吸収バンドの波形分離を行った。フィッティングに用いるガウス関数の初期値として、波数のバンド位置を 1656 cm^{-1} (A_1 及び A_2)の1点とし、また半値幅を 47 cm^{-1} (A_1)、 82 cm^{-1} (A_2)とした。非線形最小二乗法によって各吸収バンドを分離し、得られた各吸収バンドの面積を用いて、下記式に従い指標値2として吸収バンド面積比を算出した。

$$\text{吸収バンド面積比 (指標値2)} = A_1 / A_2$$

式中、 A_1 及び A_2 は、各吸収バンドの面積である。

[0174] (指標値3: 3つの正規分布に波形分離したときの吸収バンド面積比)

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト(Microsoft Excel; Microsoft社製)を用いて波形分離し、吸収バンド面積比を求めた。FT-IRスペクトルを波形分離する際、まず、 1800 及び 1575 cm^{-1} の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行った。次いで、 1720 cm^{-1} 付近に出現する多孔性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離し、その後、 1660 cm^{-1} 付近に出現するリパーゼに由来する吸収バンドの波形分離を

行った。フィッティングに用いるガウス関数の初期値として、波数のバンド位置を 1680 cm^{-1} (A_1)、 1656 cm^{-1} (A_2)、 1631 cm^{-1} (A_3) の3点とし、またそれぞれの半値幅を 50 cm^{-1} とした。非線形最小二乗法によって各吸収バンドを分離し、得られた各吸収バンドの面積を用いて、下記式に従い指標値3として吸収バンド面積比を算出した。

$$\text{吸収バンド面積比（指標値3）} = A_2 / (A_1 + A_3)$$

式中、 A_1 、 A_2 及び A_3 は、各吸収バンドの面積である。

[0175]（指標値4：5つの正規分布に波形分離したときの吸収バンド面積比）

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト（Microsoft Excel；Microsoft社製）を用いて波形分離し、吸収バンド面積比を求めた。FT-IRスペクトルを波形分離する際、まず、 1800 及び 1575 cm^{-1} の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行った。次いで、 1720 cm^{-1} 付近に出現する多孔性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離し、その後、 1660 cm^{-1} 付近に出現するリパーゼに由来する吸収バンドの波形分離を行った。フィッティングに用いるガウス関数の初期値として、波数のバンド位置を 1685 cm^{-1} (A_1)、 1670 cm^{-1} (A_2)、 1656 cm^{-1} (A_3)、 1641 cm^{-1} (A_4) 及び 1626 cm^{-1} (A_5) の5点とし、またそれぞれの半値幅を 30 cm^{-1} とした。非線形最小二乗法によって各吸収バンドを分離し、得られた各吸収バンドの面積を用いて、下記式に従い指標値4として吸収バンド面積比を算出した。

$$\text{吸収バンド面積比（指標値4）} = A_3 / (A_1 + A_2 + A_4 + A_5)$$

式中、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 及び A_5 は、各吸収バンドの面積である。

[0176]（指標値5及び指標値6：8つの正規分布に波形分離したときの吸収バンド面積比）

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト（Microsoft Excel；Microsoft社製）を用いて波形分離し、吸収バンド面積比を求めた。FT-IRスペクトルを波形分離

する際、まず、 1800 及び 1575 cm^{-1} の赤外吸収強度が 0 になるようにベースライン補正を行った。次いで、 1720 cm^{-1} 付近に出現する多孔性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離し、その後、 1660 cm^{-1} 付近に出現するリパーゼに由来する吸収バンドの波形分離を行った。フィッティングに用いるガウス関数の初期値として、波数のバンド位置を 1692 cm^{-1} (A_1)、 1682 cm^{-1} (A_2)、 1670 cm^{-1} (A_3)、 1658 cm^{-1} (A_4)、 1648 cm^{-1} (A_5)、 1638 cm^{-1} (A_6)、 1629 cm^{-1} (A_7) 及び 1619 cm^{-1} (A_8) の 8 点とし、またそれぞれの半値幅を 19 cm^{-1} とした。非線形最小二乗法によって各吸収バンドを分離し、得られた各吸収バンドの面積を用いて、下記式に従い指標値 5 及び指標値 6 として吸収バンド面積比を算出した。

$$\text{吸収バンド面積比 (指標値 } 5) = (A_4 + A_5) / (A_1 + A_2 + A_3 + A_6 + A_7 + A_8)$$

式中、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 、 A_6 、 A_7 及び A_8 は、各吸収バンドの面積である。

$$\text{吸収バンド面積比 (指標値 } 6) = (A_4 + A_5) / (A_2 + A_3 + A_8)$$

式中、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 及び A_8 は、各吸収バンドの面積である。

[0177] <吸収バンドⅠⅠ>

FT-IRスペクトルの $1500\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の吸収バンドⅠⅠから以下の手順により指標値 $7\sim 8$ を算出した。

[0178] (指標値 7 ：単一の正規分布近似における半値幅)

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト(Microsoft Excel; Microsoft社製)を用いて単一の正規分布で近似した。FT-IRスペクトルを単一の正規分布で近似する際、まず、 1800 及び 1575 cm^{-1} の赤外吸収強度が 0 になるようにベースライン補正を行った。次いで、 $1400\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 付近に出現する多孔性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離した。その後、 $1500\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ 付近に出現するリパーゼに由来する

吸収バンドを、非線形最小二乗法によって単一の正規分布で近似し、指標値として半値幅を算出した。なお、非線形最小二乗法では、ピーク位置、半値幅及び強度を変数とした。

[0179] (指標値 8 : 3つの正規分布に波形分離したときの吸収バンド面積比)

各固定化リパーゼについて、得られたFT-IRスペクトルを表計算ソフト(Microsoft Excel; Microsoft社製)を用いて波形分離し、吸収バンド面積比を求めた。FT-IRスペクトルを波形分離する際、まず、1800及び1575 cm⁻¹の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行った。次いで、1400~1500 cm⁻¹付近に出現する多孔性樹脂担体に由来する吸収バンドを、ガウス関数を用いて分離し、その後、1500~1570 cm⁻¹付近に出現するリパーゼに由来する吸収バンドの波形分離を行った。フィッティングに用いるガウス関数の初期値として、波数のバンド位置を1570 cm⁻¹ (B₁)、1545 cm⁻¹ (B₂)、1518 cm⁻¹ (B₃)の3点とし、またそれぞれの半値幅を31 cm⁻¹とした。非線形最小二乗法によって各吸収バンドを分離し、得られた各吸収バンドの面積を用いて、下記式に従い指標値 8として吸収バンド面積比を算出した。

$$\text{吸収バンド面積比 (指標値 8)} = B_2 / (B_1 + B_3)$$

式中、B₁、B₂及びB₃は、各吸収バンドの面積である。

[0180] 図2~8にリパーゼ由来の赤外吸収バンドを単一の正規分布で近似した例、及び波形分離した例を示した。図2は、試験例17で触媒として使用した固定化リパーゼ(Novozym 435)のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを単一の正規分布で近似した例を示す。図3は、試験例17で触媒として使用した固定化リパーゼ(Novozym 435)のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを2つの正規分布に波形分離した例を示す。図4は、試験例17で触媒として使用した固定化リパーゼ(Novozym 435)のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを3つの正規分布に波形分離した例を示す。図5は、

試験例3で触媒として使用した固定化リパーゼ（3.4 wt % Amano PS/Lewatit）のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを8つの正規分布に波形分離した各バンドを示したグラフである。図6は、試験例11で触媒として使用した固定化リパーゼ（3.4 wt % Amano PS/Lewatit）のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを8つの正規分布に波形分離した各バンドを示したグラフである。図7は、試験例14で触媒として使用した固定化リパーゼ（Novozym 435）のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを8つの正規分布に波形分離した各バンドを示したグラフである。図8は、試験例15で触媒として使用した固定化リパーゼ（Novozym 435）のFT-IRスペクトルと、リパーゼ由来の吸収バンドIを8つの正規分布に波形分離した各バンドを示したグラフである。

[0181] 〔試験例2：固定化リパーゼPS（3.4 wt % Amano PS/Lewatit）の調製〕

リパーゼPS「アマノ」SDH（アマノエンザイム社製）150gに100mMリン酸緩衝液（pH7.0）0.6Lと純水を加え溶解後、3Lに定容し、固定化液を調製した。そこに多孔性樹脂担体（LEWATIT VPOC 1600、LANXESS社製）600gを加え、6℃にて12時間攪拌した。その後、デカンテーションにて担体を回収し、純水で洗浄後、減圧乾燥し、固定化リパーゼ（リパーゼ固定化量3.4 wt %）352gを得た。この固定化リパーゼを「固定化リパーゼPS」又は「3.4 wt % Amano PS/Lewatit」と呼ぶ。

[0182] なお、リパーゼ固定化量は、固定化後上清中のタンパク濃度をBCA法によりBSA基準にてタンパク濃度を測定し、固定化前後のタンパク濃度減少分を、担体への固定化量として、総固定化タンパク量を算出した。

[0183] 〔試験例3：ヘキシルアクリレートの合成〕

攪拌装置及び温度調節装置を備えた内容積20mLのガラス製試験管に、1-ヘキサノール0.2g（2.0mmol）、アクリル酸メチル1.6g

(18.6 mmol)、テトラエチレングリコールジメチルエーテル0.04 g (0.2 mmol)、及び触媒として、含水率が7.1%の固定化リパーゼPSを加えて、攪拌しながら40℃で反応させた。1時間後、反応液を取り出し、上述の方法によりエステル交換反応の比活性を算出した。エステル交換反応の比活性は259.3 mmol · h⁻¹ · g⁻¹だった。また、上述の方法により求めた指標値1 (吸収バンド1、半値幅)は54.1 cm⁻¹であり、指標値6 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布)は、1.75であった。

[0184] [試験例4：ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、含水率が1.0%の固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は16.5 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1 (吸収バンド1、半値幅)は54.1 cm⁻¹であり、指標値6 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布)は1.73であった。

[0185] [試験例5：ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のメタノールに2時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を71.0%に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は89.8 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1 (吸収バンド1、半値幅)は61.1 cm⁻¹であり、指標値6 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布)は1.46であった。

[0186] [試験例6：ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のトルエンに2時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を50.0%に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は216.1 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1 (吸収バンド1、半値幅)は54.1 cm⁻¹であり、指標値6 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布)は1.68であった。

[0187] [試験例 7 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のアセトンに2時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を52.4%に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は169.7 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は61.1 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.44であった。

[0188] [試験例 8 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のアセトニトリルに2時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を58.6%に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は127.4 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は63.5 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.33であった。

[0189] [試験例 9 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃の1-ブタノールに2時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を65.5%に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は79.7 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は65.8 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.38であった。

[0190] [試験例 10 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のエタノールに2時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を60.2%に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は87.0 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は65.8 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.24であった。

[0191] [試験例 1 1 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、大気中 230℃で 1 時間保持し、その後精製水で洗浄して含水率を 40.0%に調整した固定化リパーゼ PS を使用したこと以外は、試験例 3 と同様に反応を行った。生成物であるヘキシルアクリレートは観測されなかった。また、上述の方法により求めた指標値 1 (吸収バンド I、半値幅) は 70.5 cm^{-1} であり、指標値 6 (吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布) は 0.95 であった。

[0192] [試験例 1 2 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、固定床流通式エステル交換反応に 3 ヶ月使用し、トルエンで洗浄した固定化リパーゼ PS を使用したこと以外は、試験例 3 と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は $13.6 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値 1 (吸収バンド I、半値幅) は 61.1 cm^{-1} であり、指標値 6 (吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布) は 1.28 であった。

[0193] [試験例 1 3 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、実施例 1 2 と同じ固定床流通式エステル交換反応に 3 ヶ月使用し、トルエンで洗浄した後、含水率 5%のアセトンに 6℃で一晩浸し、含水率を 46.1%に調整した固定化リパーゼ PS を使用したこと以外は、試験例 3 と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は $88.2 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値 1 (吸収バンド I、半値幅) は 61.1 cm^{-1} であり、指標値 6 (吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布) は 1.33 であった。

[0194] [試験例 1 4 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃の酢酸水溶液 (pH 2) に 2 時間浸した後、精製水で洗浄して含水率を 25.0%に調整した固定化リパーゼ PS を使用したこと以外は、試験例 3 と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は $209.6 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値 1 (吸収バンド I、半値幅) は 56.4 cm^{-1} であり、指標値 6 (吸収バ

ンドⅠ、吸収バンド面積比－８つの正規分布)は１．５５であった。

[0195]〔試験例１５：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、２５℃の塩酸水溶液(pH４)に１６時間浸した後、精製水で洗浄して含水率を１２．０％に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例３と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は２２０．５mmol・h⁻¹・g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値１(吸収バンドⅠ、半値幅)は６１．１cm⁻¹であり、指標値６(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－８つの正規分布)は１．５１であった。

[0196]〔試験例１６：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、７０℃の塩酸水溶液(pH４)に１６時間浸した後、精製水で洗浄して含水率を３３．０％に調整した固定化リパーゼPSを使用したこと以外は、試験例３と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は５６．１mmol・h⁻¹・g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値１(吸収バンドⅠ、半値幅)は６５．８cm⁻¹であり、指標値６(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－８つの正規分布)は１．２１であった。

[0197]〔試験例１７：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、含水率が１．０％のNovozym(登録商標)４３５(novozymes社製)を使用したこと以外は、試験例３と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は３４６．４mmol・h⁻¹・g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値１(吸収バンドⅠ、半値幅)は５７．６cm⁻¹であり、指標値２(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－２つの正規分布)は０．７２であり、指標値３(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－３つの正規分布)は１．８７であり、指標値４(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－５つの正規分布)は０．４９であり、指標値５(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－８つの正規分布)は０．７０であり、指標値６(吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－８つの正規分布)は１．４２であり、指標値７(吸収バンドⅠⅠ、半値幅)は３７．６cm⁻¹であり、指標値８(吸収バンドⅠⅠ、吸収バンド面積比－３つの正規分布)は１．７５であった。なお、

N o v o z y m（登録商標）435は、多孔性樹脂担体にリパーゼC a l Bを固定化した固定化リパーゼである。

[0198]〔試験例18：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、25℃のメタノールに3時間浸した後、真空乾燥により含水率を1.0%に調整したN o v o z y m（登録商標）435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は98.6 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は70.5 cm⁻¹であり、指標値2（吸収バンド1、吸収バンド面積比－2つの正規分布）は0.26であり、指標値3（吸収バンド1、吸収バンド面積比－3つの正規分布）は0.88であり、指標値4（吸収バンド1、吸収バンド面積比－5つの正規分布）は0.31であり、指標値5（吸収バンド1、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は0.58であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は1.06であり、指標値7（吸収バンド11、半値幅）は44.7 cm⁻¹であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比－3つの正規分布）は1.13であった。

[0199]〔試験例19：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、25℃のトルエンに3時間浸した後、真空乾燥により含水率を1.0%に調整したN o v o z y m（登録商標）435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は392.6 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は56.4 cm⁻¹であり、指標値2（吸収バンド1、吸収バンド面積比－2つの正規分布）は0.92であり、指標値3（吸収バンド1、吸収バンド面積比－3つの正規分布）は2.10であり、指標値4（吸収バンド1、吸収バンド面積比－5つの正規分布）は0.50であり、指標値5（吸収バンド1、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は0.69であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は1.48であった。

[0200] [試験例 20 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のアセトンに3時間浸した後、真空乾燥により含水率を1.0%に調整したNovozym (登録商標) 435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は384.4 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1 (吸収バンド1、半値幅) は56.4 cm⁻¹であり、指標値2 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-2つの正規分布) は1.05であり、指標値3 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-3つの正規分布) は2.50であり、指標値4 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-5つの正規分布) は0.53であり、指標値5 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布) は0.73であり、指標値6 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布) は1.58であった。

[0201] [試験例 21 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、25℃のアセトニトリルに3時間浸した後、真空乾燥により含水率を1.0%に調整したNovozym (登録商標) 435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は375.9 mmol · h⁻¹ · g⁻¹であった。また、上述の方法により求めた指標値1 (吸収バンド1、半値幅) は56.4 cm⁻¹であり、指標値2 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-2つの正規分布) は0.88であり、指標値3 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-3つの正規分布) は2.20であり、指標値4 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-5つの正規分布) は0.48であり、指標値5 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布) は0.74であり、指標値6 (吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布) は1.55であった。

[0202] [試験例 22 : ヘキシルアクリレートの合成]

触媒として、大気中230℃で1時間保持し、含水率を0.1%に調整したNovozym (登録商標) 435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。生成物であるヘキシルアクリレートは観測されなかった。

。また、上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 82.3 cm^{-1} であり、指標値 2（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 2 つの正規分布）は 0 であり、指標値 3（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 3 つの正規分布）は 0.47 であり、指標値 4（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 5 つの正規分布）は 0.25 であり、指標値 5（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布）は 0.45 であり、指標値 6（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布）は 0.85 であり、指標値 7（吸収バンド I I、半値幅）は 47.0 cm^{-1} であり、指標値 8（吸収バンド I I、吸収バンド面積比 - 3 つの正規分布）は 0.58 であった。

[0203] 〔試験例 23：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、25℃の酢酸水溶液（ $\text{pH}=2$ ）に2時間浸した後、真空乾燥により含水率を9.0%に調整したNovozym（登録商標）435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は224.2 $\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 58.8 cm^{-1} であり、指標値 2（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 2 つの正規分布）は 0.59 であり、指標値 3（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 3 つの正規分布）は 1.63 であり、指標値 4（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 5 つの正規分布）は 0.45 であり、指標値 5（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布）は 0.66 であり、指標値 6（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 8 つの正規分布）は 1.39 であった。

[0204] 〔試験例 24：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、25℃の塩酸水溶液（ $\text{pH}=4$ ）に16時間浸した後、真空乾燥により含水率を3.0%に調整したNovozym（登録商標）435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は351.6 $\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 58.8 cm^{-1} であり、指標値 2（吸収バンド I、吸収バンド面積比 - 2 つの正規分布）は 0.55 で

あり、指標値3（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－3つの正規分布）は1.97であり、指標値4（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－5つの正規分布）は0.50であり、指標値5（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は0.70であり、指標値6（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は1.42であった。

[0205] 〔試験例25：ヘキシルアクリレートの合成〕

触媒として、70℃の塩酸水溶液（ $\text{pH}=4$ ）に16時間浸した後、真空乾燥により含水率を5.0%に調整したNovozym（登録商標）435を使用したこと以外は、試験例3と同様に反応を行った。エステル交換反応の比活性は $187.8 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンドⅠ、半値幅）は 61.1 cm^{-1} であり、指標値2（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－2つの正規分布）は0.49であり、指標値3（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－3つの正規分布）は1.38であり、指標値4（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－5つの正規分布）は0.37であり、指標値5（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は0.63であり、指標値6（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－8つの正規分布）は1.31であり、指標値7（吸収バンドⅠⅠ、半値幅）は 40.0 cm^{-1} であり、指標値8（吸収バンドⅠⅠ、吸収バンド面積比－3つの正規分布）は1.67であった。

[0206] 上記の試験例の結果を下記表1にまとめた。また、図9～16に各指標値（半値幅又は吸収バンド面積比）及びリパーゼのエステル交換反応の比活性等をプロットしたグラフを示した。

[0207] 図9は、試験例17～25の指標値1（吸収バンドⅠ、半値幅）に対してリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な負の相関が認められる。

[0208] 図10は、試験例17、18、22及び25の指標値1（吸収バンドⅠ、半値幅）に対して指標値7（吸収バンドⅠⅠ、半値幅）をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。

- [0209] 図11は、試験例3～16の指標値1（吸収バンドⅠ、半値幅）に対してリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な負の相関が認められる。なお、試験例4及び試験例12の結果（図中、各試験例に対応する数字をプロットに付した。）については後述する。
- [0210] 図12は、試験例17～25の指標値2（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－2つの正規分布）とリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。
- [0211] 図13は、試験例17～25の指標値3（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－3つの正規分布）とリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。
- [0212] 図14は、試験例17～25の指標値4（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－5つの正規分布）とリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。
- [0213] 図15は、試験例17～25の指標値5（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－8つの正規分布）とリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。
- [0214] 図16は、試験例3～25の指標値6（吸収バンドⅠ、吸収バンド面積比－8つの正規分布）とリパーゼのエステル交換反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。
- [0215]

[表1]

試験例	固定化リパーゼ	処理	含水率(%)	指標値								比活性 (mmol・h ⁻¹ ・g ⁻¹)
				1	2	3	4	5	6	7	8	
3	3.4wt% Amano PS/Lewatit	無処理	7.1	54.1	—	—	—	—	1.75	—	—	259.3
4	3.4wt% Amano PS/Lewatit	無処理	1.0	54.1	—	—	—	—	1.73	—	—	16.5
5	3.4wt% Amano PS/Lewatit	メタノール、25°C、2 時間	71.0	61.1	—	—	—	—	1.46	—	—	89.8
6	3.4wt% Amano PS/Lewatit	トルエン、25°C、2 時間	50.0	54.1	—	—	—	—	1.68	—	—	216.1
7	3.4wt% Amano PS/Lewatit	アセトン、25°C、2 時間	52.4	61.1	—	—	—	—	1.44	—	—	169.7
8	3.4wt% Amano PS/Lewatit	アセトニトリル、25°C、2 時間	58.6	63.5	—	—	—	—	1.33	—	—	127.4
9	3.4wt% Amano PS/Lewatit	1-ブタノール、25°C、2 時間	65.5	65.8	—	—	—	—	1.38	—	—	79.7
10	3.4wt% Amano PS/Lewatit	エタノール、25°C、2 時間	60.2	65.8	—	—	—	—	1.24	—	—	87.0
11	3.4wt% Amano PS/Lewatit	230°C、1 時間	40.0	70.5	—	—	—	—	0.95	—	—	0
12	3.4wt% Amano PS/Lewatit	3 ヶ月反応使用	—	61.1	—	—	—	—	1.28	—	—	13.6
13	3.4wt% Amano PS/Lewatit	3 ヶ月反応使用後、 含水率 5%のアセトン、6°C、一晚	46.1	61.1	—	—	—	—	1.33	—	—	88.2
14	3.4wt% Amano PS/Lewatit	酢酸水溶液 (pH2)、25°C、2 時間	25.0	56.4	—	—	—	—	1.55	—	—	209.6
15	3.4wt% Amano PS/Lewatit	塩酸水溶液 (pH4)、25°C、16 時間	12.0	61.1	—	—	—	—	1.51	—	—	220.5
16	3.4wt% Amano PS/Lewatit	塩酸水溶液 (pH4)、70°C、16 時間	33.0	65.8	—	—	—	—	1.21	—	—	56.1
17	Novozym(登録商標)435	無処理	1.0	57.6	0.72	1.87	0.49	0.70	1.42	37.6	1.75	346.4
18	Novozym(登録商標)435	メタノール、25°C、3 時間	1.0	70.5	0.26	0.88	0.31	0.58	1.06	44.7	1.13	98.6
19	Novozym(登録商標)435	トルエン、25°C、3 時間	1.0	56.4	0.92	2.10	0.50	0.69	1.48	—	—	392.6
20	Novozym(登録商標)435	アセトン、25°C、3 時間	1.0	56.4	1.05	2.50	0.53	0.73	1.58	—	—	384.4
21	Novozym(登録商標)435	アセトニトリル、25°C、3 時間	1.0	56.4	0.88	2.20	0.48	0.74	1.55	—	—	375.9
22	Novozym(登録商標)435	230°C、1 時間	0.1	82.3	0	0.47	0.25	0.45	0.85	47.0	0.58	0
23	Novozym(登録商標)435	酢酸水溶液 (pH2)、25°C、2 時間	9.0	58.8	0.59	1.63	0.45	0.66	1.39	—	—	224.2
24	Novozym(登録商標)435	塩酸水溶液 (pH4)、25°C、16 時間	3.0	58.8	0.55	1.97	0.50	0.70	1.42	—	—	351.6
25	Novozym(登録商標)435	塩酸水溶液 (pH4)、70°C、16 時間	5.0	61.1	0.49	1.38	0.37	0.63	1.31	40.0	1.13	187.8

[0216] 表 1 及び図 9 ～ 16 から明らかなように、十分な含水率の固定化リパーゼ（可逆的変性を受けていないと考えられる）は、指標値（半値幅又は吸収バンド面積比）と触媒活性（エステル交換反応の比活性）とに線形近似可能な相関が認められる。この相関関係から、半値幅が所定値以下、又は吸収バンド面積比が所定値（例えば、指標値 6 の場合は 1.2 以上）以上の固定化リパーゼは、触媒活性又は潜在的な触媒活性が充分であると評価することができる。

[0217] また、試験例 12 及び試験例 13 の対比から、含水有機溶媒を用いた処理により可逆的変性を解消することによって、吸収バンド面積比に対応した触媒活性を再生可能であることが理解できる。すなわち、試験例 13 の固定化リパーゼは、試験例 12 の固定化リパーゼを含水率 5 % のアセトンで処理したものである。表 1 の結果から明らかなように当該処理により触媒活性が再生され、例えば図 16 に示したとおり、3.4 wt % Amano PS / Lewatit の線形近似曲線（図示せず）上に入った。試験例 13 及び試験例 12 の固定化リパーゼは、ほぼ同等の指標値（例えば、指標値 1 の半値幅はいずれも 61.1 cm^{-1} であり、指標値 6 の吸収バンド面積比は、それぞれ 1.33 及び 1.28 である。）を有するものである。

[0218] さらに、試験例 3 及び試験例 4 の対比からも可逆的変性を解消することによって、吸収バンド面積比に対応した触媒活性を再生可能であることが理解できる。試験例 3 及び試験例 4 の固定化リパーゼは、含水率のみが異なり（含水率の低い試験例 4 の固定化リパーゼは可逆的変性を受けていると考えられる）、同等の指標値を有している。

[0219] 実際に触媒反応を行い触媒活性を測定することにより固定化リパーゼの触媒活性を評価する従来の方法では、例えば、試験例 12 及び試験例 4 の固定化リパーゼは、触媒活性の再生が可能であるにも関わらず、不良品としてはじかれてしまう。一方、本発明の方法によれば、試験例 12 及び試験例 4 の固定化リパーゼは、半値幅が所定値以下、又は吸収バンド面積比が所定値以上あるため、触媒活性を再生可能な固定化リパーゼとして選抜することができる。

きる。

[0220] [2. 固定化ペルオキシダーゼの触媒活性評価]

<o-フェニレンジアミンの酸化物の定量方法>

o-フェニレンジアミンの酸化物は、紫外可視分光光度計でUV-visスペクトルを測定することにより定量した。紫外可視分光光度計による測定条件は以下のとおりである。

- ・紫外可視分光光度計（UV2450、株式会社島津製作所製）
- ・ピーク波長：420nm

[0221] <酸化反応の比活性の算出方法>

上記の方法で測定したo-フェニレンジアミンの酸化物に由来するUV-visスペクトルのピーク強度（420nmにおける吸収強度）を用いて、下記式に従い、固定化ペルオキシダーゼの酸化反応の比活性を算出した。なお、オキシダーゼ重量は、BCA法によりBSA基準にて求めたペルオキシダーゼの重量である。

[数2]

$$\text{酸化反応の比活性 (g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{420\text{nmにおける吸収強度}}{\text{オキシダーゼ重量(g)} \times \text{反応時間(h)}}$$

[0222] <含水率測定方法>

固定化リパーゼの場合と同様の方法で含水率を測定した。

[0223] [試験例26：指標値の算出]

1800及び1545cm⁻¹の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行ったこと以外は、試験例1と同様にして指標値を算出した。

[0224] [試験例27：固定化ペルオキシダーゼ（2.6wt% HRP/MCFs）の調製]

33.2gのPluronic P-123に、20% HCl水溶液及び精製水をそれぞれ400g及び200gずつ加え、次いで、メシチレンを23.5g加えた。その後、40℃に加熱したウォーターバスに浸し、Pluronic P-123を十分に溶解させた。その後、テトラエトキシシ

ランを70.0 g 加え、5 分間攪拌した後、30℃で20時間静置させた。得られた白色スラリーに、フッ化アンモニウム水溶液(0.38 g/40 g-H₂O)を加え、100℃で24時間熟成させた。その後、500 mLの精製水-エタノール混合液で洗浄、濾過した後、100℃のオーブンで一晩乾燥させた。得られた白色粉体を大気雰囲気下、500℃まで5時間かけて昇温し、そのままの温度で5時間保持した。得られた白色粉末(Siliceous Mesocellular Foams, MCFs)を、「シリカ担体」又は「MCFs」と呼ぶ。窒素吸脱着測定によって求めたシリカ担体の比表面積及び平均細孔径は、それぞれ597 m²・g⁻¹及び24.4 nmだった。

[0225] 西洋わさびペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase, HRP, 100 units・mg⁻¹、和光純薬製)82 mgを、8.1 gの50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7)に溶解させて固定化原液とした。固定化原液を7.0 g秤量し、そこに担体を0.35 g添加した。得られたスラリーを7℃で24時間攪拌した。ペルオキシダーゼ固定化量は、固定化原液のタンパク質濃度と、スラリーを遠心分離して得られた上澄み液中のタンパク質濃度を、BCA法により定量し、両者の差分から算出した。その結果、ペルオキシダーゼ固定化量は2.6 wt %であった。この固定化ペルオキシダーゼを、「固定化ペルオキシダーゼ」又は「2.6 wt % HRP/MCFs」と呼ぶ。

[0226] [試験例28：o-フェニレンジアミンの酸化反応]

攪拌装置及び温度調節装置を備えた内容積20 mLのガラス製試験管に、0.1 M o-フェニレンジアミンのトルエン溶液2.5 mL、1.1 M t-ブチルヒドロペルオキシドのデカン溶液0.6 mL、及び触媒として、含水率が34.9%の固定化ペルオキシダーゼを加えて、攪拌しながら35℃で反応させた。1時間後、反応液を取り出し、上述の方法により酸化反応の比活性を算出した。酸化反応の比活性は、3899.9 h⁻¹・g⁻¹だった。また、上述の方法により求めた指標値7(吸収バンド11、半値幅)は6

5. 7 cm^{-1} であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.70であった。

[0227] [試験例29：o-フェニレンジアミンの酸化反応]

触媒として、25℃のメタノールに3時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を22.7%に調整した固定化ペルオキシダーゼを使用したこと以外は、試験例28と同様に反応を行った。酸化反応の比活性は $1016.0 \text{ h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値7（吸収バンド11、半値幅）は 75.1 cm^{-1} であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.40であった。

[0228] [試験例30：o-フェニレンジアミンの酸化反応]

触媒として、110℃のトルエンに3時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を28.5%に調整した固定化ペルオキシダーゼを使用したこと以外は、試験例28と同様に反応を行った。酸化反応の比活性は $2841.5 \text{ h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値7（吸収バンド11、半値幅）は 71.1 cm^{-1} であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.62であった。

[0229] [試験例31：o-フェニレンジアミンの酸化反応]

触媒として、60℃のHCl水溶液（pH3.5）に3時間浸し、その後精製水で洗浄して含水率を25.3%に調整した固定化ペルオキシダーゼを使用したこと以外は、試験例28と同様に反応を行った。酸化反応の比活性は $2374.8 \text{ h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。また、上述の方法により求めた指標値7（吸収バンド11、半値幅）は 70.5 cm^{-1} であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.58であった。

[0230] 試験例28～31の結果を下記表2にまとめた。また、図17～18にペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンドを単一の正規分布で近似した例、及び波形分離した例を示した。図19～20に各指標値（半値幅又は吸収バンド面積比）及びペルオキシダーゼの酸化反応の比活性をプロットしたグラフを示した。

[0231] 図17は、試験例28で触媒として使用した固定化ペルオキシダーゼのFT-IRスペクトルと、ペルオキシダーゼ由来の吸収バンド11を単一の正規分布で近似した例を示す。図18は、試験例28で触媒として使用した固定化ペルオキシダーゼのFT-IRスペクトルと、ペルオキシダーゼ由来の吸収バンド11を3つの正規分布に波形分離した例を示す。

[0232] 図19は、試験例28～31の指標値7（吸収バンド11、半値幅）に対してペルオキシダーゼの酸化反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な負の相関が認められる。

[0233] 図20は、試験例28～31の指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比－3つの正規分布）に対してペルオキシダーゼの酸化反応の比活性をプロットしたグラフである。線形近似可能な正の相関が認められる。

[0234]

[表2]

試験例	固定化ペルオキシダーゼ	処理	含水率(%)	指標値7	指標値8	酸化反応の比活性 ($\text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)
28	2.6wt% HRP/MCFs	無処理	34.9	65.7	0.70	3899.9
29	2.6wt% HRP/MCFs	メタノール、25°C、3 時間	22.7	75.1	0.40	1016.0
30	2.6wt% HRP/MCFs	トルエン、110°C、3 時間	28.5	71.1	0.62	2841.5
31	2.6wt% HRP/MCFs	塩酸水溶液 (pH3.5)、60°C、3 時間	25.3	70.5	0.58	2374.8

[0235] 表2及び図19～20から明らかなように、十分な含水率の固定化ペルオ

キシダーゼ（可逆的変性を受けていないと考えられる）は、指標値（半値幅又は吸収バンド面積比）と触媒活性（酸化反応の比活性）とに線形近似可能な相関が認められる。この相関関係から、半値幅が所定値以下、又は吸収バンド面積比が所定値以上の固定化ペルオキシダーゼは、触媒活性又は潜在的な触媒活性が充分であると評価することができる。

[0236] [3. 抗体の力価評価]

＜抗体の力価測定方法＞

抗体（IgG）の力価は、直接吸着法ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）により測定した。

[0237] 抗原（ニワトリIgG）50 μ gにPBS（Phosphate Buffered Saline：10mMリン酸（pH7.4）、0.14M NaCl、0.0027M KCl）緩衝液を加え、1000 ng/mLの抗原溶液を調製した。1000 ng/mLの抗原溶液から、PBSにより2倍希釈により、1000, 500, 250, 125, 63, 31, 16 ng/mLの抗原溶液を調製した。各抗原溶液50 μ Lを96穴プレートの各ウェルに加え、5分放置し、各ウェルに吸着させた。各ウェルをPBSで2回洗浄して、抗原が吸着した96穴プレートを得た。

[0238] 力価測定対象となる抗体を0.05% Tween 20含有PBSで溶解希釈し、1 μ g/mLの抗体溶液（1次抗体溶液という）とした。1次抗体溶液50 μ Lを抗原が吸着した96穴プレートの各ウェルに加え、5分間放置し、抗原に結合させた。各ウェルを0.05% Tween 20含有PBSで2回洗浄した。

[0239] 西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ウサギ抗体50 μ gを0.05% Tween 20含有PBSで溶解希釈し、1 μ g/mLの抗体溶液（2次抗体溶液という）とした。2次抗体溶液50 μ Lを1次抗体を結合させた96穴プレートの各ウェルに加え、5分間放置し、1次抗体に結合させた。各ウェルを0.05% Tween 20含有PBSで2回洗浄した。

[0240] 酵素基質溶液（3，3'，5，5'-テトラメチルベンジジン（TMB），BIO-RAD社製）50 μ Lを2次抗体を結合させた96穴プレートの各ウェルに加え、室温で5分間放置した後、マイクロプレートリーダー（テカン社製）で655 nmの吸光度を測定した。

[0241] 〔試験例32：指標値の算出〕

1720及び1490 cm^{-1} の赤外吸収強度が0になるようにベースライン補正を行ったこと以外は、試験例1と同様にして指標値を算出した。

[0242] 〔試験例33：抗体力価の測定〕

抗ニワトリIgGウサギ抗体（Rockland inc製）溶液（10.0 mg/mL）0.5 mLにポリエチレングリコール（PEG：平均分子量20,000）45 mgを加え、10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）5 mLに溶解し、抗体溶液とした。抗体溶液0.5 mLを試験管に分取し、直ちに-20℃で凍結乾燥させた。凍結乾燥後の抗体を力価測定、及び顕微ATR法によるFT-IRスペクトル測定に用いた。抗体の力価を測定した結果を表3及び図23に示す（図23中、試験例33は、「-20℃」のプロットに対応する）。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンドI、半値幅）は57.0 cm^{-1} であり、指標値6（吸収バンドI、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.09であり、指標値8（吸収バンドII、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.97であった。

[0243] 〔試験例34：抗体力価の測定〕

抗体溶液0.5 mLを試験管に分取した後、4℃で24時間静置してから-20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例33と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表3及び図23に示す（図23中、試験例34は、「4℃」のプロットに対応する）。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンドI、半値幅）は57.6 cm^{-1} であり、指標値6（吸収バンドI、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.03であり、指標値8（吸収バンドII、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.92であった。

[0244] 〔試験例 3 5 : 抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、25℃で24時間静置してから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例 3 3 と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表 3 及び図 2 3 に示す（図 2 3 中、試験例 3 5 は、「25℃」のプロットに対応する）。また、上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 57.7 cm⁻¹であり、指標値 6（吸収バンド I、吸収バンド面積比—8つの正規分布）は 1.00であり、指標値 8（吸収バンド I I、吸収バンド面積比—3つの正規分布）は 0.94であった。

[0245] 〔試験例 3 6 : 抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、50℃で24時間静置してから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例 3 3 と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表 3 及び図 2 3 に示す（図 2 3 中、試験例 3 6 は、「50℃」のプロットに対応する）。また、上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 58.4 cm⁻¹であり、指標値 6（吸収バンド I、吸収バンド面積比—8つの正規分布）は 1.02であり、指標値 8（吸収バンド I I、吸収バンド面積比—3つの正規分布）は 0.93であった。

[0246] 〔試験例 3 7 : 抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、75℃で24時間静置してから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例 3 3 と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表 3 及び図 2 3 に示す（図 2 3 中、試験例 3 7 は、「75℃」のプロットに対応する）。また、上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 66.0 cm⁻¹であり、指標値 6（吸収バンド I、吸収バンド面積比—8つの正規分布）は 0.96であり、指標値 8（吸収バンド I I、吸収バンド面積比—3つの正規分布）は 0.80であった。

[0247] 〔試験例 3 8 : 抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、90℃で24時間静置してから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例33と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表3及び図23に示す（図23中、試験例38は、「90℃」のプロットに対応する）。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は70.6 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比−8つの正規分布）は0.92であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比−3つの正規分布）は0.79であった。

[0248] 〔試験例39：抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、10% v/v となるようアセトンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例33と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表3に示す。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は56.9 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比−8つの正規分布）は0.98であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比−3つの正規分布）は0.95であった。

[0249] 〔試験例40：抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、20% v/v となるようアセトンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例33と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表3に示す。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は56.7 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比−8つの正規分布）は1.01であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比−3つの正規分布）は0.97であった。

[0250] 〔試験例41：抗体力価の測定〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、40% v/v となるようアセ

トンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから-20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例33と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表3に示す。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は57.0 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.00であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.96であった。

[0251] [試験例42：抗体力価の測定]

抗体溶液0.5 mLを試験管に分取した後、50% v/vとなるようアセトンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから-20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例33と同様に測定を行った。抗体の力価を測定した結果を表3に示す。また、上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は57.8 cm⁻¹であり、指標値6（吸収バンド1、吸収バンド面積比-8つの正規分布）は1.00であり、指標値8（吸収バンド11、吸収バンド面積比-3つの正規分布）は0.93であった。

[0252] [試験例43：指標値の算出]

抗ニワトリ卵白リゾチーム抗体（Anti White Lysozyme、コスモバイオ株式会社製）溶液（10.0 mg/mL）0.5 mLにポリエチレングリコール（PEG：平均分子量20,000）45 mgを加え、10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）5 mLに溶解し、抗体溶液とした。抗体溶液0.5 mLを試験管に分取し、直ちに-20℃で凍結乾燥させた。凍結乾燥後の抗体を顕微ATR法によるFT-IRスペクトル測定に用いた。上述の方法により求めた指標値1（吸収バンド1、半値幅）は57.1 cm⁻¹であった。

[0253] [試験例44：指標値の算出]

抗体溶液0.5 mLを試験管に分取した後、4℃で24時間静置してから-20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例43と同様に測定を行った。上

述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド 1、半値幅）は 57.4 cm^{-1} であった。

[0254]〔試験例 4 5：指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、 25°C で 24 時間静置してから -20°C で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド 1、半値幅）は 58.6 cm^{-1} であった。

[0255]〔試験例 4 6：指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、 50°C で 24 時間静置してから -20°C で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド 1、半値幅）は 62.5 cm^{-1} であった。

[0256]〔試験例 4 7：指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、 75°C で 24 時間静置してから -20°C で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド 1、半値幅）は 72.5 cm^{-1} であった。

[0257]〔試験例 4 8：指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、 90°C で 24 時間静置してから -20°C で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド 1、半値幅）は 94.0 cm^{-1} であった。

[0258]〔試験例 4 9：指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、10% v/v となるようアセトンを加え、 25°C で 24 時間静置し、10 分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから -20°C で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド 1、半値幅）は 58.4 cm^{-1} であった。

[0259] 〔試験例 5 0 : 指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、20% v/v となるようアセトンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 59.0 cm⁻¹であった。

[0260] 〔試験例 5 1 : 指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、40% v/v となるようアセトンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 59.9 cm⁻¹であった。

[0261] 〔試験例 5 2 : 指標値の算出〕

抗体溶液 0.5 mL を試験管に分取した後、50% v/v となるようアセトンを加え、25℃で24時間静置し、10分間窒素パージしてアセトンを揮散させてから−20℃で凍結乾燥させたこと以外は試験例 4 3 と同様に測定を行った。上述の方法により求めた指標値 1（吸収バンド I、半値幅）は 62.0 cm⁻¹であった。

[0262] 試験例 3 3～5 2 の結果を下記表 3 にまとめた。また、図 2 1～2 2 に抗体由来の赤外吸収バンドを単一の正規分布で近似した例、及び波形分離した例を示した。図 2 4～2 5 に各指標値（半値幅又は吸収バンド面積比）及び抗体力価をプロットしたグラフを示した。

[0263] 図 2 1 は、試験例 3 3 で凍結乾燥した抗体の FT-IR スペクトルと、抗体由来の吸収バンド I 及び吸収バンド II を単一の正規分布で近似した例を示す。図 2 2 は、試験例 3 3 で凍結乾燥した抗体の FT-IR スペクトルと、抗体由来の吸収バンド I を 8 つの正規分布に波形分離した例、及び吸収バンド II を 3 つの正規分布に波形分離した例を示す。

[0264] 図 2 4 は、試験例 3 3～4 2 の指標値 1（吸収バンド I、半値幅）に対し

て抗体の力価をプロットしたグラフである。線形近似可能な負の相関が認められる。

[0265] 図 25 は、試験例 33～42 の指標値 6（吸収バンド I、吸収バンド面積比－8 つの正規分布）、及び指標値 8（吸収バンド II、吸収バンド面積比－3 つの正規分布）に対して抗体の力価をプロットしたグラフである。いずれの指標値においても線形近似可能な正の相関が認められる。

[0266]

[表3]

試験例	抗体	処理	指標値1	指標値6	指標値8	各抗原濃度 (ng・mL ⁻¹) における力価 A ₆₅₅							
						1000	500	250	125	63	31	16	0
33	抗ニワトリIgG	-20℃	57.0	1.09	0.97	1.06	1.05	1.06	0.91	0.69	0.44	0.31	0.05
34	抗ニワトリIgG	4℃	57.6	1.03	0.92	1.05	1.01	1.07	0.86	0.63	0.47	0.33	0.05
35	抗ニワトリIgG	25℃	57.7	1.00	0.94	0.99	0.97	0.97	0.82	0.63	0.38	0.29	0.05
36	抗ニワトリIgG	50℃	58.4	1.02	0.93	0.90	0.89	0.84	0.49	0.39	0.24	0.18	0.05
37	抗ニワトリIgG	75℃	66.0	0.96	0.80	0.10	0.09	0.09	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05
38	抗ニワトリIgG	90℃	70.6	0.92	0.79	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04
39	抗ニワトリIgG	10%アセトン	56.9	0.98	0.95	1.02	0.93	0.94	0.77	0.58	0.41	0.20	0.04
40	抗ニワトリIgG	20%アセトン	56.7	1.01	0.97	1.02	0.99	0.97	0.75	0.65	0.36	0.29	0.04
41	抗ニワトリIgG	40%アセトン	57.0	1.00	0.96	0.99	0.96	0.86	0.77	0.49	0.35	0.21	0.05
42	抗ニワトリIgG	50%アセトン	57.8	1.00	0.93	1.05	1.03	0.97	0.81	0.65	0.43	0.29	0.04
43	抗ニワトリ卵白リゾチーム	-20℃	57.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
44	抗ニワトリ卵白リゾチーム	4℃	57.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	抗ニワトリ卵白リゾチーム	25℃	58.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
46	抗ニワトリ卵白リゾチーム	50℃	62.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
47	抗ニワトリ卵白リゾチーム	75℃	72.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
48	抗ニワトリ卵白リゾチーム	90℃	94.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
49	抗ニワトリ卵白リゾチーム	10%アセトン	58.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	抗ニワトリ卵白リゾチーム	20%アセトン	59.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
51	抗ニワトリ卵白リゾチーム	40%アセトン	59.9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
52	抗ニワトリ卵白リゾチーム	50%アセトン	62.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[0267] 表3及び図24～25から明らかなように、指標値（半値幅又は吸収バンド面積比）と抗体力価とに線形近似可能な相関が認められる。この相関関係

から、半値幅が所定値以下、又は吸収バンド面積比が所定値以上の抗体は、力価が充分であると評価することができる。

請求の範囲

- [請求項1] タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近又は $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンドを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、
- 前記正規分布に基づいて前記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、
- 前記指標値を予め設定された閾値と比較し、前記閾値よりも前記赤外吸収バンドの広がり具合が小さいタンパク質を良品として選抜するステップと、を含む検査工程を備える、タンパク質の製造方法。
- [請求項2] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを複数の正規分布に波形分離し、前記赤外吸収バンドのピークトップ位置付近の1又は複数の正規分布の面積の総和を、前記赤外吸収バンドの端付近の1又は複数の正規分布の面積の総和で割った値である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを、いずれも前記赤外吸収バンドのピークトップ位置付近に頂点を有し、かつ、互いに異なる半値幅を有する2つの正規分布に波形分離し、前記2つの正規分布のうち半値幅が小さい方の正規分布の面積を、半値幅が大きい方の正規分布の面積で割った値である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを $A_1 \sim A_n$ の n 個（ n は3以上の整数）の正規分布に波形分離し、
- 前記 n が偶数のとき、 $A_{n/2}$ 及び $A_{n/2+1}$ の少なくとも一方又は両方の面積の総和を $A_1 \sim A_{n/2-1}$ 及び $A_{n/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値であり、
- 前記 n が奇数のとき、 $A_{(n+1)/2}$ の面積を $A_1 \sim A_{(n+1)/2-1}$ 及び $A_{(n-1)/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積

の総和で割った値である、請求項1に記載の製造方法。

[請求項6] 前記タンパク質が、樹脂担体にリパーゼが固定化されてなる固定化リパーゼである、請求項1に記載の製造方法。

[請求項7] 前記指標値が、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅であり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が 70 cm^{-1} 以下となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項8] 前記指標値が、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、 A_1 及び A_2 の2つの正規分布に波形分離し、 A_1 の面積を A_2 の面積で割った値であり、

前記波形分離は、前記リパーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記2つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 47 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 82 cm^{-1} ）の2つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.27以上となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項9] 前記指標値が、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、 A_1 、 A_2 及び A_3 の3つの正規分布に波形分離し、 A_2 の面積を A_1 及び A_3 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記リパーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記3つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1680 cm^{-1} 、半値幅 50 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 50 cm^{-1} ）及び A_3 （ピーク位置 1631 cm^{-1} 、半値幅 50 cm^{-1} ）の3つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.9以上となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項10]

前記指標値が、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 及び A_5 の5つの正規分布に波形分離し、 A_3 の面積を A_1 、 A_2 、 A_4 及び A_5 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記リパーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記5つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1685 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1670 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）、 A_3 （ピーク位置 1656 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）、 A_4 （ピーク位置 1641 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）及び A_5 （ピーク位置 1626 cm^{-1} 、半値幅 30 cm^{-1} ）の5つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.35以上となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項11]

前記指標値が、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 、 A_6 、 A_7 及び A_8 の8つの正規分布に波形分離し、 A_4 及び A_5 の面積の総和を A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_6 、 A_7 及び A_8 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記リパーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記8つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1692 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1682 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_3 （ピーク位置 1670 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_4 （ピーク位置 1658 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_5 （ピーク位置 1648 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_6 （ピーク位置 1638 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_7 （ピーク位置 1629 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）及び A_8 （ピーク位置 1619 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）の8つの正規分

布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.6以上となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項12]

前記指標値が、 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 、 A_6 、 A_7 及び A_8 の8つの正規分布に波形分離し、 A_4 及び A_5 の面積の総和を A_2 、 A_3 及び A_8 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記リパーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記8つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1692 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1682 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_3 （ピーク位置 1670 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_4 （ピーク位置 1658 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_5 （ピーク位置 1648 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_6 （ピーク位置 1638 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_7 （ピーク位置 1629 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）及び A_8 （ピーク位置 1619 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）の8つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が1.2以上となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項13]

前記指標値が、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅であり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が 44 cm^{-1} 以下となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項14]

前記指標値が、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、 B_1 、 B_2 及び B_3 の3つの正規分布に波形分離し、 B_2 の面積を B_1 及び B_3 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記リパーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記3つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 B_1 （ピーク位置 1570 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）、 B_2 （ピーク位置 1545 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）及び B_3 （ピーク位置 1518 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）の3つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が1.2以上となる固定化リパーゼを良品として選抜する、請求項6に記載の製造方法。

[請求項15] 前記固定化リパーゼが、エステル交換活性又はエステル加水分解活性を有する、請求項6～14のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項16] 前記リパーゼが、バルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) 又はカンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*) 由来のリパーゼである、請求項6～15のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項17] 前記タンパク質が、シリカ担体にペルオキシダーゼが固定化される固定化ペルオキシダーゼである、請求項1に記載の製造方法。

[請求項18] 前記指標値が、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンドを、単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅であり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が 75 cm^{-1} 以下となる固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜する、請求項17に記載の製造方法。

[請求項19] 前記指標値が、 $1500\sim1600\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンドを、 B_1 、 B_2 及び B_3 の3つの正規分布に波形分離し、 B_2 の面積を B_1 及び B_3 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記ペルオキシダーゼ由来の赤外吸収バンドの面積と、前記3つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となる

ように、 B_1 （ピーク位置 1570 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）、 B_2 （ピーク位置 1545 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）及び B_3 （ピーク位置 1518 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）の3つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.45以上となる固定化ペルオキシダーゼを良品として選抜する、請求項17に記載の製造方法。

[請求項20] 前記タンパク質が、抗体である、請求項1に記載の製造方法。

[請求項21] 前記指標値が、 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンドを、単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅であり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が 65 cm^{-1} 以下となる抗体を良品として選抜する、請求項20に記載の製造方法。

[請求項22] 前記指標値が、 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンドを、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 、 A_6 、 A_7 及び A_8 の8つの正規分布に波形分離し、 A_4 及び A_5 の面積の総和を A_2 、 A_3 及び A_8 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記抗体由来の赤外吸収バンドの面積と、前記8つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 A_1 （ピーク位置 1692 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_2 （ピーク位置 1682 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_3 （ピーク位置 1670 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_4 （ピーク位置 1658 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_5 （ピーク位置 1648 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_6 （ピーク位置 1638 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）、 A_7 （ピーク位置 1629 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）及び A_8 （ピーク位置 1619 cm^{-1} 、半値幅 19 cm^{-1} ）の8つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.98以上となる

抗体を良品として選抜する、請求項20に記載の製造方法。

[請求項23] 前記指標値が、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れる抗体由来の赤外吸収バンドを、 B_1 、 B_2 及び B_3 の3つの正規分布に波形分離し、 B_2 の面積を B_1 及び B_3 の面積の総和で割った値であり、

前記波形分離は、前記抗体由来の赤外吸収バンドの面積と、前記3つの正規分布の面積の総和との差の絶対値が最小となるように、 B_1 （ピーク位置 1570 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）、 B_2 （ピーク位置 1545 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）及び B_3 （ピーク位置 1518 cm^{-1} 、半値幅 31 cm^{-1} ）の3つの正規分布に波形分離するものであり、

前記選抜するステップにおいて、前記指標値が0.85以上となる抗体を良品として選抜する、請求項20に記載の製造方法。

[請求項24] 前記赤外吸収スペクトルが、減衰全反射法により測定されたものである、請求項1～23のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項25] リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼから、リパーゼ活性の一部又は全部が再生された再生固定化リパーゼを製造する製造方法であって、

固定化リパーゼは、樹脂担体にリパーゼが固定化されたものであり、

前記リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼの赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近又は $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるリパーゼ由来の赤外吸収バンドを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、

前記正規分布に基づいて前記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、

前記指標値を予め設定された閾値と比較し、前記閾値よりも前記赤外吸収バンドの広がり具合が小さい前記リパーゼ活性が減少した固定化リパーゼをリパーゼ活性が再生する可能性のあるものとして選

抜するステップと、を含む選抜工程を備える、再生固定化リパーゼの製造方法。

[請求項26] タンパク質の赤外吸収スペクトルにおいて、 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 付近又は $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 付近に現れるタンパク質由来の赤外吸収バンドを、1又は複数の正規分布に近似するステップと、

前記正規分布に基づいて前記赤外吸収バンドの広がり具合を示す指標値を算出するステップと、

前記指標値を予め設定された閾値と比較し、前記閾値よりも前記赤外吸収バンドの広がり具合が小さいタンパク質を活性のあるタンパク質と評価するステップと、を含む評価工程を備える、タンパク質活性評価方法。

[請求項27] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを単一の正規分布で近似したときの当該正規分布の半値幅である、請求項26に記載のタンパク質活性評価方法。

[請求項28] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを複数の正規分布に波形分離し、前記赤外吸収バンドのピークトップ位置付近の1又は複数の正規分布の面積の総和を、前記赤外吸収バンドの端付近の1又は複数の正規分布の面積の総和で割った値である、請求項26に記載のタンパク質活性評価方法。

[請求項29] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを、いずれも前記赤外吸収バンドのピークトップ位置付近に頂点を有し、かつ、互いに異なる半値幅を有する2つの正規分布に波形分離し、前記2つの正規分布のうち半値幅が小さい方の正規分布の面積を、半値幅が大きい方の正規分布の面積で割った値である、請求項26に記載のタンパク質活性評価方法。

[請求項30] 前記指標値が、前記赤外吸収バンドを $A_1 \sim A_n$ の n 個（ n は3以上の整数）の正規分布に波形分離し、

前記 n が偶数のとき、 $A_{n/2}$ 及び $A_{n/2+1}$ の少なくとも一方又は両方の面積の総和を $A_1 \sim A_{n/2-1}$ 及び $A_{n/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値であり、

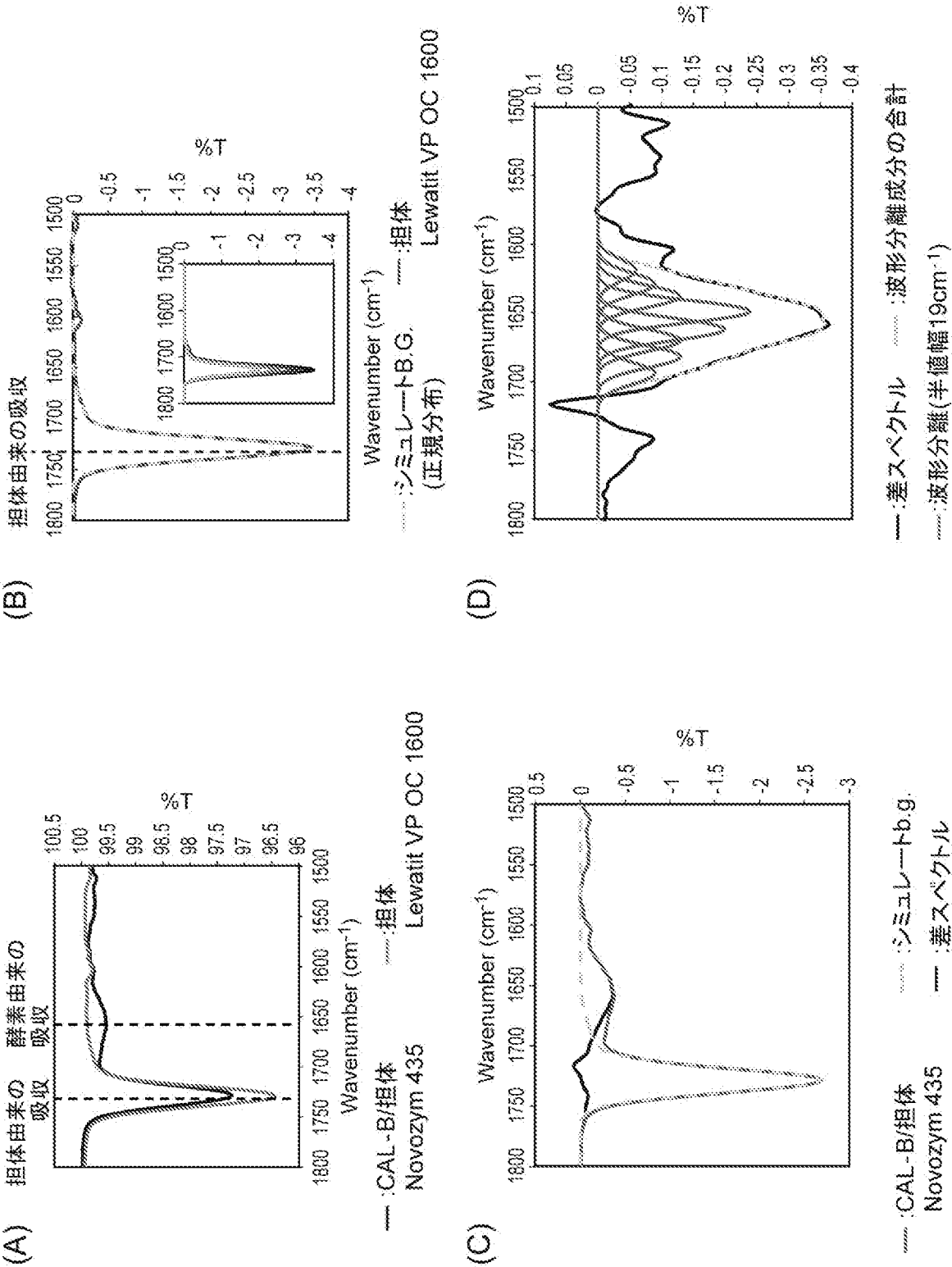
前記 n が奇数のとき、 $A_{(n+1)/2}$ の面積を $A_1 \sim A_{(n+1)/2-1}$ 及び $A_{(n-1)/2+2} \sim A_n$ からなる群より選択される少なくとも一つの面積の総和で割った値である、請求項 26 に記載のタンパク質活性評価方法。

[請求項31] 前記タンパク質が、樹脂担体にリパーゼが固定化されてなる固定化リパーゼである、請求項 26～30 のいずれか一項に記載のタンパク質活性評価方法。

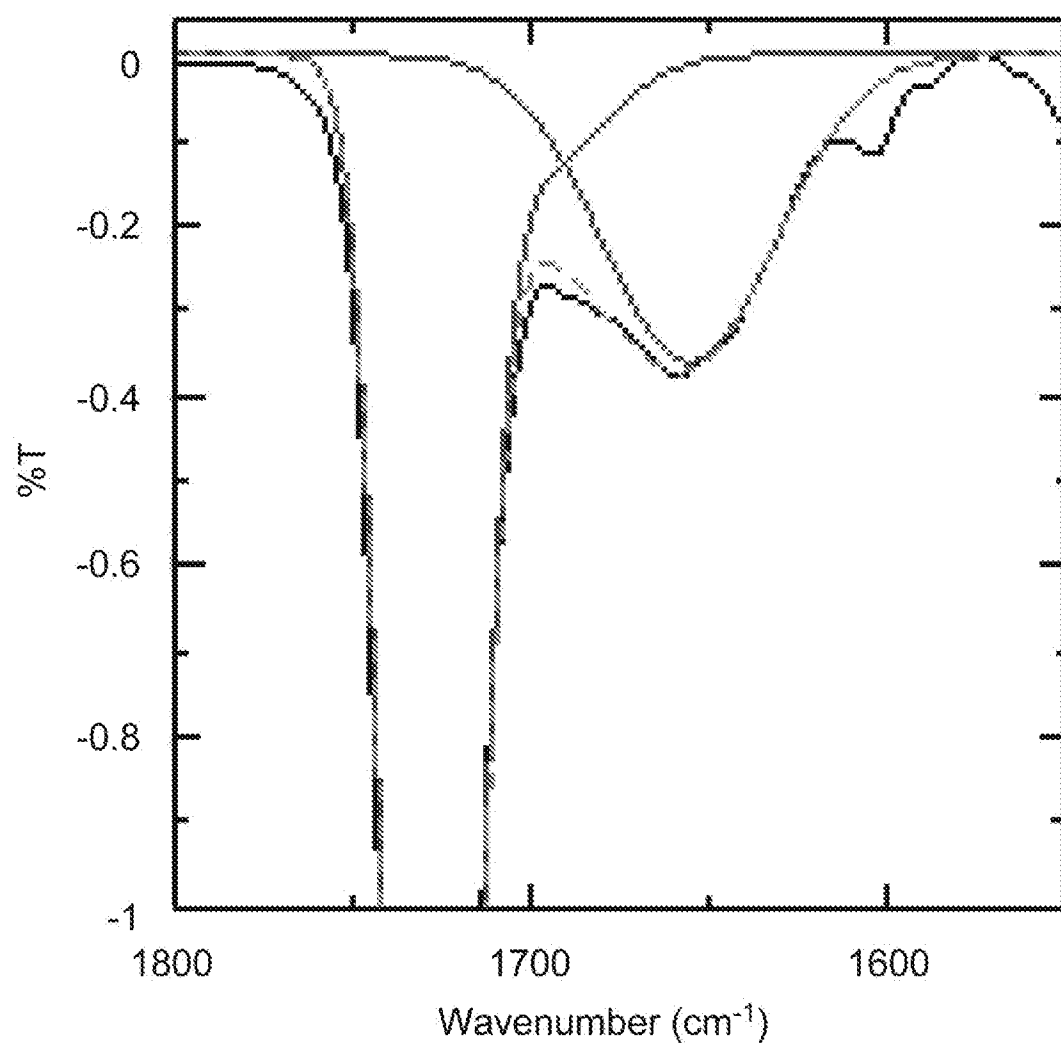
[請求項32] 前記タンパク質が、シリカ担体にペルオキシダーゼが固定化されてなる固定化ペルオキシダーゼである、請求項 26～30 のいずれか一項に記載のタンパク質活性評価方法。

[請求項33] 前記タンパク質が、抗体である、請求項 26～30 のいずれか一項に記載のタンパク質活性評価方法。

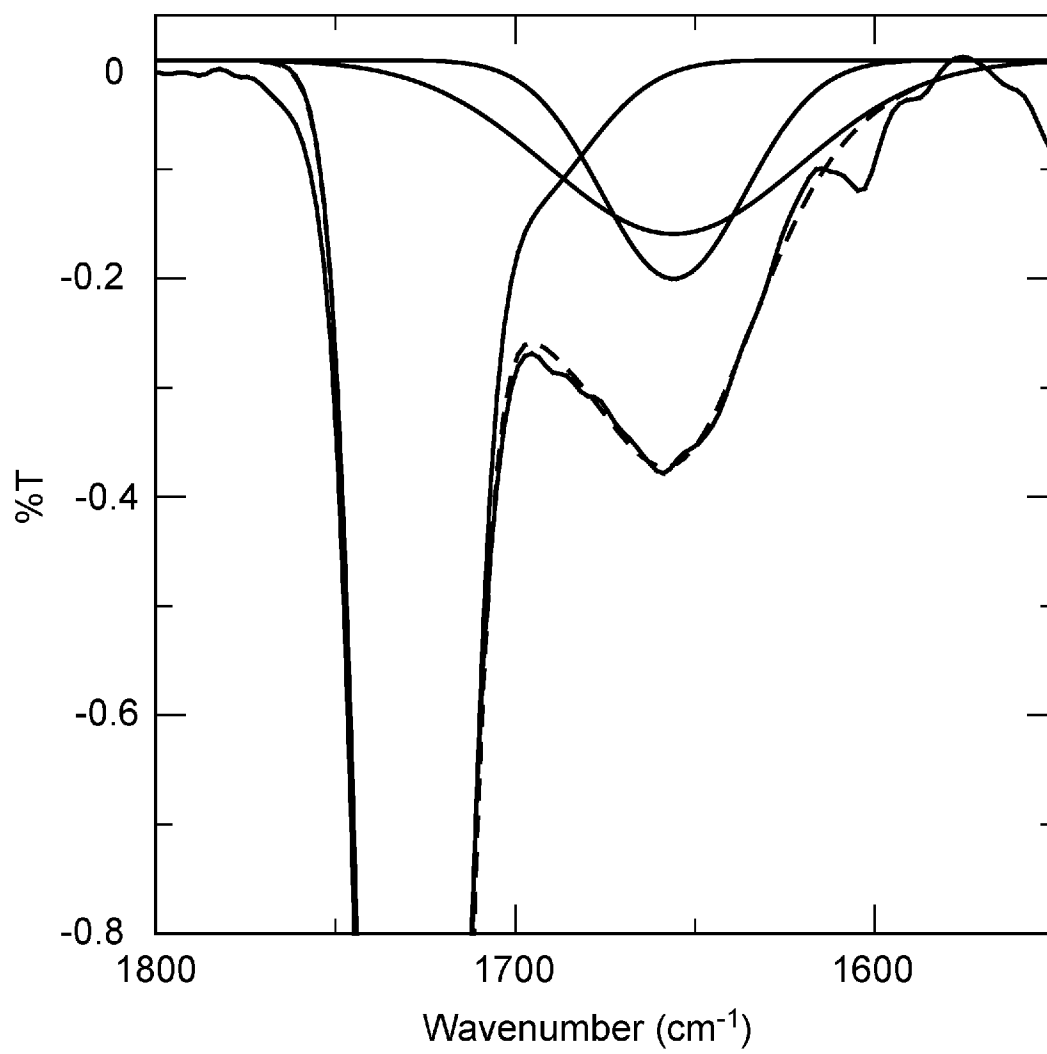
[図1]



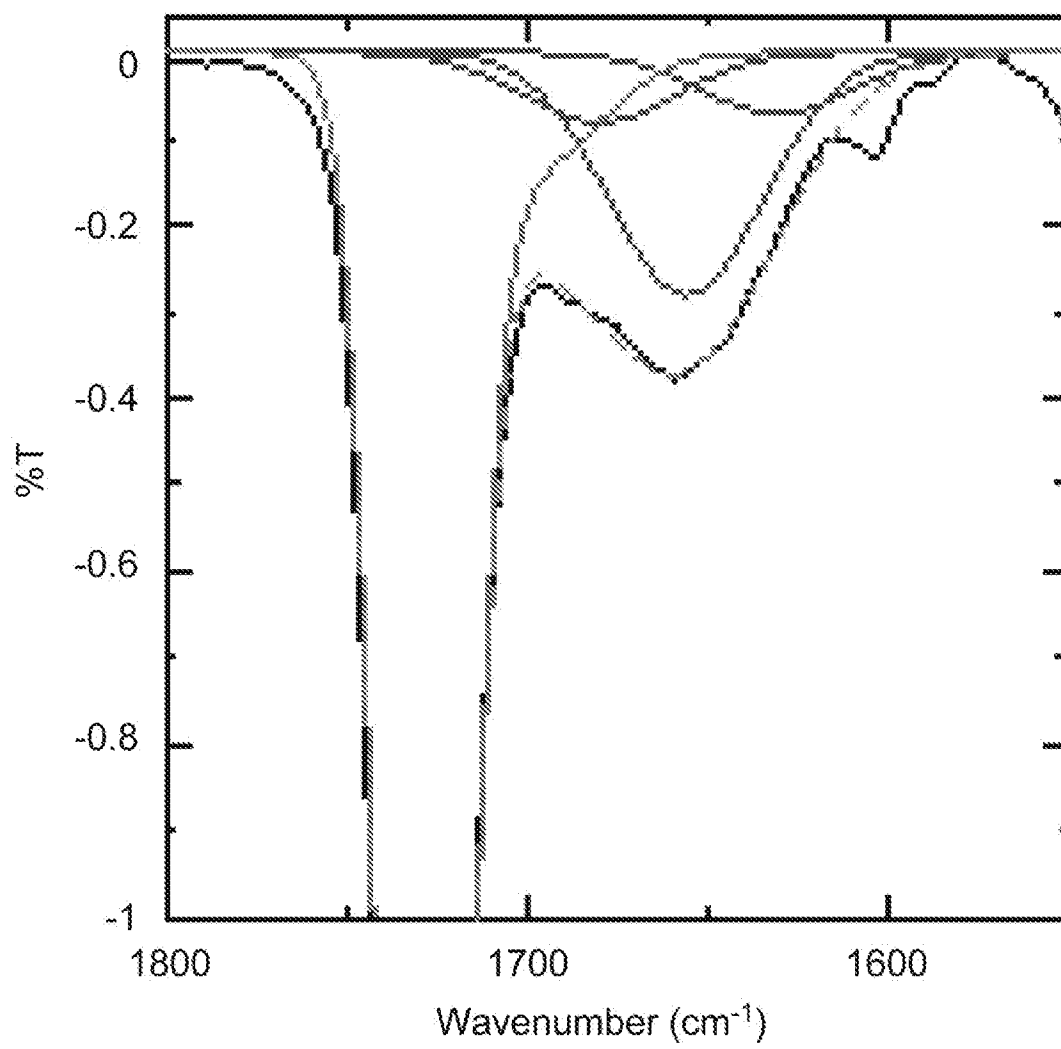
[図2]



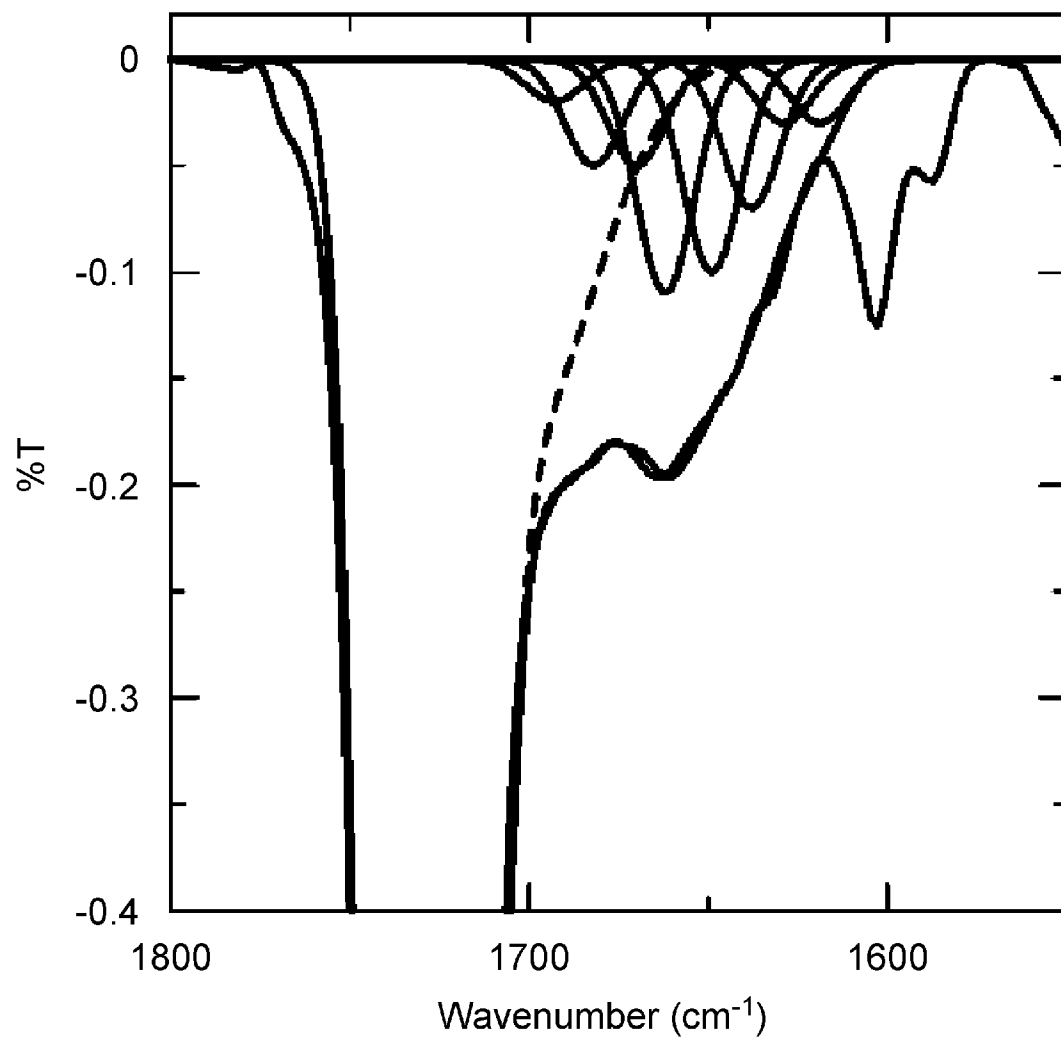
[図3]



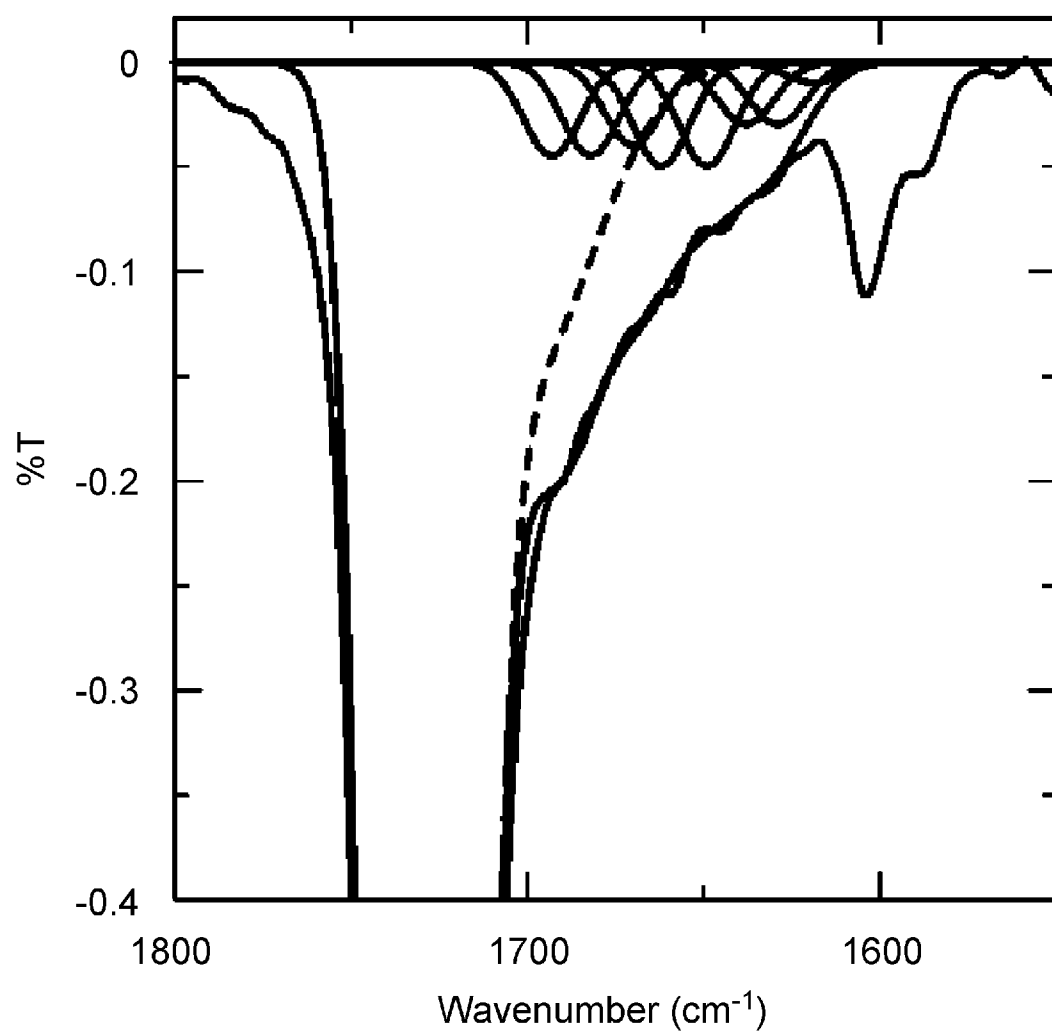
[図4]



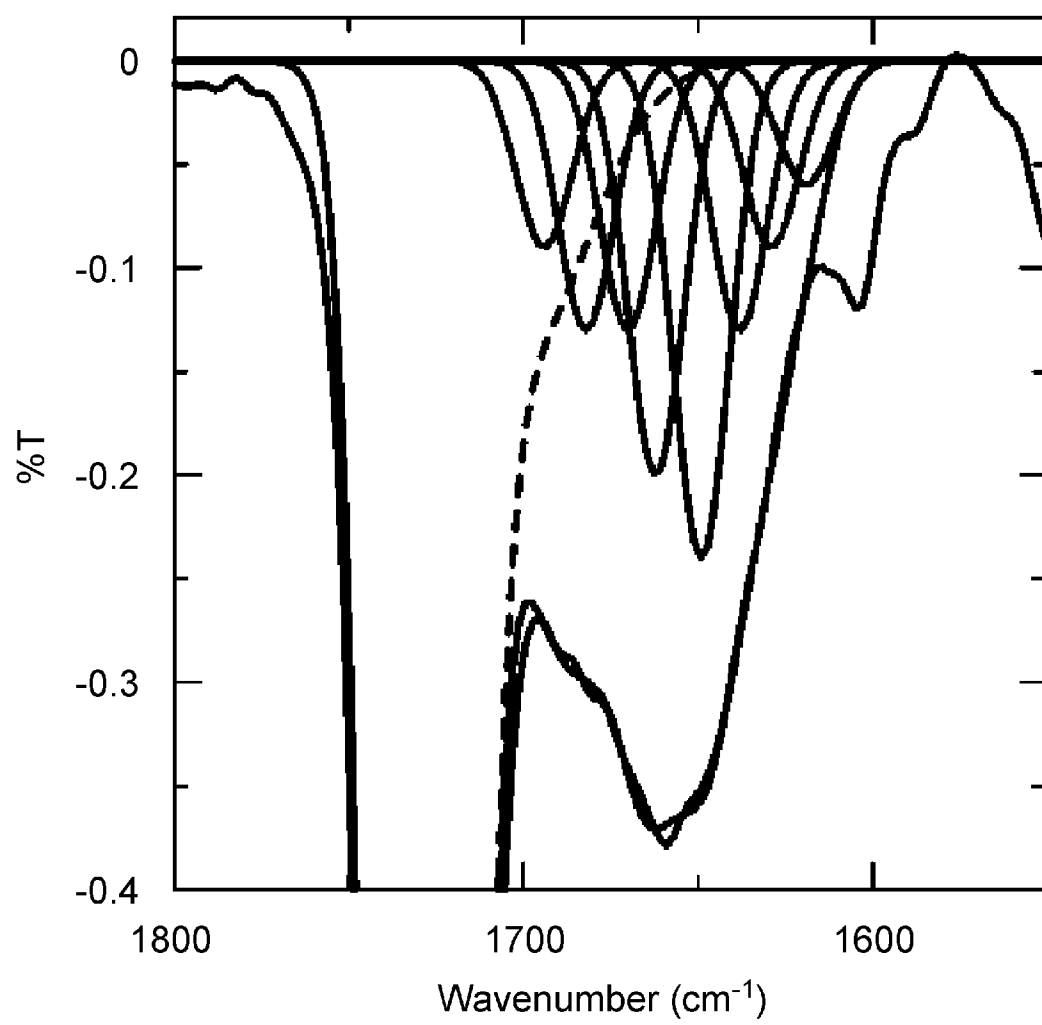
[図5]



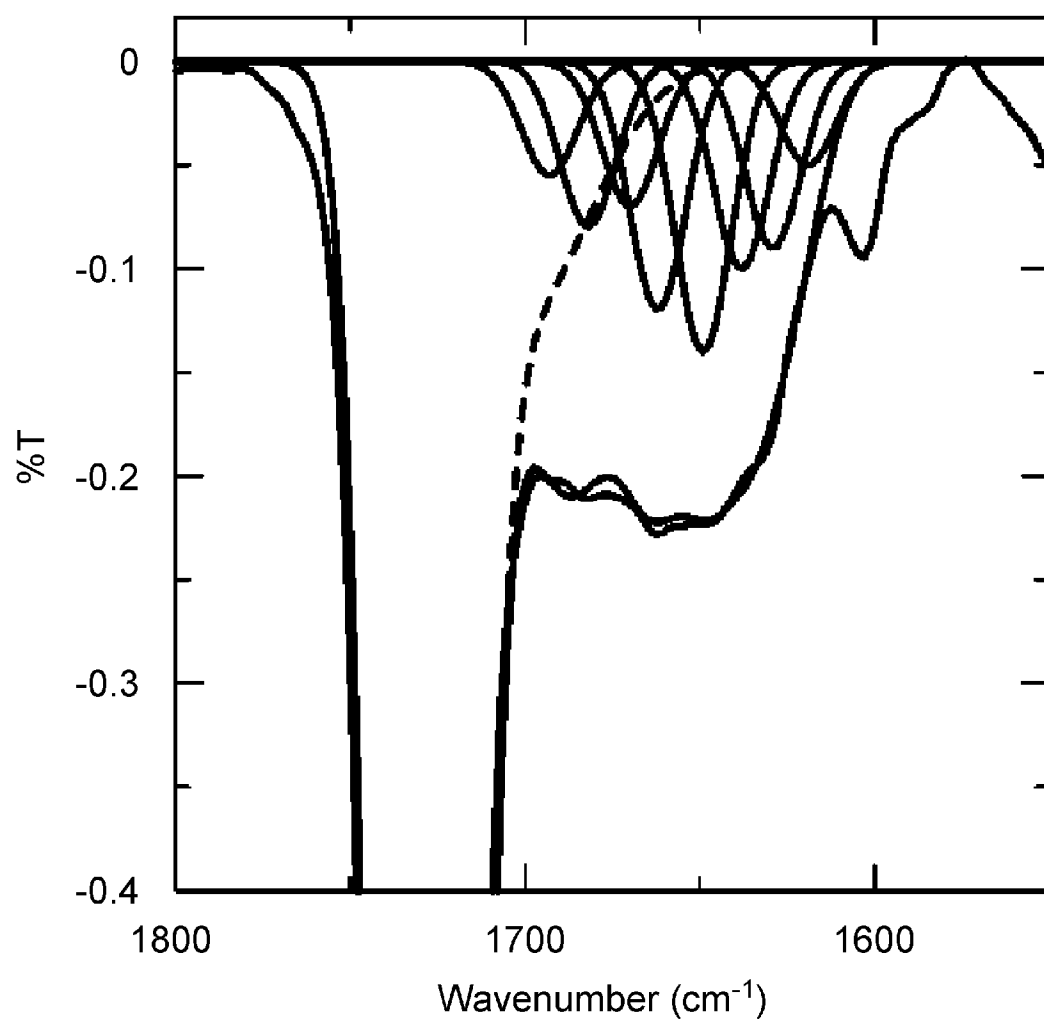
[図6]



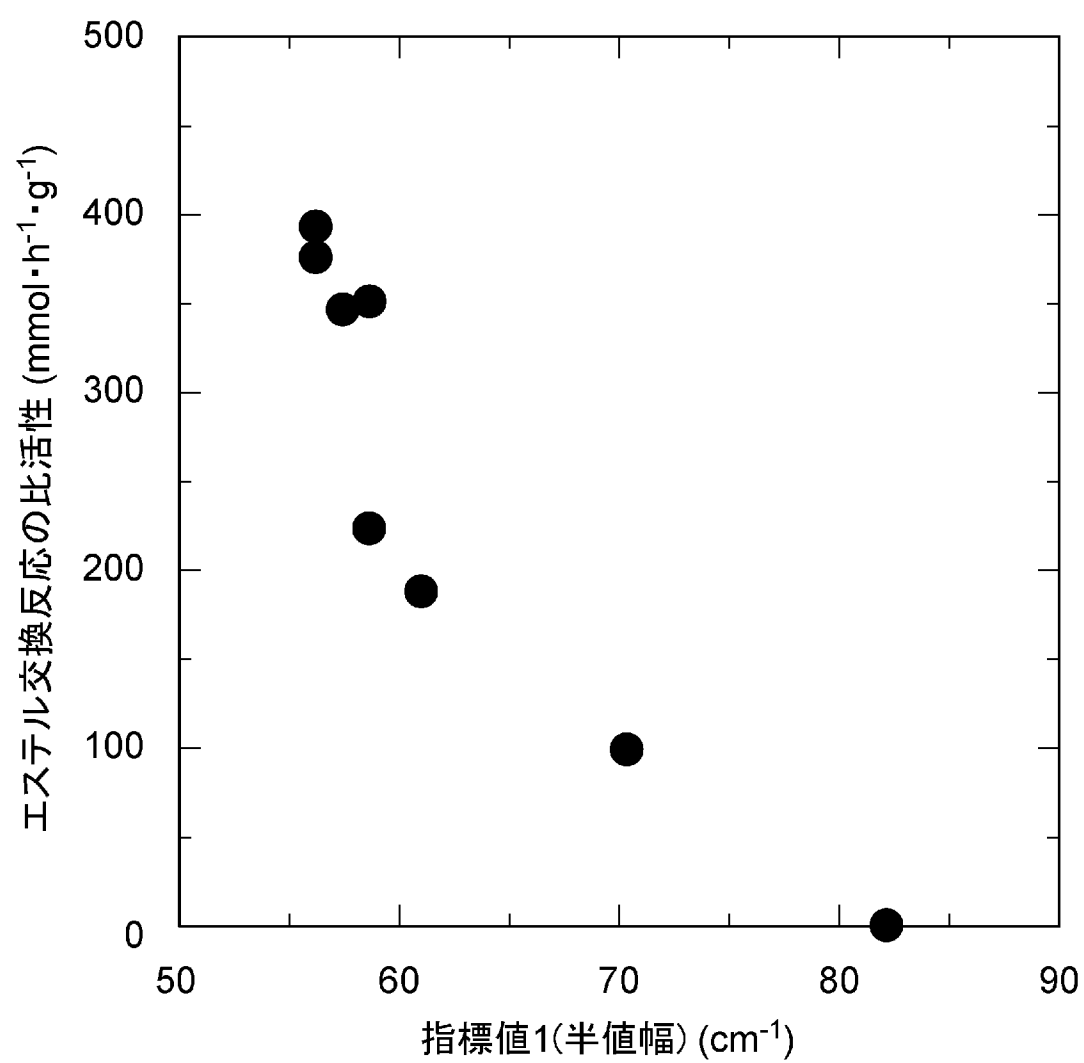
[図7]



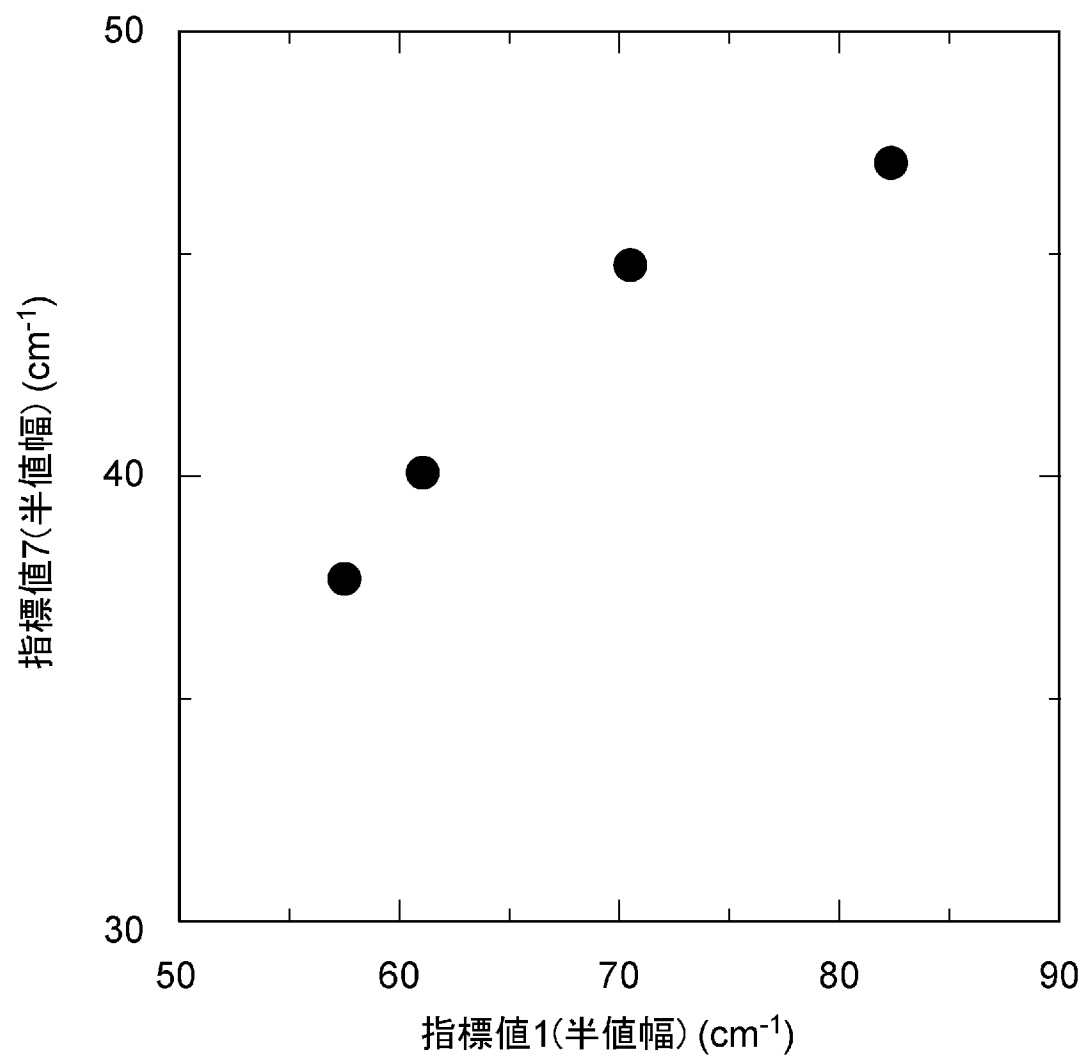
[図8]



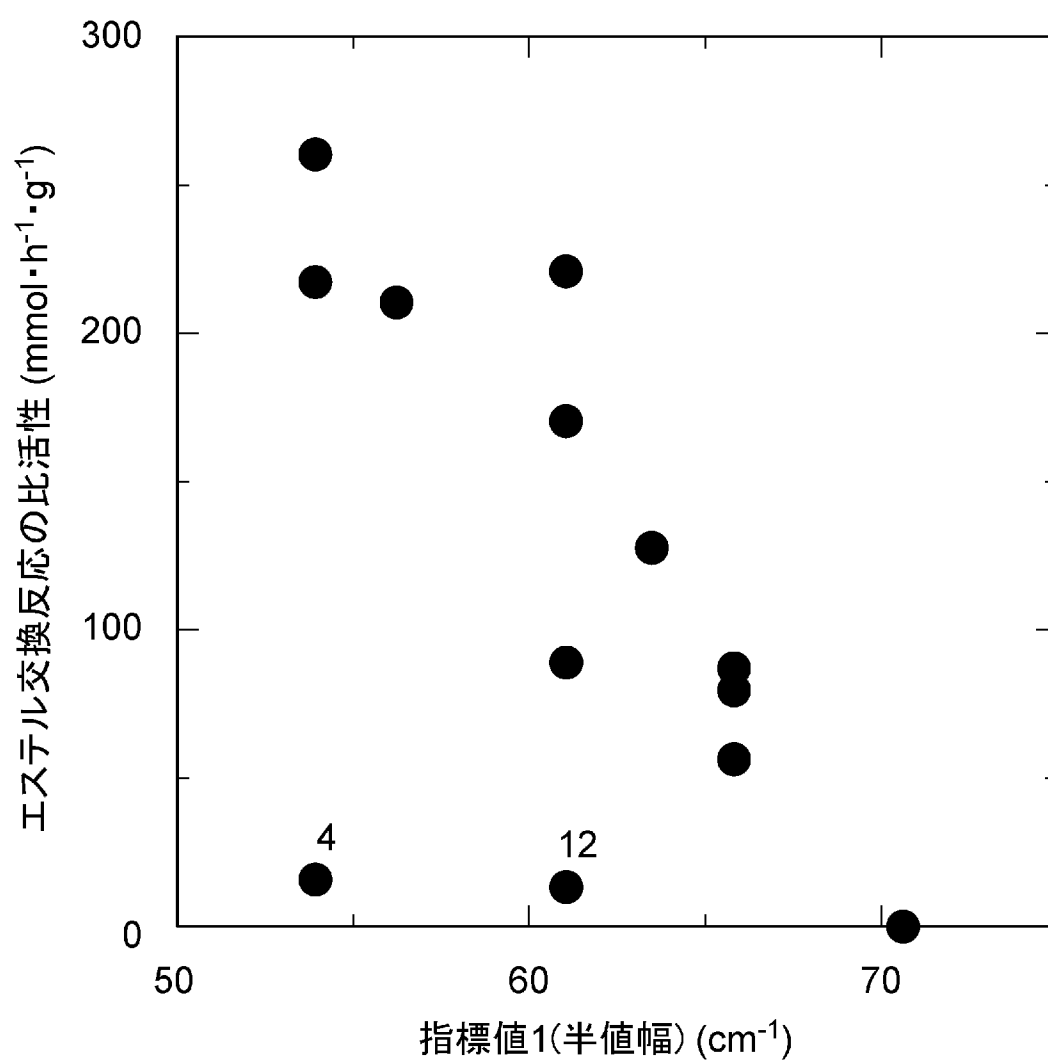
[図9]



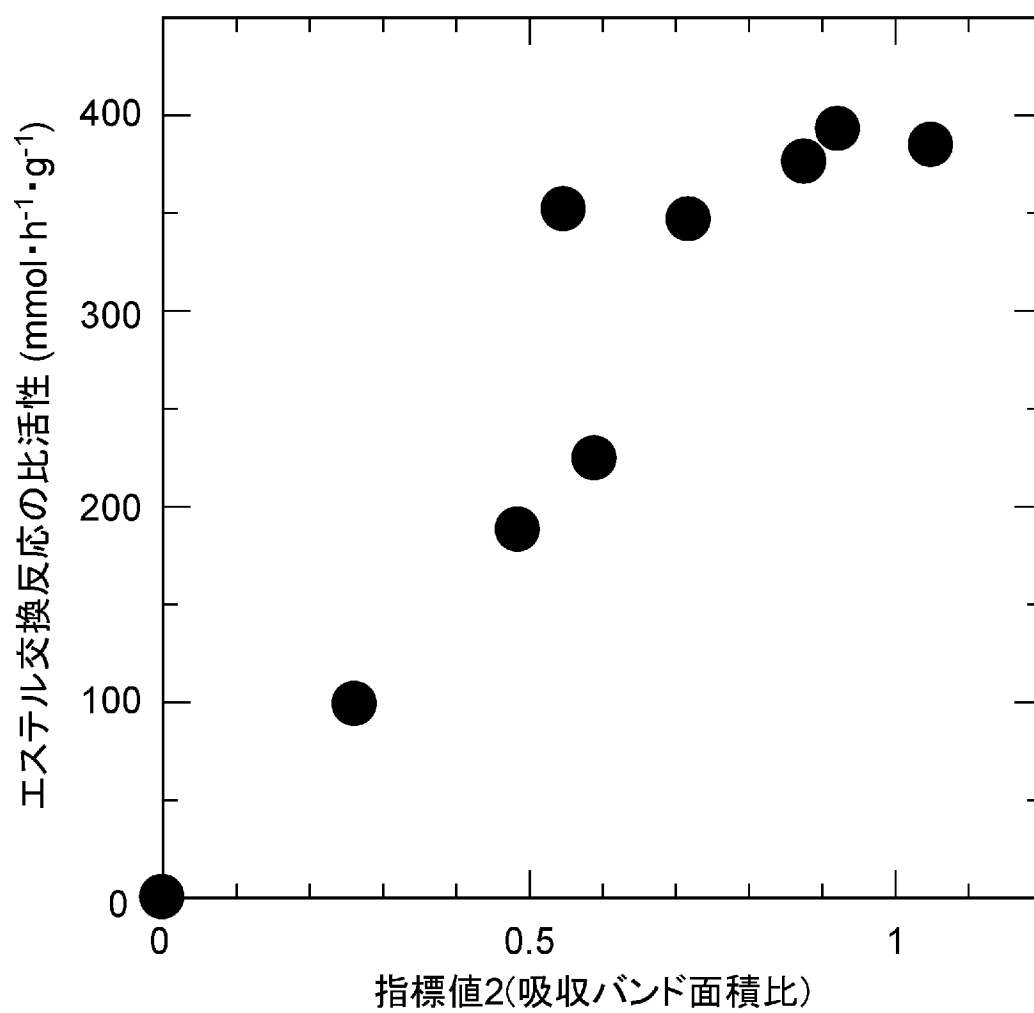
[図10]



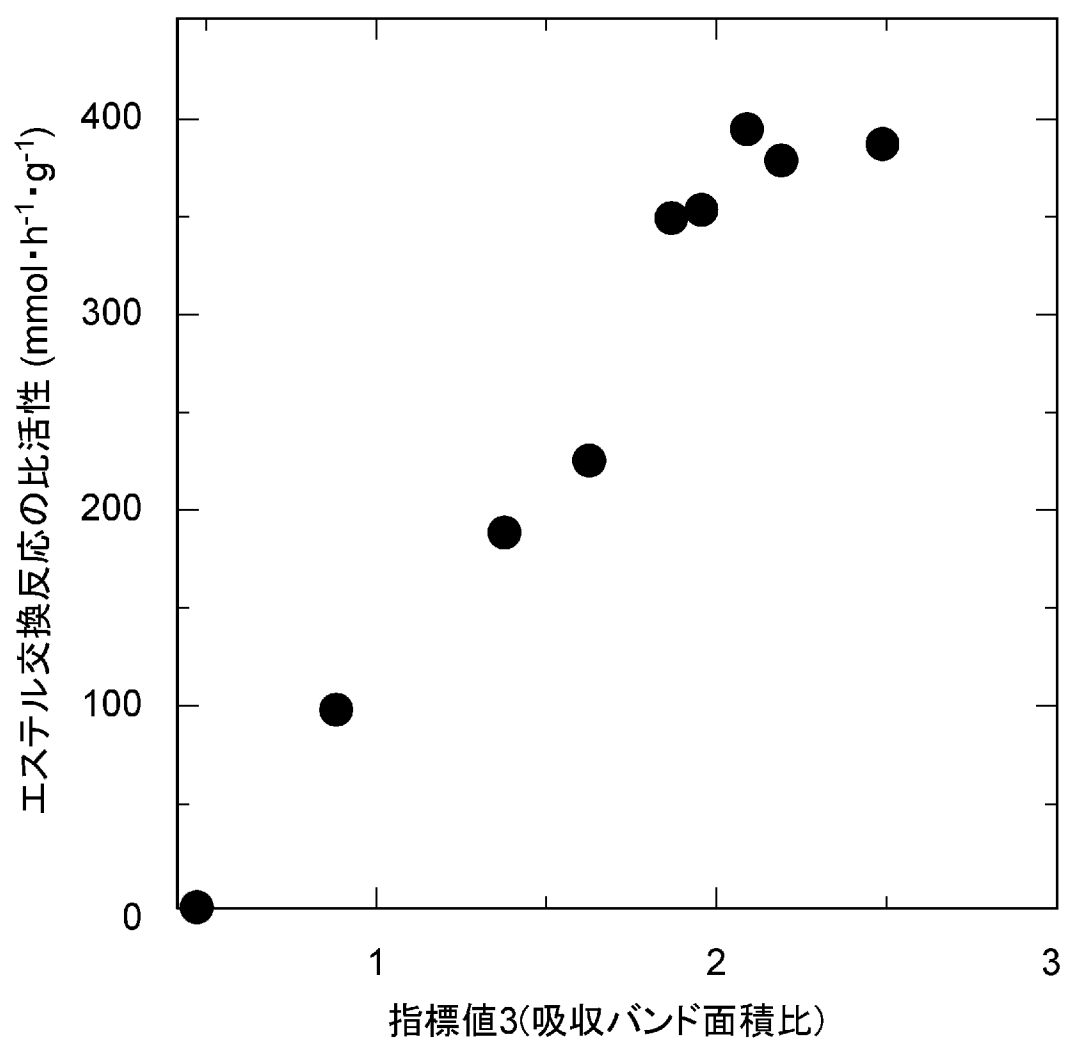
[図11]



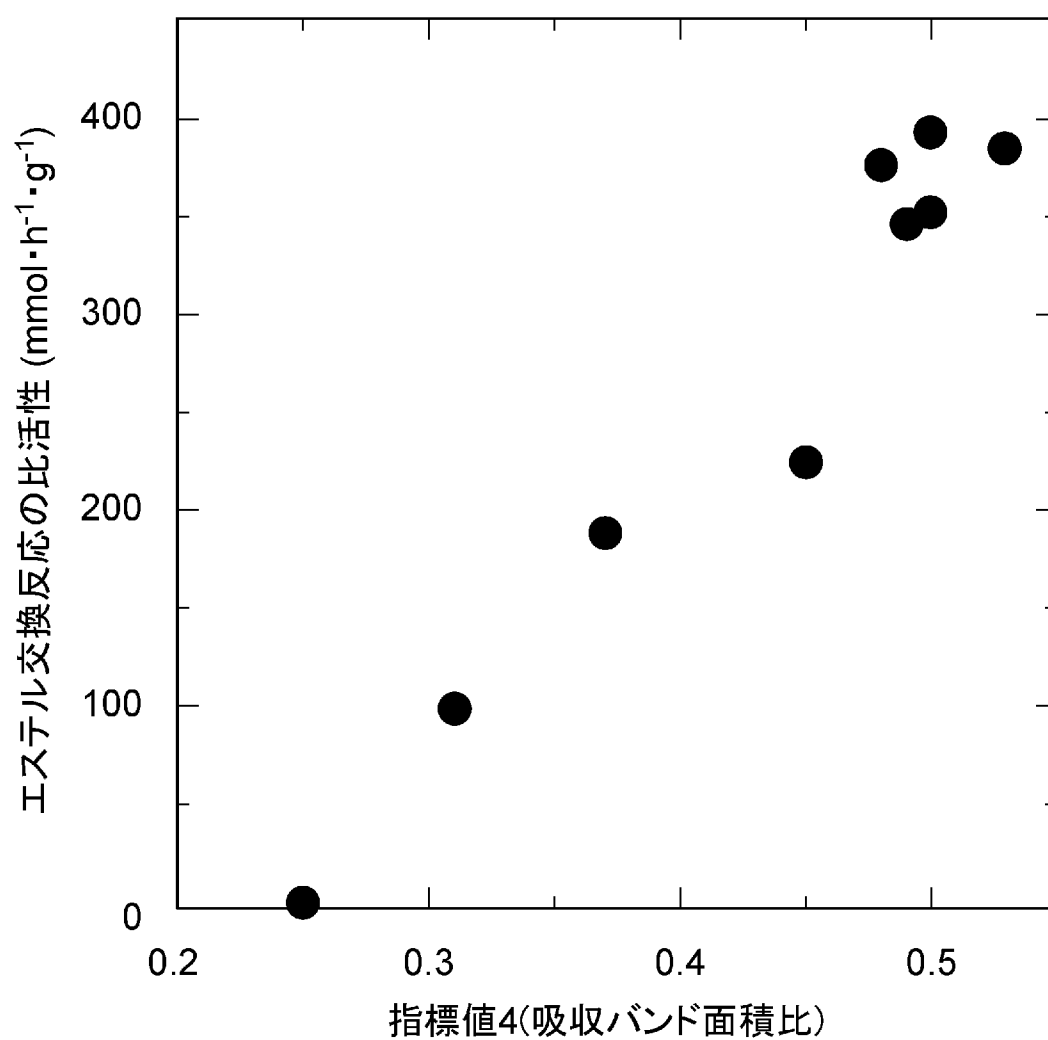
[図12]



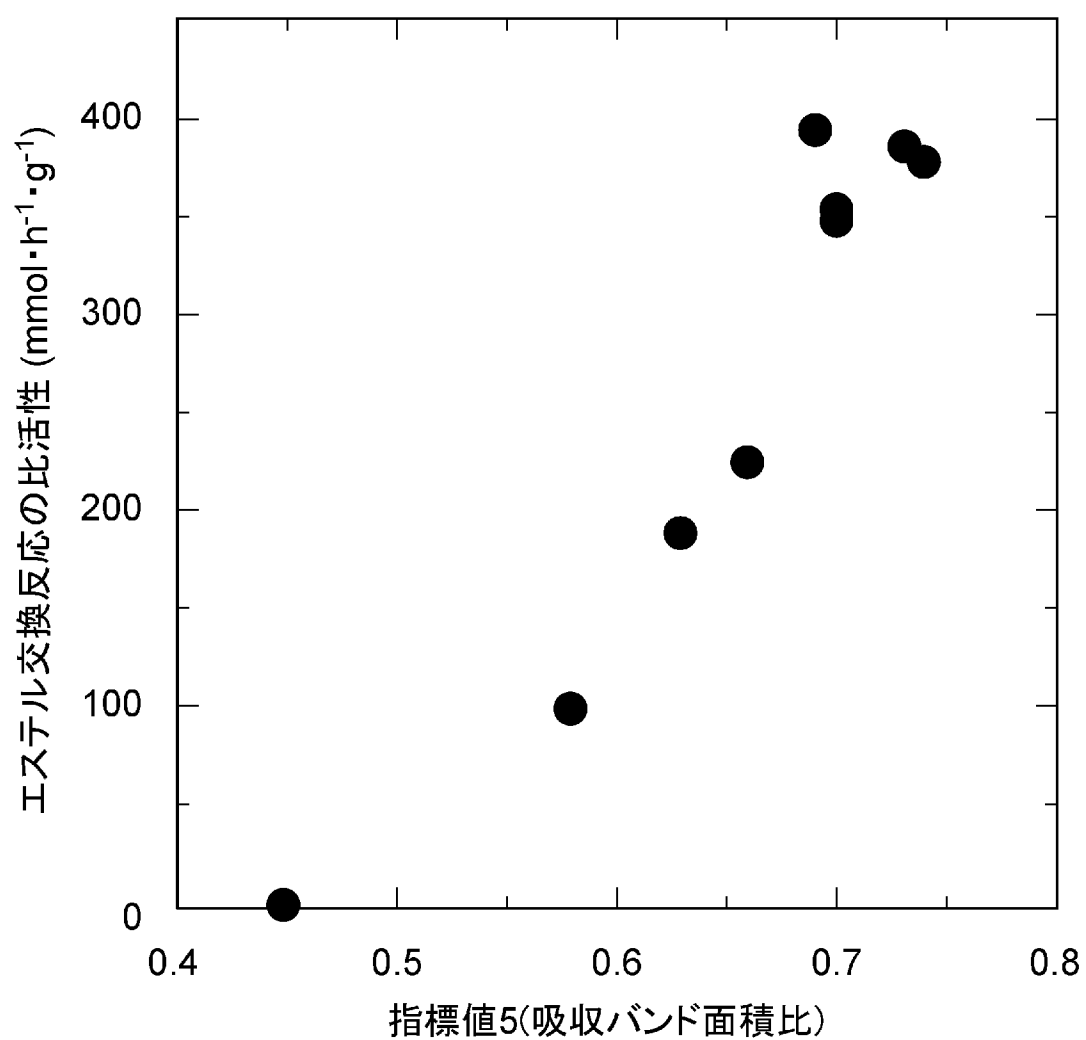
[図13]



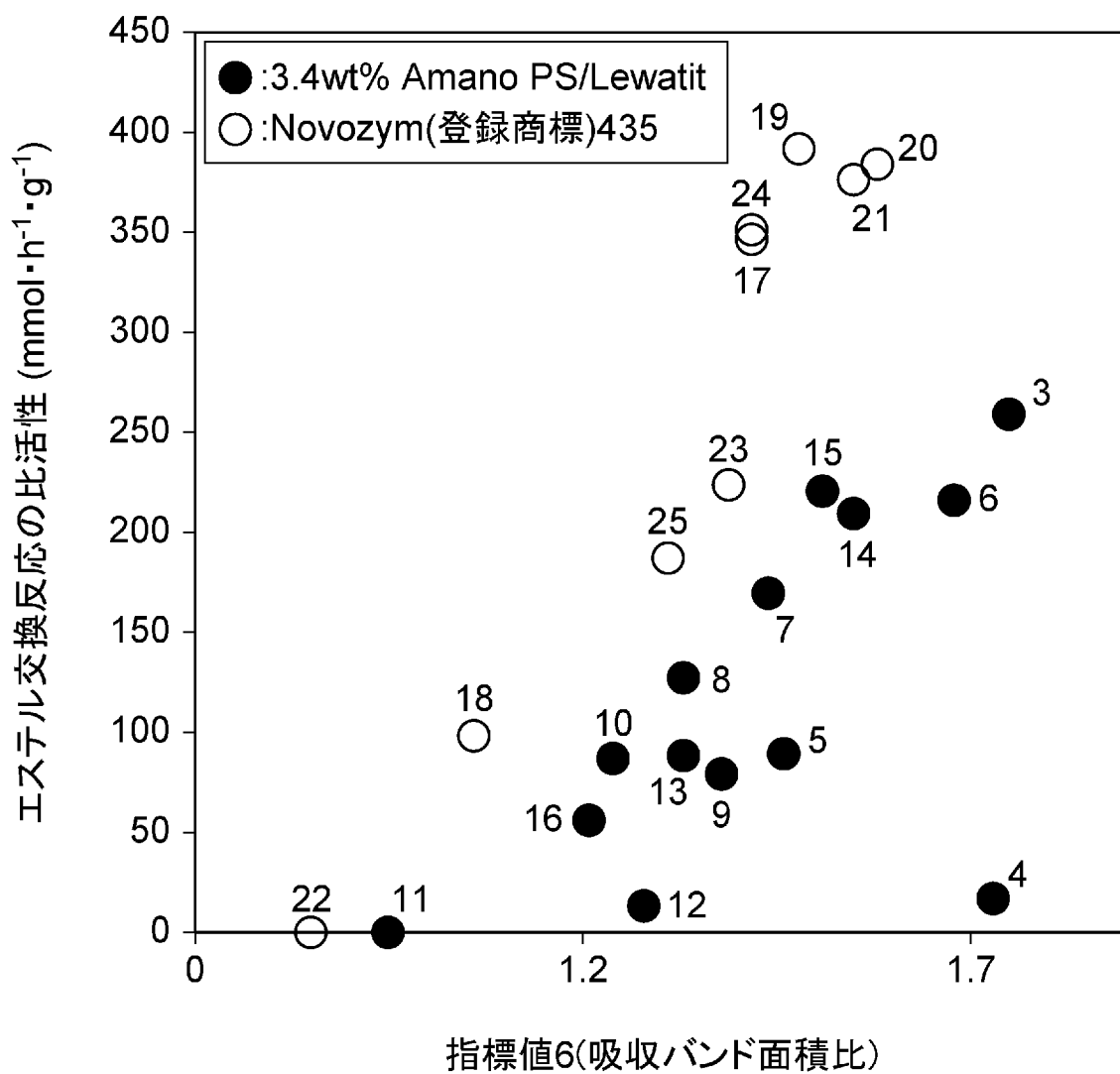
[図14]



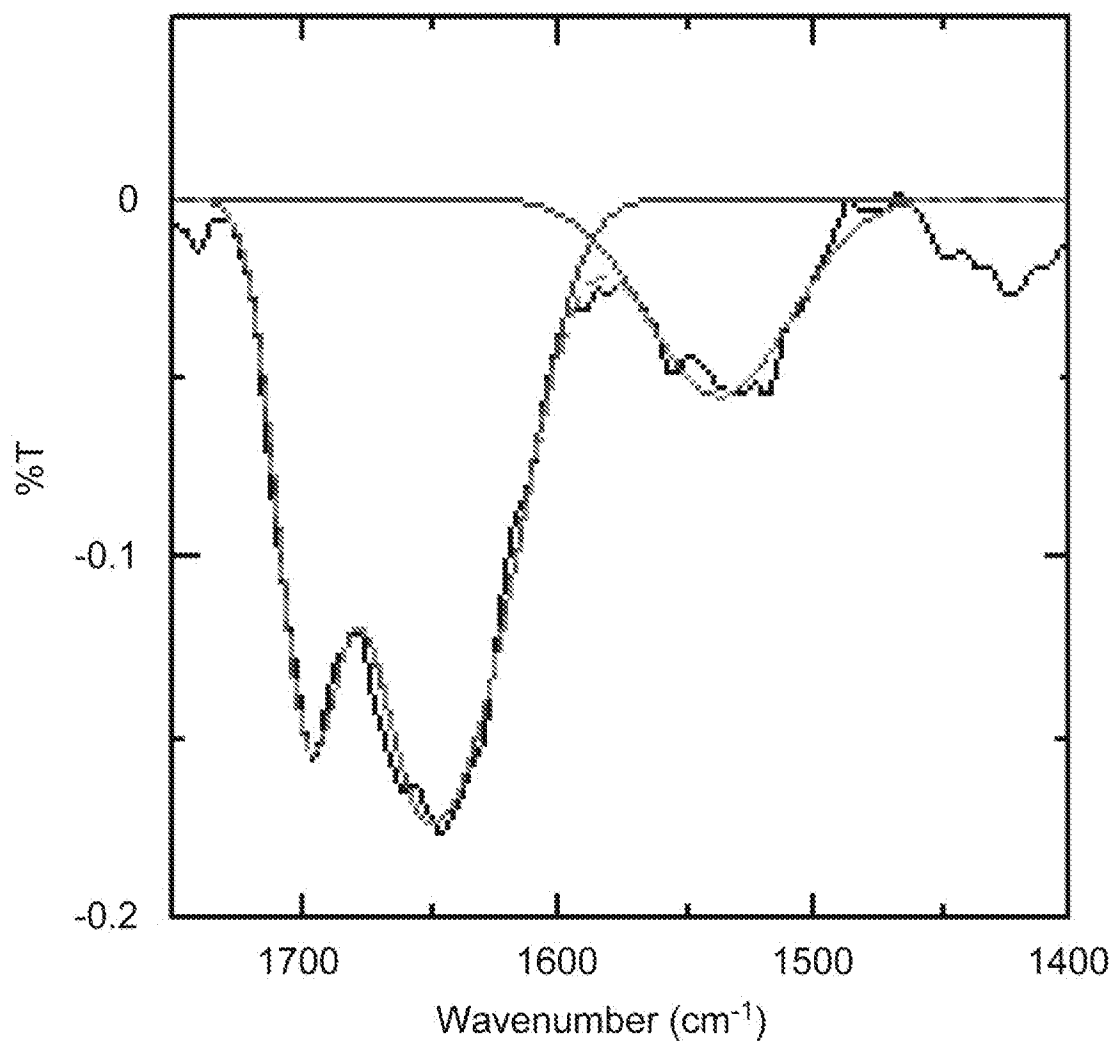
[図15]



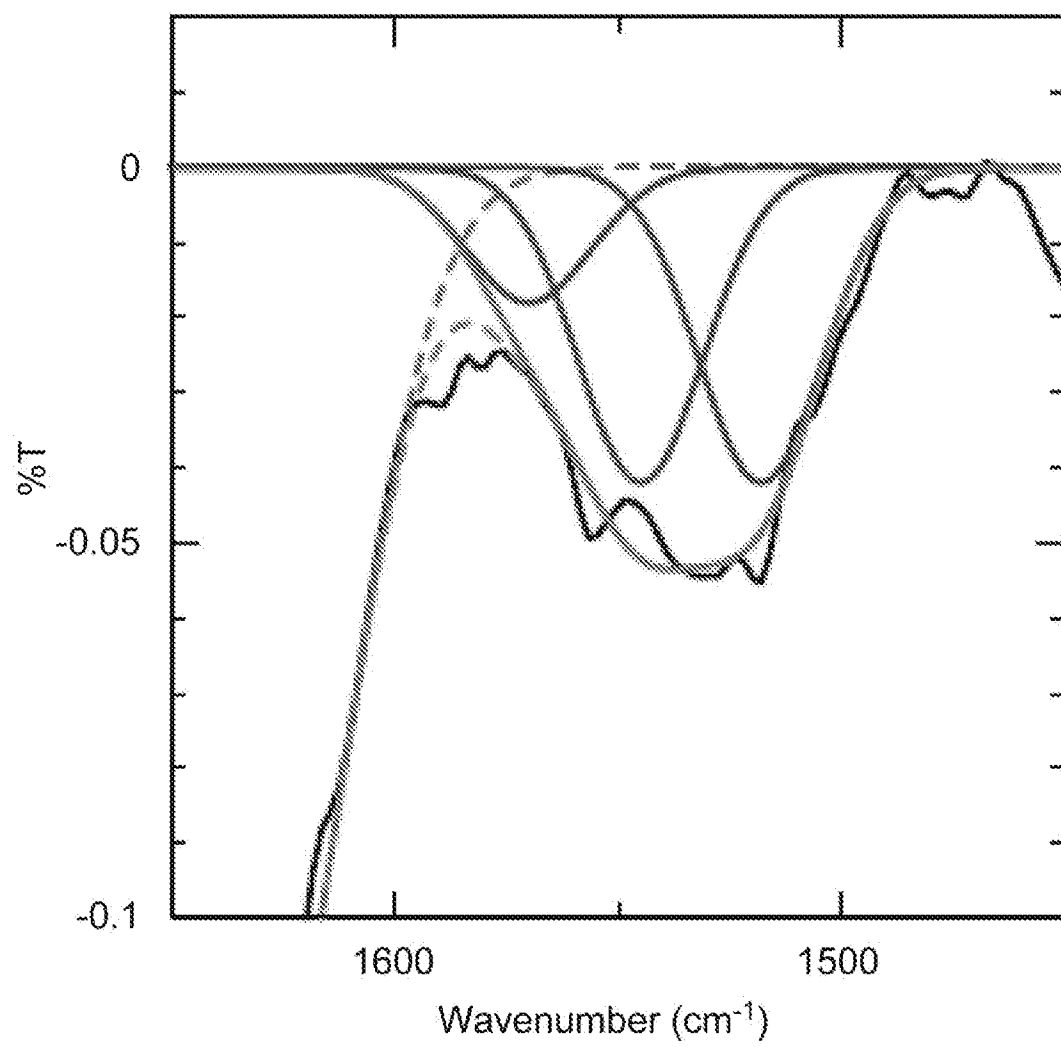
[図16]



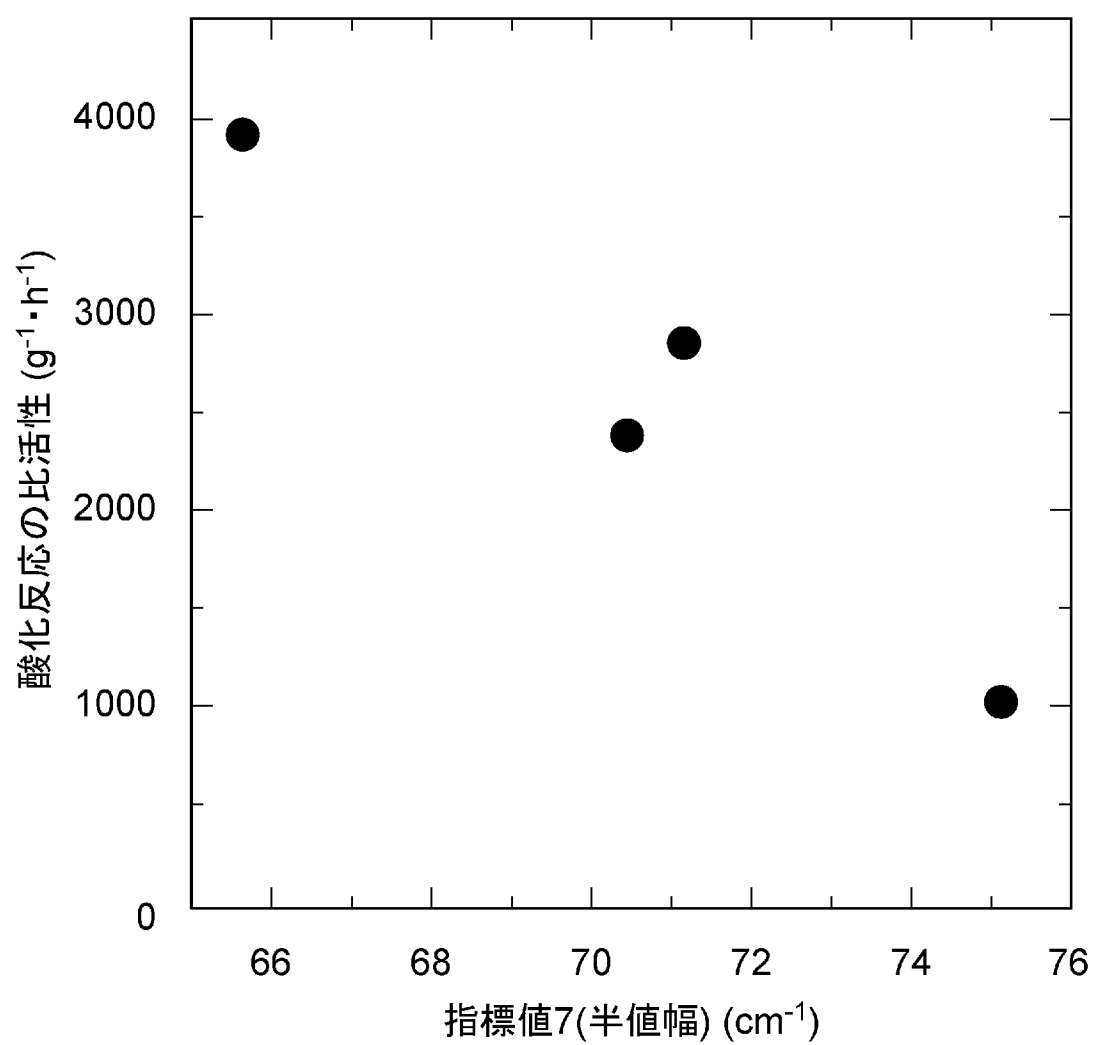
[図17]



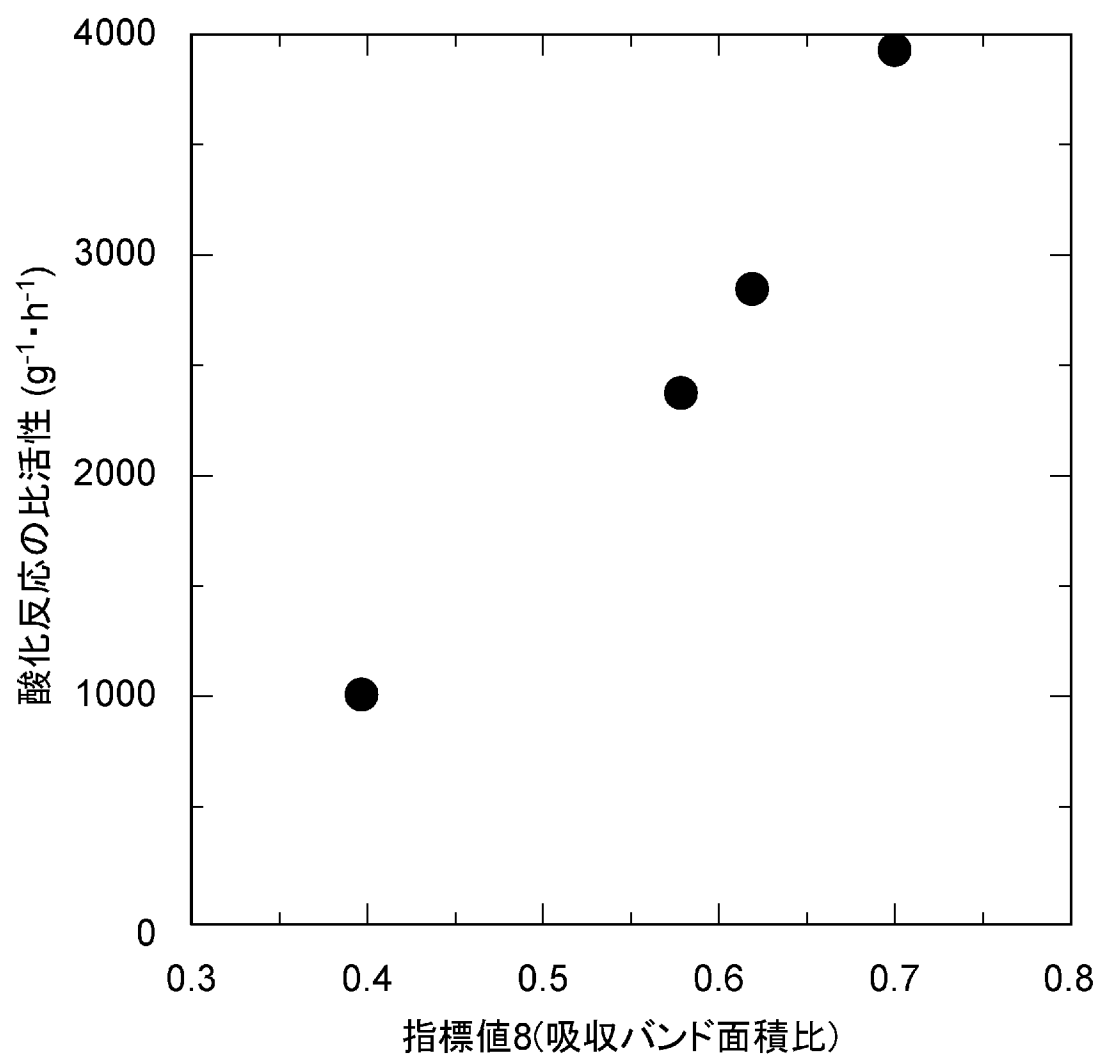
[図18]



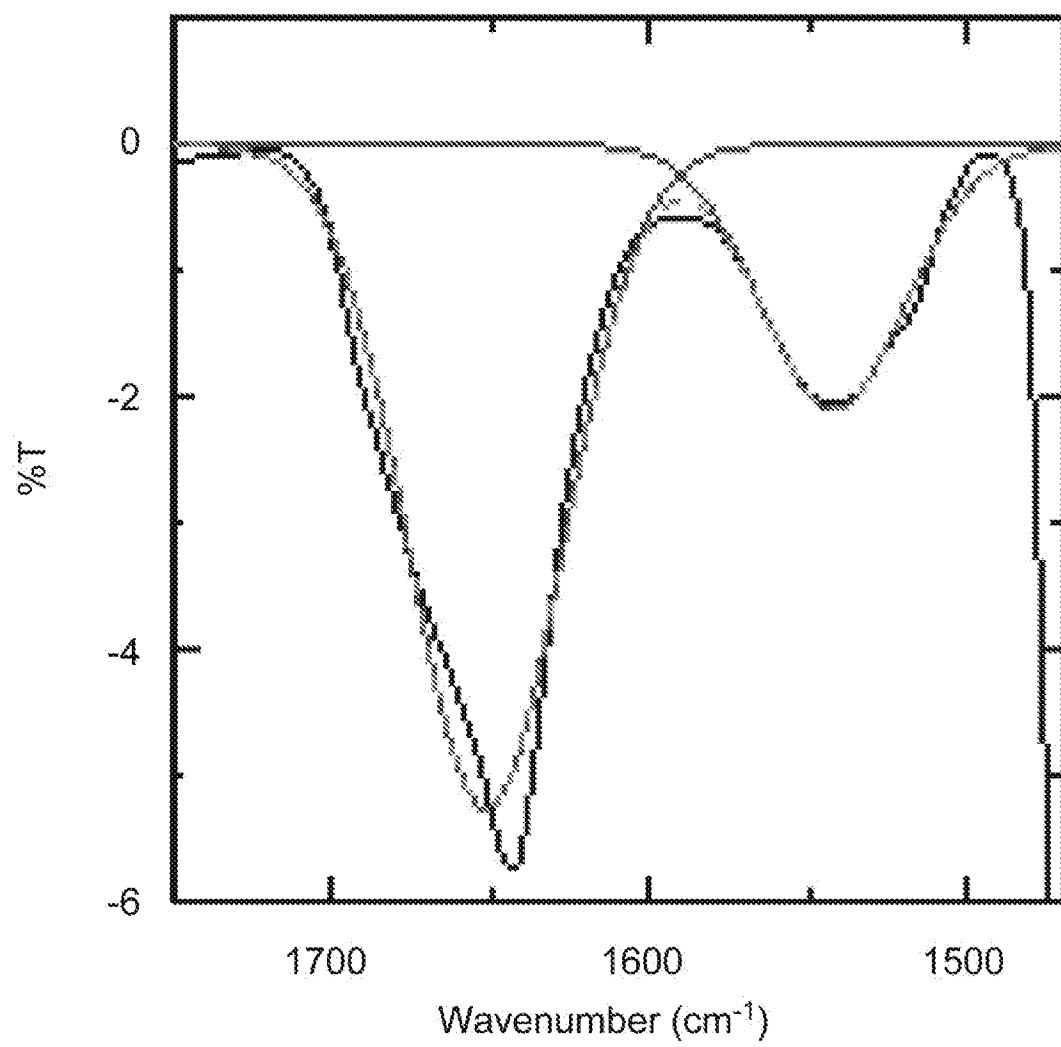
[図19]



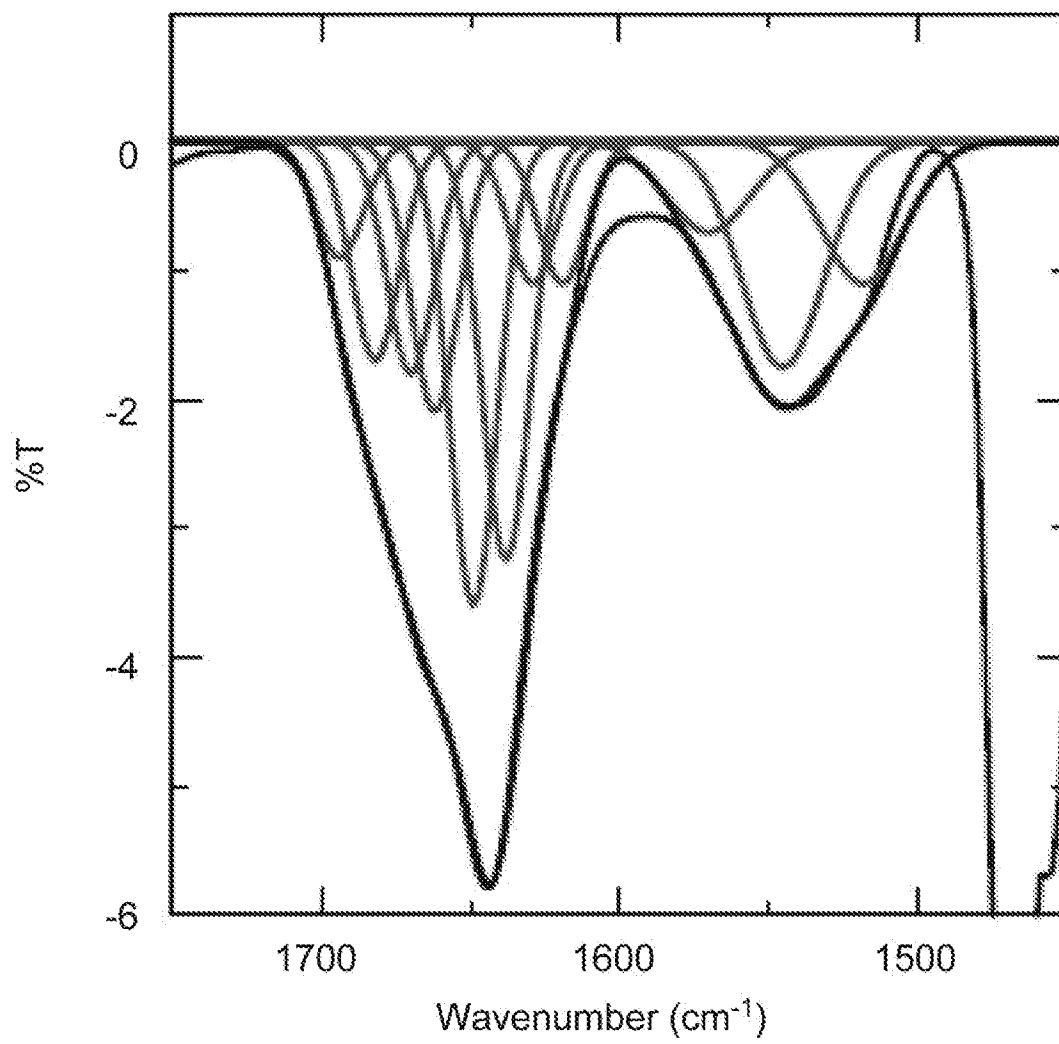
[図20]



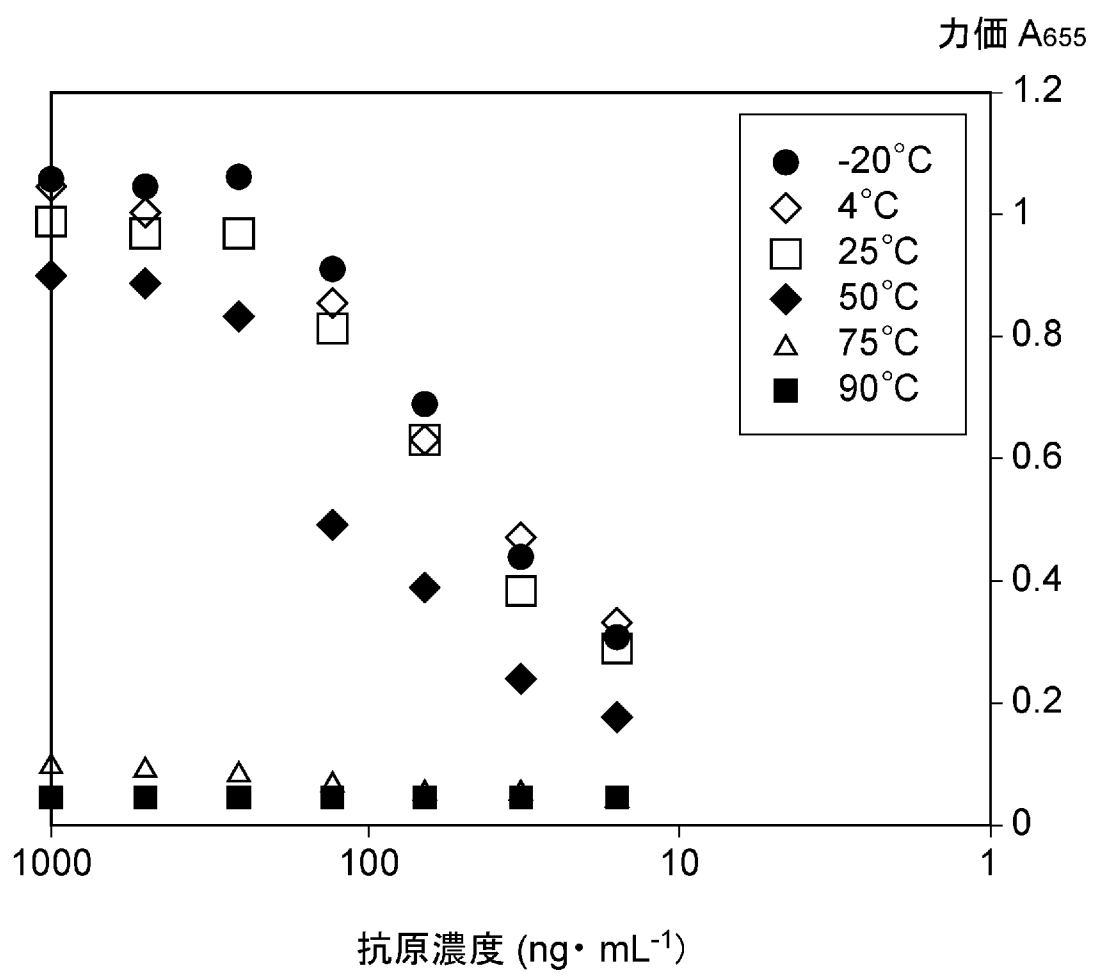
[図21]



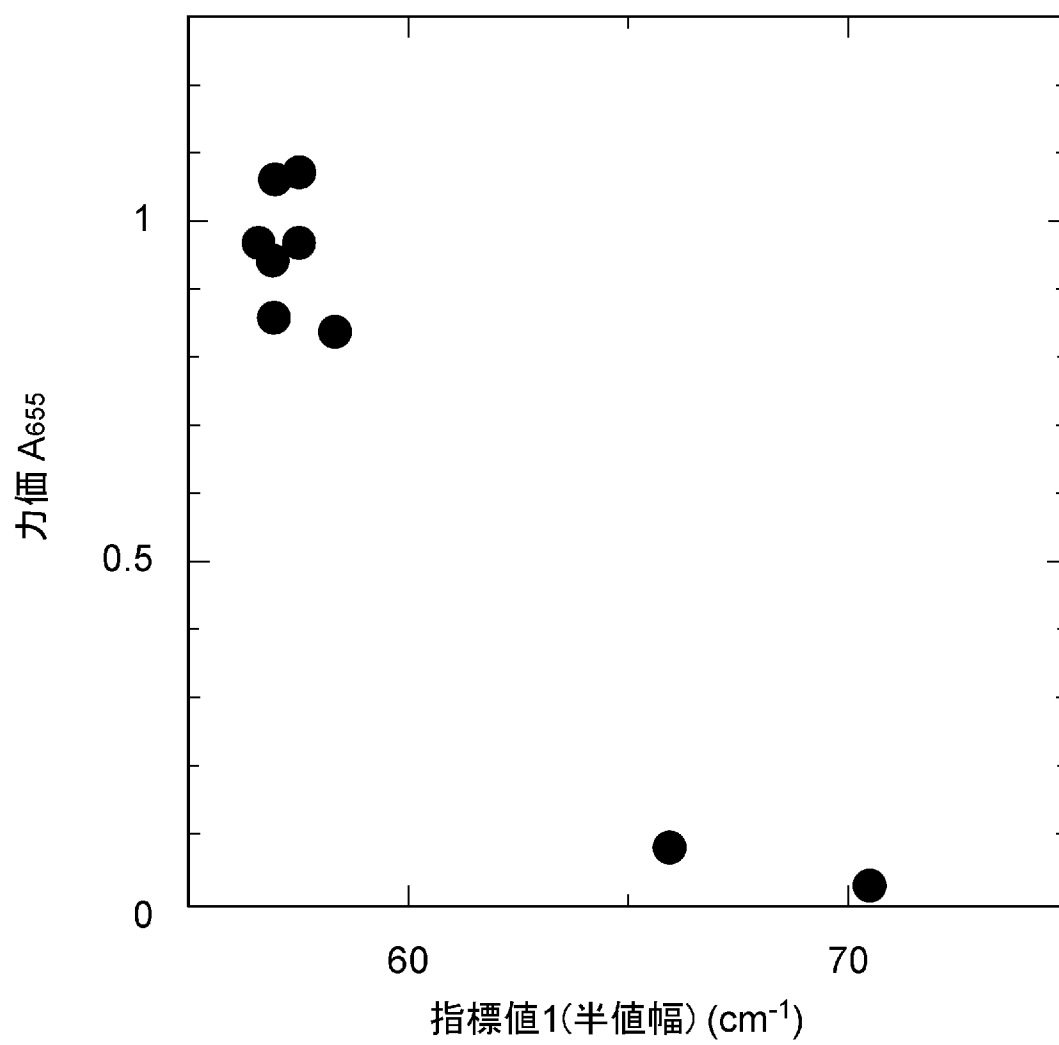
[図22]



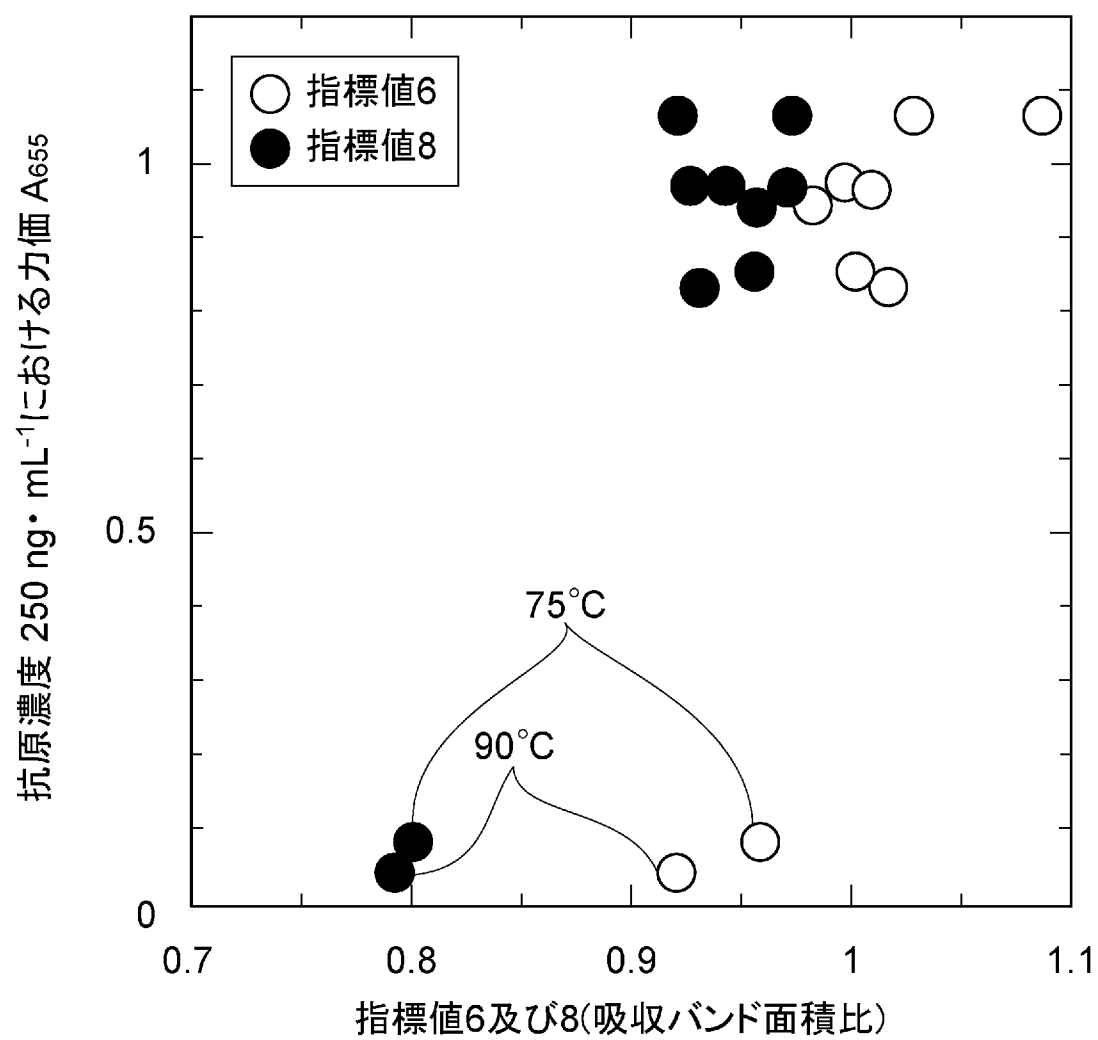
[図23]



[図24]



[図25]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070917

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/35(2014.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N11/00(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/35, C07K16/00, C07K17/00, C12N11/00, C12P7/62

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Science Direct, Wiley Online Library

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SECUNDO F, CARREA G, Mono- and Disaccharides Enhance the Activity and Enantioselectivity of Burkholderia cepacia Lipase in Organic Solvent but Do Not Significantly Affect its Conformation, BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2005.11.20, VOL. 92, NO. 4, PP. 438-446	1-33
Y	Jin'ichi TOIDA, "Breeding of High Lipase Producing Strain from Aspergillus oryzae and its Usefulness for Miso Fermentation", Journal of the Brewing Society of Japan, 15 July 2011 (15.07.2011), vol.106, no.7, pages 457 to 461	1-33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 October, 2014 (22.10.14)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2014 (04.11.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070917

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-011321 A (Evonik Goldschmidt GmbH), 22 January 2009 (22.01.2009), paragraphs [0051] to [0058] & US 2009/0017519 A1 & EP 2011865 A1 & DE 102007031689 A & AT 439434 T & DK 2011865 T & ES 2330594 T & CN 102517273 A & CA 2636903 A1	6-16, 24, 31
Y	FORESTI M L, et.al., FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from Candida antarctica immobilized onto titania at selected conditions, Applied Surface Science, 2010.01.01, Vol.256, No.6, PP.1624-1635	16, 24
Y	AL-AZZAM W, et.al., Structure of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Horseradish Peroxidase in Organic Solvents: Infrared Amide I Spectral Changes upon Protein Dehydration Are Largely Caused by Protein Structural Changes and Not by Water Removal Per Se, Biophysical Journal, Vol.83, 2002.12, PP.3637-3651	17-19, 24, 32
Y	JP 63-059891 A (Oriental Yeast Co., Ltd.), 15 March 1988 (15.03.1988), page 4, lower left column, line 12 to lower right column, line 5; page 5, lower right column, line 12 to page 6, upper left column, line 8 (Family: none)	17-19, 24, 32
Y	JP 2004-045390 A (Shigeori TAKENAKA), 12 February 2004 (12.02.2004), paragraphs [0052], [0063] to [0064]; fig. 9, 18, 19 (Family: none)	20-24, 33
Y	SNABE T, et.al., Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films, Journal of Biotechnology, 2002, Vol.95, PP.145-155	24
Y	JP 9-056379 A (Fuji Spinning Co., Ltd.), 04 March 1997 (04.03.1997), paragraphs [0011] to [0055] (Family: none)	25

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/35(2014.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C07K17/00(2006.01)i, C12N11/00(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N21/35, C07K16/00, C07K17/00, C12N11/00, C12P7/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Science Direct, Wiley Online Library

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SECUNDO F , CARREA G, Mono- and Disaccharides Enhance the Activity and Enantioselectivity of Burkholderia cepacia Lipase in Organic Solvent but Do Not Significantly Affect its Conformation, BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2005.11.20, VOL. 92, NO. 4, PP. 438-446	1-33
Y	戸井田仁一, 麹菌リパーゼ高生産株の育種とみその試験醸造, 日本醸造協会誌, 2011.07.15, 第106巻第7号, 第457頁-第461頁	1-33

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 1 0 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 4 . 1 1 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

横尾 雅一

2W

3716

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-011321 A (エヴォニク ゴールドシュミット ゲーエムベ ーハー) 2009.01.22, 段落0051-段落0058 & US 2009/0017519 A1 & EP 2011865 A1 & DE 102007031689 A & AT 439434 T & DK 2011865 T & ES 2330594 T & CN 102517273 A & CA 2636903 A1	6-16, 24, 31
Y	FORESTI M L , et.al., FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from Candida antarctica immobilized onto titania at selected conditions, Applied Surface Science, 2010.01.01, Vol.256, No.6, PP.1624-1635	16, 24
Y	AL-AZZAM W , et.al., Structure of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Horseradish Peroxidase in Organic Solvents: Infrared Amide I Spectral Changes upon Protein Dehydration Are Largely Caused by Protein Structural Changes and Not by Water Removal Per Se, Biophysical Journal, Vol.83, 2002.12, PP.3637-3651	17-19, 24, 32
Y	JP 63-059891 A (オリエンタル酵母工業株式会社) 1988.03.15, 第 4頁左下欄第12行-同頁右下欄第5行、第5頁右下欄第12行- 第6頁左上欄第8行 (ファミリーなし)	17-19, 24, 32
Y	JP 2004-045390 A (竹中 繁織) 2004.02.12, 段落0052、段落 0063-段落0064、図9、図18、図19 (ファミリーなし)	20-24, 33
Y	SNABE T , et.al., Application of infrared spectroscopy (attenuated total reflection) for monitoring enzymatic activity on substrate films, Journal of Biotechnology, 2002, Vol.95, PP.145-155	24
Y	JP 9-056379 A (富士紡績株式会社) 1997.03.04, 段落0011-段 落0055 (ファミリーなし)	25