(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2025-513557
(P2025-513557A)
(43)公表日　令和7年4月24日(2025.4.24)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ	*7/64*	*(2022.01)*	Ｃ１２Ｐ	7/64	ＺＮＡ　４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*9/20*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/20	
Ｃ１１Ｃ	*3/04*	*(2006.01)*	Ｃ１１Ｃ	3/04	
Ｃ１２Ｎ	*15/31*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/31	
Ｃ１２Ｎ	*15/55*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全46頁）

(21)出願番号　特願2024-562819(P2024-562819)
(86)(22)出願日　令和5年4月27日(2023.4.27)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月23日(2024.10.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/061073
(87)国際公開番号　WO2023/209070
(87)国際公開日　令和5年11月2日(2023.11.2)
(31)優先権主張番号　22170819.1
(32)優先日　令和4年4月29日(2022.4.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　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－２８８０ バグスバエルト，クロシェイバイ ３６
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100138210
弁理士　池田 達則
(74)代理人　100203828
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　脂肪酸アルキルエステルの製造

(57)【要約】
本発明は、脂肪酸アルキルエステルを製造するためのプロセスを提供する。本プロセスは、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸、又はそれらの任意の組み合わせを含む基質を提供することと、基質を、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む酵素組成物と反応させ、脂肪酸アルキルエステルを製造することと、を含む。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
脂肪酸アルキルエステルを製造するためのプロセスであって、
ａ）トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸、又はそれらの任意の組み合わせを含む基質を提供する工程と、
ｂ）前記基質を、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む酵素組成物と反応させ、脂肪酸アルキルエステルを製造する工程であって、前記ｓｎ－１，３位リパーゼが、配列番号１又は配列番号２に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼであり、前記ｓｎ－２位リパーゼが、配列番号３に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼであり、前記リパーゼが、液体形態である、製造する工程と、
を含む、プロセス。
【請求項２】
酵素又は酸の存在下でのけん化及び／又はエステル化、続いて、分離及び任意選択でグリセロールの回収によって、工程ｂ）において製造される脂肪酸アルキルエステル中の遊離脂肪酸の還元をさらに含む、請求項１に記載のプロセス。
【請求項３】
アルコール及び任意選択で水が、工程ｂ）中に添加される、パラグラフ１又は２に記載のプロセス。
【請求項４】
前記アルコールが、Ｃ１－Ｃ５アルコール、好ましくは、メタノール、エタノール、プロパノール、又はそれらの混合物である、パラグラフ１～３のいずれか１つに記載のプロセス。
【請求項５】
前記基質が、藻類油、カノーラ油、ヤシ油、ヒマシ油、ヤシ油、コプラ油、トウモロコシ油、蒸留トウモロコシ油、綿実油、亜麻油、魚油、ブドウ種子油、麻油、ジャトロファ油、ホホバ油、マスタード油、カノーラ油、パーム油、パームステアリン、パームオレイン、パーム核油、ピーナッツ油、菜種油、米ぬか油、サフラワー油、大豆油、ヒマワリ油、トール油、塩生植物からの油、及び／又はブタ、ウシ、及びヒツジ由来の獣脂、ラード、鶏脂、魚油を含む動物の脂肪、パーム油遊離脂肪酸留出物、大豆油遊離脂肪酸留出物、ソープストック脂肪酸材料、黄色グリース、使用済み調理油、パーム油工場廃液、及び褐色グリース、又はそれらの任意の組み合わせのうちの１つ以上に由来する、請求項１～４のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項６】
前記基質中の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は例えば少なくとも９５％の脂肪酸アシル基又は遊離脂肪酸が、脂肪酸アルキルエステルに転化されている、請求項１～５のいずれか一項に記載のプロセス。
【請求項７】
ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む脂肪酸アルキルエステルを製造するための酵素組成物であって、前記ｓｎ－１，３位リパーゼが、配列番号１又は配列番号２に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼであり、前記ｓｎ－２位リパーゼが、配列番号３に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５

％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼであり、前記リパーゼが、液体形態である、酵素組成物。

【請求項８】

前記ｓｎ－１，３位リパーゼ及び前記ｓｎ－２位リパーゼが、微生物起源のもの、特に真菌又は細菌起源のものである、請求項４に記載の組成物。

【請求項９】

前記ｓｎ－１，３位リパーゼ及び前記ｓｎ－２位リパーゼが、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）リパーゼ、アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）リパーゼ、テルモマイセス・ラヌジノーサ（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）リパーゼ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＡ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＢ、カンジダ・シリンドラセア（Ｃａｎｄｉｄａ ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）リパーゼ、カンジダ・デフォルマンス（Ｃａｎｄｉｄａ ｄｅｆｏｒｍａｎｓ）リパーゼ、カンジダ・リポリティカ（Ｃａｎｄｉｄａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）リパーゼ、カンジダ・パラプシローシス（Ｃａｎｄｉｄａ ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）リパーゼ、ムーコル・ミーヘイ（Ｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉ）、カンジダ・ルゴサ（Ｃａｄｉｄａ ｒｕｇｏｓａ）リパーゼ、コリネバクテリウム・アクネ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｎｅｓ）リパーゼ、フミコラ・ラヌジノーサ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｓ－２リパーゼ、フザリウム・クルモルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｃｕｌｍｏｒｕｍ）リパーゼ、フザリウム・ヘテロスポルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｈｅｔｅｒｏｓｐｏｒｕｍ）リパーゼ、フザリウム・オキシスポラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）リパーゼ、ムコールジャパニカス（Ｍｕｃｏｒｊａｖａｎｉｃｕｓ）リパーゼ、リゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉ）リパーゼ、リゾムーコル・デレマー（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｄｅｌｅｍａｒ）リパーゼ、ブルコルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）（シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ））セパシア（ｃｅｐａｃｉａ）リパーゼ、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種ＡＴＣＣ ２１８０８、シュードモナス・カメンベルティ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃａｍｅｍｂｅｒｔｉｉ）リパーゼ、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）リパーゼ、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）リパーゼ、リゾプス・アリツス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ａｒｒｈｉｚｕｓ）リパーゼ、スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）リパーゼ、ゲオトリクム・キャンディダム（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｉｕｍ ｃａｎｄｉｄｕｍ）リパーゼ、ハイフォザイマ（Ｈｙｐｈｏｚｙｍａ）種リパーゼ、クレブシエラ・オキシトカ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｏｘｙｔｏｃａ）リパーゼからなる群から選択される、請求項４又は５に記載の組成物。

【請求項１０】

脂肪酸アルキルエステルを製造するための、請求項７～９のいずれか一項に記載の酵素組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

配列表の参照

本出願は、参照により本明細書に組み込まれるコンピュータ可読形態の配列表を含む。

【０００２】

本発明は、遊離脂肪酸及び／又はトリグリセリドの脂肪酸アルキルエステルへの転化を促進するｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼの組み合わせを用いて、基質から脂肪酸アルキルエステルを製造するためのプロセスに関する。

【背景技術】

【０００３】
バイオディーゼルは、一般に、脂肪及び油のモノアルキルエーテルとして分類され、環境的有益性のために、最近注目されるようになった。バイオディーゼルは現在化学的に（触媒として、例えば、ＮａＯＨ及び／又はナトリウムメトキシドを用いて）首尾よく製造されるが、その発展を制限するいくつかの関連する問題、例えば、遊離脂肪酸の高い含有率のための油の前処理、エステル相及びグリセロール相からの化学的触媒の除去並びにグリセロール回収中の無機塩類の除去が存在する。
【０００４】
化学的触媒により引き起こされる欠点は、触媒として脂肪分解酵素を使用することによって大きく防止され、近年、バイオディーゼルを製造するエステル交換反応において固定化されているか、又は固定化されていないリパーゼを使用することに関心がもたれるようになった。
【０００５】
エステルの酵素的製造において真菌エステラーゼを使用することができ、鉱酸（例えば、硫酸、塩化水素及びクロロスルホン酸）、Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩ及びＩＶ族の金属の両性水酸化物及びその他のような触媒に取って代わることができる。エステル合成に酵素、特に酵素命名法（Ｒｅｃｏｍｍｅｎｄａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｕｎｉｏｎ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９２年以降）に従ってＥＣ３．１．１カルボン酸エステルヒドロラーゼに分類される酵素を使用することは、先行技術において記載されている。
【０００６】
国際公開第８８／０２７７５号パンフレットには、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）からのリパーゼＡ及びＢが開示されている。Ｃ．アンタークティカ（Ｃ．ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＢ（ＣＡＬＢ）が、エステル合成のためにより有効であることが記載されている。
【０００７】
クチナーゼは、基質クチンを加水分解できる脂肪分解酵素である。クチナーゼは、様々な真菌から公知である（Ｐ．Ｅ．Ｋｏｌａｔｔｕｋｕｄｙ ｉｎ“Ｌｉｐａｓｅｓ”，Ｅｄ．Ｂ．Ｂｏｒｇｓｔｒｏｍ ａｎｄ Ｈ．Ｌ．Ｂｒｏｃｋｍａｎ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ １９８４，４７１－５０４）。フミコラ・インソレンス（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｉｎｓｏｌｅｎｓ）からのクチナーゼのアミノ酸配列が公開されている（米国特許第５，８２７，７１９号）。
【０００８】
過剰量の短鎖アルコール、例えば、メタノールは、リパーゼを著しく不活性化することは周知である。しかしながら、油をその対応するメチルエステルに完全に転化するために、トリグリセリドに基づく少なくとも３モル当量のメタノールが必要である。Ｄｕ ｅｔ ａｌ．（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００３，３８：１０３－１０６）は、不連続的バッチ及び連続的バッチの操作中の油／メタノールのモル比の効果を比較的に研究した。
【０００９】
リパーゼの不活性化を回避するために、反応を通じてメタノールを段階的に添加することによって、メタノール濃度は低く保持されてきている（Ｓｈｉｍａｄａ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｍｏｌ．Ｃａｔａｌｙｓｉｓ Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ，２００２，１７：１３３－１４２、Ｘｕ ｅｔ ａｌ．２００４，Ｂｉｏｃａｔ．Ｂｉｏｔｒａｎｓｆｏｒｍ．２２：４５－４８）。
【００１０】
カンジダ・デフォルマンス（Ｃａｎｄｉｄａ ｄｅｆｏｒｍａｎｓ）からのリパーゼは、トリグリセリド（ＴＧ）のアルコリシス及び遊離脂肪酸（ＦＡＡ）のエステル化の両方を触媒することができるが、同一反応条件ではないことを、Ｂｏｕｔｕｒ ｅｔ ａｌ．

（Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９５，４２：２３－３３）は報告した。Ｂｏｕｔｕｒｅｔ　ａｌ．が記載する条件下に、エステル化のみが触媒された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

バイオディーゼルのための脂肪酸アルキルエステルをより経済的に製造するために、脂肪及び油をそれらの対応するメチルエステルにより速く転化し且つ前記転化の収率をより高くする必要がある。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明は、脂肪酸アルキルエステルを製造するためのプロセスに関する。本プロセスは、ａ）トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸、又はそれらの任意の組み合わせを主に含む基質を提供する工程と、ｂ）基質を、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む酵素組成物と反応させ、脂肪酸アルキルエステルを製造する工程と、を含む。

【００１３】

本発明はまた、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む脂肪酸アルキルエステルを製造するための酵素組成物に関する。

【００１４】

本発明では、特異性活性が低いｓｎ－２位での反応も触媒する非特異性リパーゼを組み合わせて使用する。非特異性リパーゼは、高速ｓｎ－１，３位リパーゼの一部を置換することによって、反応速度及び転化を驚くほど高めることができる。

【００１５】

本発明のこれら並びにさらに他の目的及び利点は、以下の記載から明らかであろう。以下の詳細な記載において、本発明の好ましい実施形態を、添付の図面を参照して記載するであろう。これらの実施形態は、本発明の全範囲を表すものではない。むしろ、本発明は、他の実施形態で用いられ得る。したがって、本発明の幅を解釈するためには、本明細書の特許請求の範囲を参照すべきである。

【発明を実施するための形態】

【００１６】

定義

本発明の特定の実施形態が開示され、記載される前に、本発明は、本明細書に開示された特定のプロセス及び材料に限定されるものではなく、そのような材料はある程度変化し得ることを理解されたい。また、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲及びその等価物によってのみ定義されるので、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的でのみ使用され、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【００１７】

本発明の記載及び特許請求の範囲において、以下の用語が使用される。

【００１８】

単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その」は、文脈から明らかに別の解釈が要求されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「工程」への言及は、１つ以上のそのような工程への言及を含む。

【００１９】

本明細書で使用する場合、ある材料の分量若しくは量、又はその特定の特性に関して使用される場合の「実質的な」は、当該材料又は特性が意図した効果を提供するのに十分な量を指す。どの程度の逸脱が許されるかは、場合によっては特定の文脈に依存し得る。同様に、「実質的に含まない」などは、組成物中の同定された要素又は薬剤の欠如を意味する。特に、「実質的に含まない」と同定されている要素は、組成物中に完全に含まれないか、又は組成物に有害な影響を与えない程度に少量しか含まれないかのいずれかである。

【００２０】

本明細書において、数値又はパラメータの「約」への言及は、当該数値又はパラメータ自体に向けられる実施形態を含む。例えば、「約Ｘ」を指す記載は、実施形態「Ｘ」を含む。測定値と組み合わせて使用される場合、「約」は、少なくとも特定の値を測定する方法に関連する不確実性を包含する範囲を含み、表記した値に前後する２つの標準偏差を足した又は引いた範囲を含み得る。

【００２１】

同様に、別の遺伝子又はポリペプチドＸ「に由来する」遺伝子又はポリペプチドへの言及は、遺伝子又はポリペプチドＸを含む。

【００２２】

本明細書に記載される実施形態は、実施形態「からなること」及び／又は実施形態「から本質的になること」を含むことを理解されたい。本明細書で使用する場合、文脈が明示的な語又は必要な意味によりそうでないことを要求する場合を除き、単語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」又は「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」若しくは「含んでいる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変形は、包括的な意味で使用され、即ち記載された特徴の存在を指定するが、様々な実施形態におけるさらなる特徴の存在又は追加を排除するために使用されない。

【００２３】

濃度、量、及び他の数値データは、本明細書では範囲形式で提示し得る。そのような範囲形式は、単に便宜上及び簡潔にするために使用され、範囲の限界として明示的に列挙された数値のみを含むものではなく、あたかも各数値及び部分範囲が明示的に列挙されているかの如く、範囲内に包含される全ての個々の数値又は部分範囲も含むものと柔軟に解釈されるべきであることを理解されたい。例えば、約１パーセント～約２０パーセントの重量範囲は、１パーセント～約２０パーセントの明示的に列挙された濃度限界のみを含むものではなく、２パーセント、３パーセント、４パーセントなどの個々の濃度、及び５パーセント～１５パーセント、１０パーセント～２０パーセントなどの部分範囲も含むものと解釈されるべきである。

【００２４】

脂質：用語「脂質」は、リン脂質及びそれらの誘導体、トリグリセリド及び誘導体、ステロール、スタノール、コレステロール、スフィンゴ脂質、セラミド、脂肪酸、脂肪アルコール、糖脂質、プロテオリピド、リポ多糖、エーテル脂質、極性及び非極性脂質並びにそれらの誘導体を指す。

【００２５】

エステル化：本明細書で使用する用語「エステル化」は、脂肪酸などの有機酸と、グリセロールなどの任意のアルコール又はポリオールを組み合わせる反応を指す。

【００２６】

加水分解：本明細書で使用する用語「加水分解」は、酸及びアルコールを製造する水とエステルとの反応を指す。

【００２７】

アルコリシス：本明細書で使用する用語「アルコリシス」は、異なるアルキル基を有するエステルを製造するエステルと、エタノール、ブタノールなどの一価アルコール、又はグリセロールのような多価アルコールとの反応を指す。

【００２８】

アシドリシス：本明細書で使用する用語「アシドリシス」は、アシル基の交換をもたらすエステルと酸との反応を指す。

【００２９】

分子間エステル交換反応：本明細書で使用する用語「分子間エステル交換反応」は、アシル部分とアルコール部分間での混合をもたらす第１のエステルと第２のエステルとの反応を指す。

【００３０】

エステル交換反応：本明細書で使用する用語「エステル交換反応」は、以下の反応：ア

ルコリシス、アシドリシス及び分子間エステル交換反応のいずれかを指す。
【００３１】
合成：本明細書で使用する用語「合成」又は「脂肪酸の合成」は、グリセリドのｓｎ－２位で脂肪酸を共有結合させること、好ましくは、以下の反応：エステル化、分子間エステル交換反応、アルコリシス、アシドリシス、エステル交換反応のいずれか１つから選択される一段階反応によって共有結合させることを指す。
【００３２】
用語「アルキル」又は「アルキル基」は、その最も広い意味に従って解釈され、炭化水素を含む一価の脂肪族化合物を記載する。
【００３３】
用語「グリセロール誘導体」及び「グリセリド」は、Ｃｌ、Ｃ２又はＣ３炭素に付着したヒドロキシル基のいずれかの水素のうちの少なくとも１つが置換されるグリセロールのエステル、エーテル及び他の誘導体を記載するために本明細書で互換的に使用される。グリセロール誘導体の例としては、とりわけ、トリステアロイルグリセロール（又はトリオステアロイルグリセロール又はトリステアリン酸グリセリン、又はトリステアリン酸グリセリル）、ｌ，３－ベンジリデングリセロール（又は１，３－０－ベンジリデングリセロール）、及びグリセロール２－ホスフェート（又は２－ホスホグリセロール）である。置換基がヒドロキシル基の酸素上ではなく炭素原子上にある場合、その化合物はグリセロールの誘導体とみなされ得る（例えば、Ｃ１６Ｈ３３ＣＨＯＨ－ＣＨＯＨ－ＣＨ２ＯＨの１，２，３－ノナデカントリオール、これはまた１－Ｃ－ヘキサデシルグリセロールとみなされる）。本明細書で使用する用語「グリセロール」は、グリセロール誘導体を包含することが意図される。
【００３４】
リパーゼ：用語「リパーゼ」、「リパーゼ酵素」、「脂質分解酵素」、「脂質エステラーゼ」、「脂肪分解ポリペプチド」及び「脂肪分解タンパク質」は、酵素命名法によって定義されるようなクラスＥＣ３．１．１における酵素を指す。これは、リパーゼ活性（トリアシルグリセロールリパーゼ、ＥＣ３．１．１．３）、クチナーゼ活性（ＥＣ３．１．１．７４）、ステロールエステラーゼ活性（ＥＣ３．１．１．１３）及び／又はワックス－エステルヒドロラーゼ活性（ＥＣ３．１．１．５０）を有し得る。本発明の目的のために、リパーゼ活性（即ち、リパーゼの加水分解活性）は、「材料＆方法」セクションに記載されているような様々な鎖長を有する基質を使用するｐＮＰアッセイで決定され得る。
【００３５】
親又は親リパーゼ：用語「親」又は「親リパーゼ」は、酵素変異体を産生するために、改変がなされるリパーゼを意味する。親リパーゼは、天然に存在する（野生型）ポリペプチドであり得るが、その変異体及び／又は断片でもあり得る。好ましい実施形態では、親リパーゼは、配列番号１、２、３又は４に示されるものであり得る。
【００３６】
配列同一性：２つのアミノ酸配列同士の関係性は、パラメータ「配列同一性」によって記載される。
【００３７】
本発明の目的のために、２つのアミノ酸配列間の配列同一性は、好ましくはバージョン５．０．０以降のＥＭＢＯＳＳパッケージ（ＥＭＢＯＳＳ：Ｔｈｅ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｏｐｅｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｓｕｉｔｅ，Ｒｉｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ．１６：２７６－２７７）のＮｅｅｄｌｅプログラムにおいて実装されている、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８；４４３－４５３）を用いて決定される。使用されるパラメータは、１０のギャップオープンペナルティ、０．５のギャップエクステンションペナルティ、及びＥＢＬＯＳＵＭ６２（ＢＬＯＳＵＭ６２のＥＭＢＯＳＳバージョン）置換マトリックスである。Ｎｅｅｄｌｅ標識「最長の同一性」（－ｎｏｂｒｉｅｆオプションを用いて得られる）の

出力が同一性パーセントとして用いられて、以下のとおり算出される。
（同一残基×１００）／（アライメントの長さ－アライメント中のギャップの総数）
【００３８】
基質：本発明に従って脂肪酸アルキルエステルを製造するのに好適な基質は、広範囲な種類の植物油及び脂肪であり、菜種油及び大豆油が最も一般に用いられるが、カラシ油、ヒマワリ油、カノーラ油、ヤシ油、麻油、パーム油、さらには藻類などの他の作物も有望である。基質は、粗製の品質であるか、又はさらに処理（精製、漂白及び脱臭）することができる。また、動物の脂肪、例えば、獣脂、ラード、鶏油、海産物油並びに黄色及び褐色グリースとして一般に公知の廃棄された植物及び動物の脂肪及び油を使用することができる。好適な脂肪及び油は、純粋なトリグリセリド又は廃棄された植物油及び動物の脂肪の中に一般に見られるトリグリセリド及び遊離脂肪酸の混合物であり得る。基質はまた、植物油脱臭留出物から得ることができる。基質中の脂肪酸の種類は、植物及び動物の脂肪及び油の中にグリセリドとして天然に存在するものを含む。これらとしては、いくつかの例を挙げれば、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、パルミチン酸、ステリン酸、及びラウリン酸が挙げられる。粗製植物油中の微量成分は、典型的には、リン脂質、遊離脂肪酸及び部分的グリセリド、即ちモノグリセリド及びジグリセリドである。本明細書で使用する場合、句「脂肪酸残基」は、遊離脂肪酸又はエステル化された脂肪酸のいずれか、例えば、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド又は脂肪酸アルキルエステルを指す。
【００３９】
バイオディーゼル：短鎖アルコールの脂肪酸アルキルエステル（ＦＡＡＥ）、例えば、脂肪酸メチルエステル（ＦＡＭＥ）及び脂肪酸エチルエステル（ＦＡＥＥ）は、化石ディーゼルに対する添加物として使用されるので、バイオディーゼルとも呼ばれる。バイオディーゼルは、更新可能な資源から製造されるので、化石油に基づくディーゼル燃料のための、重要性が増加している添加物又は代替物を構成する。
【００４０】
アルコール：本発明のプロセスにおいて使用されるアルコールは、好ましくは、１～５個の炭素原子を有する（C_1、C_2、C_3、C_4、又はC_5、「低級アルコール」）短鎖の、分岐又は直鎖アルコール及びそれらの混合物である。好ましい低級アルコールは、メタノール、エタノール、プロパノール又はそれらの混合物である。アルコール含有量は、反応混合物（遊離脂肪酸及びグリセリド結合脂肪酸）中の脂肪酸の量に対して、好ましくは４．０、３．５、３．０、２．５、２．０、１．５又は１．０モル当量未満である。アルコールは、段階的（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上の段階で）及び／又は連続的に反応混合物に添加され得る。
【００４１】
脂肪酸フィードストック：用語「脂肪酸フィードストック」又は「油及び／又は脂肪」又は「植物油フィードストック」は、脂肪酸誘導体を含む基質として本明細書で定義される。基質は、脂肪酸アルキルエステル、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。脂肪酸を含む植物又は動物起源の任意の油又は脂肪は、本発明のプロセスにおいて脂肪酸アルキルエステルを製造するための基質として使用し得る。また、脂肪酸アルキルエステルから実質的になる脂肪酸フィードストックは、本発明にとってフィードストック（バイオディーゼルフィードストック）として好適である。好ましくは、脂肪酸フィードストックの遊離脂肪酸含有量は、０．２５％超、０．３０％超、０．３５％超、０．５０％超、０．７５％超、１．０％超、５．０％超、１０．０％超、１５．０％超、２０．０％超、２５．０％超、３０．０％超、４０％超、又はさらに５０．０％超である。
【００４２】
脂肪酸フィードストックは、微生物油、藻類油、カノーラ油、ヤシ油、ヒマシ油、ヤシ油（コプラ油）、トウモロコシ油、綿実油、亜麻油、魚油、ブドウ種子油、麻油、ジャトロファ油、ホホバ油、マスタード油、カノーラ油、パーム油、蒸留トウモロコシ油、パー

ムステアリン、パームオレイン、パーム核油、ピーナッツ油、菜種油、米ぬか油、サフラワー油、大豆油、ヒマワリ油、トール油、及び塩生植物からの油、ペニクレス油、カメリナ油、ホホバ油、コリアンダー種子油、メドウフォーム油、海浜アオイ油、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される油であり得る。

【００４３】

脂肪酸フィードストックは、ブタ、ウシ、及びヒツジ由来の獣脂、ラード、鶏脂、魚油を含む動物の脂肪、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される脂肪であり得る。

【００４４】

脂肪酸フィードストックは、粗製、精製、漂白、脱臭、脱ガム、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。

【００４５】

食品品質の油及び脂肪は、高価であり、したがって、処理による廃棄産物及び副産物、並びに非食品グレードの油及び脂肪は、脂肪酸アルキルエステルを製造するためにますます魅力的なフィードストックとなっている。ソープストックは、油を塩基で処理して、遊離脂肪酸を石鹸（例えばナトリウム石鹸）に転化することによって油精製所において得られる油の画分である。ソープストックは、通常、石鹸に加えてグリセリドの画分を含有する。酸化油は、石鹸を可溶化するためにソープストックを酸性化することによって生じる油精製所からの副産物である。酸化油は、主に、遊離脂肪酸（ＦＦＡ）及びアシルグリセロールを含有する。パーム脂肪酸留分物（ＰＦＡＤ）のような留分物は、油から遊離脂肪酸を除去するために使用される留分プロセスから生じる油精製からの副産物である。

【００４６】

フィードストックは、ソープストック、酸化油、脂肪酸留出物、例えば、ＰＦＡＤ、大豆脂肪酸留出物、菜種脂肪酸留出物、米ぬか脂肪酸留出物、鶏脂脂肪酸留出物、牛脂脂肪酸留出物など、脱ガムからのガム、魚油からのオメガ３脂肪酸誘導体の製造からの副産物、脂肪トラップグリース、黄色グリース、及び褐色グリース、オレイン酸のような遊離脂肪酸、若しくは物理的分離によって得られる油の画分、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される油及び脂肪精製の中間産物、廃棄産物又は副産物であり得る。

【００４７】

遊離脂肪酸（ＦＦＡ）：遊離脂肪酸は、長い炭素鎖を有するカルボン酸である。天然に存在する脂肪酸のほとんどは、４～２４個の偶数の炭素原子の非分岐鎖を有する。遊離脂肪酸は、通常、脂肪（トリグリセリド（ＴＡＧ）、ジグリセリド（ＤＡＧ）、モノグリセリド（ＭＡＧ））、リン脂質又はリゾリン脂質に由来する。トリグリセリドは、グリセロールを３つの脂肪酸分子と組み合わせることによって形成される。グリセロールのヒドロキシル（ＨＯ－）基及び脂肪酸のカルボキシル（－ＣＯＯＨ）基が接合して、エステルを形成する。グリセロール分子は、３つのヒドロキシル（ＨＯ－）基を有する。各脂肪酸は、カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）を有する。ジグリセリドは、グリセロールを２つの脂肪酸分子と組み合わせることによって形成される。モノグリセリドは、グリセロールを１つの脂肪酸分子と組み合わせることによって形成される。

【００４８】

バイオディーゼルは、圧縮着火（ディーゼル）エンジンにて使用するための有望な代替燃料を表す。バイオディーゼル規格は、バイオディーゼルが脂肪酸メチルエステル（ＦＡＭＥ）であるべきであることを要求又は間接的に指定している。しかしながら、以下の反応：グリセリド＋ＦＦＡ＋アルコール→脂肪酸アルキルエステル（バイオディーゼル）＋グリセロール＋水によって得られる短鎖アルコールの脂肪酸アルキルエステルについてバイオディーゼルという用語を広く使用する。短鎖アルコールは、１～５個の炭素原子（C_1－C_5）を有するアルコールである。好ましい短鎖アルコールは、エタノール又はメタノールである。

【００４９】

本発明は、脂肪酸アルキルエステルを製造するためのプロセスに関する。本プロセスは

、ａ）トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸、又はそれらの任意の組み合わせを含む基質を提供する工程と、ｂ）基質を、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む酵素組成物と反応させ、脂肪酸アルキルエステルを製造する工程と、を含む。

【００５０】

一態様では、酵素組成物は、ｓｎ－１，３位リパーゼであって、リパーゼが、配列番号１に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有する、ｓｎ－１，３位リパーゼと、ｓｎ－２位リパーゼであって、リパーゼが、配列番号３に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有する、ｓｎ－２位リパーゼと、を含み、前記リパーゼが、液体形態である。

【００５１】

別の態様では、本発明は、酵素又は酸の存在下でのけん化及び／又はエステル化、続いて、分離及び任意選択でグリセロールの回収によって、工程ｂ）において製造される脂肪酸アルキルエステル中の遊離脂肪酸の還元をさらに含む。

【００５２】

本発明の一態様では、アルコール及び任意選択で水は、本プロセスの工程ｂ）中に添加される。

【００５３】

本発明の一態様では、アルコールは、Ｃ１－Ｃ５アルコール、好ましくは、メタノール、エタノール、プロパノール、又はそれらの混合物である。

【００５４】

アルコールの過剰は、平衡反応を完全な転化に向かわせる可能性がある。本発明の目的のために、アルコールの量は、それがグリセロール結合ＦＡであるか又は遊離ＦＡであるかにかかわらず、基質中に存在するメタノールの脂肪酸（ＦＡ）に対するモル比（ＭｅｔＯＨ：ＦＡ）である当量（ｅｑ．）で表記される。

【００５５】

所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルを製造するプロセスに関し、基質中のメタノールの脂肪酸に対するモル比（ＭｅｔＯＨ：ＦＡ）は、約１．０～４．０モル当量、例えば、１．３～３．５モル当量、例えば、１．５～２．５当量である。

【００５６】

タンパク質は、一般に、短鎖アルコール、例えば、メタノール及びエタノールの存在下で不安定化し、脂肪分解酵素の不活性化は、油中に滴として存在する不溶性アルコールと接触するや否や急速に起こる。したがって、アルコールの量を油への溶解限度未満に抑えることが推奨されることが多い。これは、アルコールを連続的及び／又は段階的に添加することによって得ることができる。

【００５７】

本発明の一態様では、基質は、藻類油、カノーラ油、ヤシ油、ヒマシ油、ヤシ油、コプラ油、トウモロコシ油、蒸留トウモロコシ油、綿実油、亜麻油、魚油、ブドウ種子油、麻油、ジャトロファ油、ホホバ油、マスタード油、カノーラ油、パーム油、パームステアリン、パームオレイン、パーム核油、ピーナッツ油、菜種油、米ぬか油、サフラワー油、大豆油、ヒマワリ油、トール油、塩生植物からの油、及び／又はブタ、ウシ、及びヒツジ由来の獣脂、ラード、鶏脂、魚油を含む動物の脂肪、パーム油遊離脂肪酸留出物、大豆油遊離脂肪酸留出物、ソープストック脂肪酸材料、黄色グリース、使用済み調理油、パーム油工場廃液、及び褐色グリース、又はそれらの任意の組み合わせのうちの１つ以上に由来する。

【００５８】
トリグリセリドを含む基質を、アルコール、好ましくはメタノール又はエタノールと混合し、３０～６０℃、好ましくは、４０℃に往復水振とう浴（２００ｒｐｍ）上で加熱する。好ましくは、水を添加し、溶液を混合し、所望の温度にさらに加熱する。酵素組成物を添加し、溶液を激しく混合し、所望の温度、好ましくは、４０℃及び２００ｒｐｍで往復水振とう浴上に放置して反応させる。高剪断ミキサー、例えば、植物油の酵素的脱ガムにおいて使用されているような型（Ｓｉｌｖｅｒｓｏｎ又はＩＫＡ　Ｌａｂｏｒｔｅｃｈｎｉｋ製）を使用することによって、反応混合物の相を混合することができる（Ｃｌａｕｓｅｎ，Ｋ．（２００１），Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｌｉｐｉｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．１０３，３３３－３４０）。
【００５９】
所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルを製造するためのプロセスに関し、メタノールは、連続的及び／又は段階的に添加される。
【００６０】
アルコールは、経時的に反応に段階的及び／又は連続的に添加することができる。水は、別々に添加することができるか、又は水性酵素組成物溶液内に添加することができる。反応混合物中の水の最終濃度は、０～５０％（ｗ／ｗ）、好ましくは０～１０％（ｗ／ｗ）、より好ましくは０．５～５％（ｗ／ｗ）であることができる。基質は、０．０００１～１００％（ｗ／ｗ）トリグリセリドを含む。さらに、基質は、０～１００％（ｗ／ｗ）になる遊離脂肪酸を含み得る。また、モノグリセリド及びジグリセリド及びリン脂質が存在し得る（フィードストックのグリセリド含有量が高いほど、プロセス効率は向上する）。
【００６１】
転化反応に使用するメタノールの総量に応じて、段階的添加の工程数は、異なり得る。したがって、段階的添加は、少なくとも１工程、少なくとも２工程、少なくとも３工程、少なくとも４工程、少なくとも５工程、少なくとも６工程、少なくとも７工程、少なくとも８工程、少なくとも９工程、又は少なくとも１０工程を構成し得る。
【００６２】
脂肪分解酵素は、一般に、油中ではむしろ耐熱性であり、酵素的分子間エステル交換反応の商業的プロセスは、一般に、７０℃で実施される。しかしながら、短鎖アルコールは、脂肪分解酵素の安定性、ひいては活性に悪影響を及ぼし、この不安定化影響は、温度の上昇と共に増加する。脂肪分解酵素に対するアルコールの不安定化影響は、アルコールの分子量が増加するにつれて減少するように思われる。油へのアルコールの溶解度と油の不安定化影響との関係は、いくつかのグループによって指摘されている。
【００６３】
高級アルコール投与量がプラスの効果を示したいくつかの事例が記載されている：酵素が非常に頑強な場合、又は不活性化特性のない大きなアルコールを使用する場合には、不活性化は問題ではない。その場合、アルコール濃度が高いことは、平衡反応を完全な転化に向かわせるのに有利である。
【００６４】
トリグリセリド－基質の完全な転化は、副産物としてグリセロールの形成をもたらす。グリセロールは、おそらく、酵素への基質のアクセスを物理的にブロックすることによって特に固定化された脂肪分解酵素を不活性化することが示されている。高濃度のアルコールは、グリセロールを溶液中に保つことによって、グリセロールが脂肪分解酵素を不活性化するのを避けるのに役立ち得ることが示唆されている。使用済みシリカ粒子に吸着したグリセロールは、エタノール、続いて、乾燥によって除去され得ることが示されている（“Ｎｅａｒ－ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｆａｔｔｙ　ａｃｉｄ　ａｌｋｙｌ　ｅｓｔｅｒｓ　ｂｙ　ｌｉｐａｓｅ－ｃａｔａｌｙｚｅｄ　ａｌｃｏｈｏｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｆａｔｓ　ａｎｄ　ｏｉｌｓ　ｗｉｔｈ　ａｄｓｏｒｐｔｉｏｎ　ｏｆ　ｇｌｙｃｅｒｏｌ　ｂｙ　ｓｉｌｉｃａ　ｇｅｌ”Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ

．（１９９４）Ｅｎｚｙｍｅ Ｍｉｃｒｏｂ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．，ｖｏｌ．１６，ｐ．４７８－４８４）。

【００６５】

水の存在は、脂肪分解酵素の活性を維持するのに重要であることが繰り返し指摘されており、現在公知の方法の大部分は、反応に水を添加することを規定している。驚くべきことに、本発明の方法は、水を追加することなく実施され得ることが見出された。

【００６６】

本発明のプロセスは、トリグリセリド（トリアシルグリセロール）から主になる任意の油及び脂肪、例えば、典型的には、９０重量％超（例えば、９５重量％超）のトリグリセリドを含有する植物油及び動物の脂肪に適用することができる。トリグリセリド中のアシル基は、典型的には、４～２４個の炭素原子、特に、１２～２２個の炭素原子を有する直鎖脂肪アシル基であり得る。それらは１つ以上の二重結合を含有する飽和又は不飽和であり得る。トリグリセリドは特に、非置換アシル基、即ち、一般式Ｒ－ＣＯのアシル基（式中、Ｒは、ヒドロカルビル基である）のトリグリセリドであり得る。本プロセスは、適度な温度で実施することができ、有利には、熱安定性のトリグリセリド、例えば、多価不飽和アシル基を有するトリグリセリドにさえ適用することができる。本プロセスは、従来の方法によって分離及び精製できるグリセロール及び脂肪酸の高収率をもたらす。

【００６７】

本発明の一態様では、本プロセスは、バッチ又は連続的モードで実施される。

【００６８】

本プロセスは、撹拌タンク内で基質を元の（可溶性）形態の酵素組成物と接触させることによって実行することができる。

【００６９】

撹拌タンクは、バッチ式又は連続式で使用され得る。撹拌タンク（バッチ式か連続式かを問わず）からの流出液は、トリグリセリド及び脂肪酸を含有する油相と、グリセロール及びリパーゼを含有する水相とに分離することができる。水相の水及びリパーゼは、リパーゼをより有効に利用するために、任意選択でグリセロールを分離した後にリサイクルすることもできる。

【００７０】

撹拌タンク操作の典型的な条件は、摂氏３０～６０℃、特に４０～５５℃、及び反応時間６～７２時間、特に１２～４８時間である。

【００７１】

本発明の一態様では、前記基質中の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は例えば少なくとも９５％の脂肪酸アシル基又は遊離脂肪酸は、脂肪酸アルキルエステルに転化されている。

【００７２】

本発明の一態様では、工程ｂ）の総時間は、バッチプロセスでは、５～７２時間、例えば１０～７０時間、例えば１２～６８時間、例えば１８～６０時間、例えば２４～４８時間である。

【００７３】

本発明の一態様では、工程ｂ）の総時間は、連続的プロセスでは、５～８０時間、例えば１０～７５時間、例えば１２～７２時間、例えば１８～６０時間、例えば２４～４８時間である。

【００７４】

本発明の一態様では、任意選択で、工程ｂ）で添加される水の量は、総基質の０．０１％～１０％の範囲である。

【００７５】

酵素組成物

本発明は、２つの脂肪分解酵素又はリパーゼ（トリアシルグリセロールリパーゼ）、即ち、トリグリセリド（トリアシルグリセロール）のエステル結合の加水分解を触媒する酵

素を使用する。それらは、酵素命名法に従ってＥＣ３．１．１．３として分類される。２つのリパーゼは、位置特異性、即ち、トリグリセリドの３位にあるアシル基に対する特異性を特徴とする。微生物の位置特異性（又は１，３－特異性）リパーゼは、１位及び３位のアシル基を加水分解し、２位ではほとんど活性を示さないが、位置非特異性リパーゼは、３位全てのアシル基を同程度の速度で加水分解する。リパーゼの位置特異性は、国際公開第８８０２７７５号パンフレット、国際公開第８９０１０３２号パンフレット、又は国際公開第９４１４９４０号パンフレットの実施例８に記載されているように決定され得る。本発明は、位置非特異性リパーゼ及び位置特異性リパーゼを使用する。各リパーゼは、元の（可溶化）形態又は固定化形態において使用され得る。

【００７６】

本発明の文脈では、脂肪分解酵素は、Ｅ．Ｃ．３．１．１に分類され、真のリパーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼを含む。より具体的には、脂肪分解酵素は、ＥＣ３．１．１．３、ＥＣ３．１．１．２３及び／又はＥＣ３．１．１．２６によって分類されるリパーゼ、ＥＣ３．１．１．１、ＥＣ３．１．１．２、ＥＣ３．１．１．６、ＥＣ３．１．１．７及び／又はＥＣ３．１．１．８によって分類されるエステラーゼ、ＥＣ３．１．１．４及び／又はＥＣ３．１．１．３２によって分類されるホスホリパーゼ、ＥＣ３．１．１．５によって分類されるリゾホスホリパーゼ並びにＥＣ３．１．１．７４において分類されるクチナーゼであり得る。２つ以上の脂肪分解酵素は、２つ以上のリパーゼの混合でもあり得る。２つ以上の脂肪分解酵素は、リパーゼ及びホスホリパーゼを含み得る。２つ以上の脂肪分解酵素は、ＥＣ３．１．１．３のリパーゼを含む。２つ以上の脂肪分解酵素は、トリグリセリド、ジグリセリド、及びモノグリセリドに対する活性を有するリパーゼを含む。２つ以上の脂肪分解酵素は、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む。

【００７７】

一態様では、本発明は、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む脂肪酸アルキルエステルを製造するための酵素組成物に関する。

【００７８】

脂肪分解酵素は、好ましくは、微生物起源のもの、特に細菌、真菌又は酵母起源のものである。特定の実施形態では、使用される脂肪分解酵素は、アブシディア（Ａｂｓｉｄｉａ）、特にアブシディア・ブラケスレーナ（Ａｂｓｉｄｉａ ｂｌａｋｅｓｌｅｅｎａ）及びアブシディア・コリムビフェラ（Ａｂｓｉｄｉａ ｃｏｒｙｍｂｉｆｅｒａ）の菌株、アクロモバクター（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ）、特にアクロモバクター・イオファグス（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ ｉｏｐｈａｇｕｓ）の菌株、エロモナス（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ）の菌株、アルテルナリア（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）、特にアルテルナリア・ブラシッシオラ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ｂｒａｓｓｉｃｉｏｌａ）の菌株、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、特にアスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）及びアスペルギルス・フラブス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｆｌａｖｕｓ）の菌株、アクロモバクター（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ）、特にアクロモバクター・イオファグス（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ ｉｏｐｈａｇｕｓ）の菌株、アウレオバシディウム（Ａｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ）、特にアウレオバシディウム・プルランス（Ａｕｒｅｏｂａｓｉｄｉｕｍ ｐｕｌｌｕｌａｎｓ）の菌株、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、特にバシラス・ピュミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｕｍｉｌｕｓ）、バシラス・ステアロサーモフィラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）及びバシラス・サチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）の菌株、ボーベリア（Ｂｅａｕｖｅｒｉａ）の菌株、ブロコスリックス（Ｂｒｏｃｈｏｔｈｔｉｘ）、特にブロコスリックス・テルモスファクタ（Ｂｒｏｃｈｏｔｈｔｉｘ ｔｈｅｒｍｏｓｐｈａｃｔａ）の菌株、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、特にカンジダ・シリンドラセア（Ｃａｎｄｉｄａ ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）（カンジダ・ルゴサ（Ｃａｎｄｉｄａ ｒｕｇｏｓａ））、カンジダ・パラリポリティカ（Ｃａｎｄｉｄａ ｐａｒａｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）、カンジダ・ツクバレンシス（Ｃａｎｄｉｄａ ｔｓｕｋｕｂａｅｎｓｉｓ）、カンジダ・オ

ーリキュラエ（Ｃａｎｄｉｄａ ａｕｒｉｃｕｌａｒｉａｅ）、カンジダ・フミコーラ（Ｃａｎｄｉｄａ ｈｕｍｉｃｏｌａ）、カンジダ・フォリアラム（Ｃａｄｉｄａ ｆｏｌｉａｒｕｍ）、カンジダ・シリンドラセア（Ｃａｎｄｉｄａ ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）（カンジダ・ルゴサ（Ｃａｄｉｄａ ｒｕｇｏｓａ））及びカンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）の菌株、クロモバクター（Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ）、特にクロモバクター・ビスコサム（Ｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ ｖｉｓｃｏｓｕｍ）の菌株、コプリヌス（Ｃｏｐｒｉｎｕｓ）、特にコプリヌス・シネリウス（Ｃｏｐｒｉｎｕｓ ｃｉｎｅｒｉｕｓ）の菌株、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）、特にフザリウム・オキシスポラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）、フザリウム・ソラニ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｏｌａｎｉ）、フザリウム・ソラニ・ピシィ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｏｌａｎｉ ｐｉｓｉ）、及びフザリウム・ロセウム・クルモルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ ｃｕｌｍｏｒｕｍ）の菌株、ゲオトリクム（Ｇｅｏｔｒｉｃｕｍ）、特にゲオトリクム・ペニシラタム（Ｇｅｏｔｒｉｃｕｍ ｐｅｎｉｃｉｌｌａｔｕｍ）の菌株、ハンゼヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、特にハンゼヌラ・アノーマラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ａｎｏｍａｌａ）の菌株、フミコラ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ）、特にフミコラ・ブレビスポラ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｂｒｅｖｉｓｐｏｒａ）、フミコラ・ラヌジノーサ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）、フミコラ・ブレビス変種テルモイデ（Ｈｉｍｉｃｏｌａ ｂｒｅｖｉｓ ｖａｒ．ｔｈｅｒｍｏｉｄｅａ）及びフミコラ・インソレンス（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｉｎｓｏｌｅｎｓ）の菌株、ハイフォザイマ（Ｈｙｐｈｏｚｙｍａ）の菌株、ラクトバシラス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、特にラクトバシラス・クルバタス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｕｒｖａｔｕｓ）の菌株、メタリジウム（Ｍｅｔａｒｈｉｚｉｕｍ）の菌株、ムーコル（Ｍｕｃｏｒ）の菌株、ペシロマイセス（Ｐａｅｃｉｌｏｍｙｃｅｓ）の菌株、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、特にペニシリウム・シクロピウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｃｙｃｌｏｐｉｕｍ）、ペニシリウム・クルストサム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｃｒｕｓｔｏｓｕｍ）及びペニシリウム・エクスパンサム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｅｘｐａｎｓｕｍ）の菌株、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、特にシュードモナス・エルジノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、シュードモナス・アルカリゲネス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、シュードモナス・セパシア（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃｅｐａｃｉａ）（同義ブルコルデリア・セパシア（Ｂｕｒｋｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｐａｃｉａ））、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）、シュードモナス・フラギ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｒａｇｉ）、シュドモナス・マルトフィリア（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｍａｌｔｏｐｈｉｌｉａ）、シュードモナス・メンドシナ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｍｅｎｄｏｃｉｎａ）、シュードモナス・メフィチカ・リポリティカ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｍｅｐｈｉｔｉｃａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）、シュードモナス・アルカリゲネス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、シュードモナス・プランタリイ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｌａｎｔａｒｉ）、シュードモナス・シュードアルカリゲネス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｓｅｕｄｏａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ）、シュードモナス・スタッツェリ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｔｕｔｚｅｒｉ）、及びシュードモナス・ウィスコンシネンシス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｗｉｓｃｏｎｓｉｎｅｎｓｉｓ）の菌株、リゾクトニア（Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ）、特にリゾクトニア・ソラニ（Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ）の菌株、リゾムーコル（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ）、特にリゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉ）の菌株、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）、特にリゾプス・ジャポニカス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｊａｐｏｎｉｃｕｓ）、リゾプス・ミクロスポルス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｕｓ）及びリゾプス・ノドサス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｎｏｄｏｓｕｓ）の菌株、ロドスポリジウム（Ｒｈｏｄｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、特にロドスポリジウム・トルロイデス（Ｒｈｏｄｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ ｔｏｒｕｌｏｉｄｅｓ）の菌株、ロドトルラ（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕｌａ）、特にロドトルラ・グルチニス（Ｒｈｏｄｏｔｏｒｕ

ｌａ　ｇｌｕｔｉｎｉｓ）の菌株、スポロボロマイセス（Ｓｐｏｒｏｂｏｌｏｍｙｃｅｓ）、特にスポロボロマイセス・シバタナス（Ｓｐｏｒｏｂｏｌｏｍｙｃｅｓ　ｓｈｉｂａｔａｎｕｓ）の菌株、テルモマイセス（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ）、特にテルモマイセス・ラヌジノサス（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓｕｓ）（正式にはフミコラ・ラヌジノーサ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ））の菌株、チアロスポレラ（Ｔｈｉａｒｏｓｐｏｒｅｌｌａ）、特にチアロスポレラ・ファセオリナ（Ｔｈｉａｒｏｓｐｏｒｅｌｌａ　ｐｈａｓｅｏｌｉｎａ）の菌株、トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）、特にトリコデルマ・ハージアナム（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｈａｒｚｉａｎｕｍ）、及びトリコデルマ・リーセイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）の菌株、及び／又はベルティシリウム（Ｖｅｒｔｉｃｉｌｌｉｕｍ）の菌株に由来し得る。

【００７９】

本発明の一態様では、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼは、微生物起源のもの、特に真菌又は細菌起源のものである。

【００８０】

本発明の一態様では、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼは、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）リパーゼ、アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）リパーゼ、テルモマイセス・ラヌジノーサ（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）リパーゼ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＡ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＢ、カンジダ・シリンドラセア（Ｃａｎｄｉｄａ　ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）リパーゼ、カンジダ・デフォルマンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｄｅｆｏｒｍａｎｓ）リパーゼ、カンジダ・リポリティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）リパーゼ、カンジダ・パラプシローシス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）リパーゼ、ムーコル・ミーヘイ（Ｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉ）、カンジダ・ルゴサ（Ｃａｄｉｄａ　ｒｕｇｏｓａ）リパーゼ、コリネバクテリウム・アクネ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｃｎｅｓ）リパーゼ、フミコラ・ラヌジノーサ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｓ－２リパーゼ、フザリウム・クルモルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｃｕｌｍｏｒｕｍ）リパーゼ、フザリウム・ヘテロスポルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｈｅｔｅｒｏｓｐｏｒｕｍ）リパーゼ、フザリウム・オキシスポラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）リパーゼ、ムコールジャパニカス（Ｍｕｃｏｒｊａｖａｎｉｃｕｓ）リパーゼ、リゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉ）リパーゼ、リゾムーコル・デレマー（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｄｅｌｅｍａｒ）リパーゼ、ブルコルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）セパシア（ｃｅｐａｃｉａ）リパーゼ、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種ＡＴＣＣ　２１８０８、シュードモナス・カメンベルティ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｃａｍｅｍｂｅｒｔｉｉ）リパーゼ、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）リパーゼ、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）リパーゼ、リゾプス・アリツス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ａｒｒｈｉｚｕｓ）リパーゼ、スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）リパーゼ、ゲオトリクム・キャンディダム（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｉｕｍ　ｃａｎｄｉｄｕｍ）リパーゼ、ハイフォザイマ（Ｈｙｐｈｏｚｙｍａ）種リパーゼ、クレブシエラ・オキシトカ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｏｘｙｔｏｃａ）リパーゼからなる群から選択される。

【００８１】

ｓｎ－１，３位リパーゼ：

好ましい実施形態では、本発明のｓｎ－１，３位リパーゼは、テルモマイセス（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ）の菌株、特に、テルモマイセス・ラヌジノサス（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓｕｓ）（ＴＬＬ）（同義フミコラ・ラヌジノーサ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ））の菌株に由来するリパーゼ又はその変異体を含む。具体的な実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼは、配列番号１に示されるもの又はその変

異体である。
【００８２】
一実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼは、
ｉ）配列番号１に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼ、
ｉｉ）配列番号１に示されるリパーゼに対して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有するリパーゼ活性を有する親リパーゼの変異体、
ｉｉｉ）リパーゼ活性を有する（ｉ）又は（ｉｉ）のリパーゼの断片、であり、
変異体は、Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ及び配列番号１のＤ９６Ｅ、Ｄ１１１Ａ、Ｄ２５４Ｓ、Ｇ１６３Ｋ、Ｐ２５６Ｔ、Ｇ９１Ｔ及びＧ３８Ａの少なくとも１つ以上（例えば、複数）に対応する位置での置換を含む。
【００８３】
具体的な実施形態では、本発明に使用されるｓｎ－１，３位リパーゼは、親リパーゼの変異体であり、変異体は、配列番号１と少なくとも６０％、特に少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有するリパーゼ活性を有し、
Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｎ３３Ｑ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｎ３３Ｑ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｎ３３Ｑ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、

Ｄ２７Ｒ＋Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ
Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｅ２１０Ｑ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ２７Ｒ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ
Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、
Ｇ９１Ｔ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｎ３３Ｑ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ
からなる群から選択される置換を含む。

【００８４】

別の実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼは、親リパーゼの変異体であり、前記変異体が、
（ａ）配列番号１のＥ１、Ｖ２、Ｎ３３、Ｆ５１、Ｅ５６、Ｌ６９、Ｋ９８、Ｖ１７６、Ｈ１９８、Ｅ２１０、Ｙ２２０、Ｌ２２７、及びＫ２３７位に対応する少なくとも１つの位置において修飾を含み、任意選択で、配列番号１のＤ２７、Ｇ３８、Ｄ９６、Ｄ１１１、Ｇ１６３、Ｔ２３１、Ｎ２３３、Ｄ２５４、及びＰ２５６位に対応する少なくとも１つの位置において修飾をさらに含み、
（ｂ）配列番号１に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９

％であるが、１００％未満の配列同一性を有し、
（ｃ）リパーゼ活性を有する。
【００８５】
一実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼは、親リパーゼの変異体であり、親リパーゼが、
ａ）配列番号１に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するポリペプチド、
ｂ）配列番号１のポリペプチドの断片
からなる群から選択される。
【００８６】
一実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼは、リパーゼ活性を有し、配列番号１に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有する変異体である。
【００８７】
一実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼ変異体は、Ｅ１、Ｖ２、Ｄ２７、Ｎ３３、Ｇ３８、Ｆ５１、Ｅ５６、Ｌ６９、Ｄ９６、Ｋ９８、Ｄ１１１、Ｇ１６３、Ｖ１７６、Ｈ１９８、Ｅ２１０、Ｙ２２０、Ｌ２２７、Ｔ２３１、Ｎ２３３、Ｋ２３７、Ｄ２５４、及びＰ２５６に対応する以下の位置のうちの少なくとも１つにおいて修飾を含み、番号付けは、配列番号１に従う。より好ましくは、リパーゼ変異体は、Ｅ１Ｃ、Ｖ２Ｙ、Ｄ２７Ｒ、Ｎ３３Ｋ、Ｎ３３Ｑ、Ｇ３８Ａ、Ｆ５１Ｖ、Ｅ５６Ｋ、Ｌ６９Ｒ、Ｄ９６Ｅ、Ｄ９６Ｌ、Ｋ９８Ｉ、Ｋ９８Ｑ、Ｄ１１１Ａ、Ｇ１６３Ｋ、Ｖ１７６Ｌ、Ｈ１９８Ｓ、Ｅ２１０Ｋ、Ｙ２２０Ｆ、Ｌ２２７Ｇ、Ｔ２３１Ｒ、Ｎ２３３Ｒ、Ｎ２３３Ｃ、Ｋ２３７Ｃ、Ｄ２５４Ｓ、及びＰ２５６Ｔに対応する以下の修飾のうちの少なくとも１つを含み、番号付けは、配列番号１に従う。
【００８８】
一実施形態では、前記リパーゼ変異体は、Ｓ５４Ｔ、Ｓ８３Ｔ、Ｇ９１Ａ、Ａ１５０Ｇ、Ｉ２５５Ａ、及びＥ２３９Ｃからなる群から選択される置換のうちの１つをさらに含む。
【００８９】
好ましい実施形態では、ｓｎ－１，３位リパーゼ変異体は、配列番号１においてＥ１Ｃ＋Ｎ２３３Ｃに対応する置換、任意選択では１つ以上の追加の置換を含む。
【００９０】
具体的な実施形態では、変異体は、リパーゼ活性を有し、配列番号１と少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有し、番号付けのために配列番号１を用いた以下の置換のセットの１つに対応する置換を含むか又はそれからなる。
【００９１】

【表１】

E1C+H198L+N233C
E1C+H198G+N233C
E1C+L69V+N233C
E1C+L69T+N233C
E1C+L69S+N233C
E1C+L69H+N233C
E1C+L69F+N233C
E1C+L69C+N233C
E1C+H198Y+N233C
E1C+H198T+N233C
E1C+H198G+N233C
E1C+L227F+N233C
E1C+L227R+N233C
E1C+E210T+N233C
E1C+E210N+N233C
E1C+V176M+N233C
E1C+K98T+N233C
E1C+K98E+N233C
E1C+E56S+N233C
E1C+E56Q+N233C
E1C+E56R+N233C
E1C+F51M+N233C
E1C+D27R+F51Y+N233C
E1C+V2I+N233C
E1C+V2N+N233C
E1C+V2K+N233C
E1C+V2A+N233C
E1C+D96L+N233C
E1C+L69R+N233C
E1C+V2Y+N233C
E1C+N233C+P256T
E1C+N233C+D254S
E1C+T231R+N233C
E1C+H198S+N233C

【００９２】

【表２】

E1C+D111A+N233C
E1C+D96E+N233C
E1C+G38A+N233C
E1C+N33Q+N233C
E1C+N33K+N233C
E1C+E210A+N233C
E1C+E210Q+N233C
E1C+E210R+N233C
E1C+H198D+N233C
E1C+K98R+N233C
E1C+K98V+N233C
E1C+F51L+N233C
E1C+F51I+N233C
E1C+K237C
E1C+L227G+N233C
E1C+E210K+N233C
E1C+V176L+N233C
E1C+K98Q+N233C
E1C+E56K+N233C
E1C+L147S+N233C+D254S
E1C+Y220F+N233C
E1C+K98I+N233C
E1C+N233C
E1C+D27R+F51I+E56R+K98E+T231R+N233C
E1C+D27R+F51I+E56R+K98E+T231R+N233C+D254S
E1C+D27R+G38A+F51L+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+G38A+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+G38R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51L+D96I+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+G38A+F51I+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+

【００９３】

【表３】

D254S+P256T
E1C+D27R+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51V+D96I+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51V+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51V+D96E+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+F51V+D96I+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51V+K98I+D111A+G163K+H19S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51I+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+N33K+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C
E1C+G38R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+G38R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T

【００９４】

ｓｎ－２リパーゼ：ｓｎ－２リパーゼは、微生物、例えば、真菌又は細菌、特に、示された刊行物に記載されている以下の属及び種に由来するものであり得る：カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、Ｃ．ルゴサ（Ｃ．ｒｕｇｏｓａ）（Ｃ．シリンドラセア（Ｃ．ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）とも呼ばれる）、Ｃ．アンタークティカ（Ｃ．ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＡ又はＢ（国際公開第８８０２７７５号パンフレット）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、Ｐ．セパシア（Ｐ．ｃｅｐａｃｉａ）（国際公開第８９０１０３２号パンフレット）、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）（国際公開第９４１４９４０号パンフレット）。また、例えば、国際公開第９４０１５４１号パンフレットに記載されているように、示されたリパーゼの１つにおいて１つ以上のアミノ酸の置換、

欠失又は挿入によって得られる変異体であり得る。

【００９５】

好ましい実施形態では、ｓｎ－２リパーゼは、本明細書の配列番号３又は配列番号４のポリペプチドの成熟部分に対して少なくとも６０％、例えば、少なくとも７０％、例えば、少なくとも７５％、好ましくは、少なくとも８０％、より好ましくは、少なくとも８５％、より好ましくは、少なくとも９０％、より好ましくは、少なくとも９１％、より好ましくは、少なくとも９２％、さらにより好ましくは、少なくとも９３％、最も好ましくは、少なくとも９４％、さらに最も好ましくは、少なくとも９５％、例えば、さらに少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、例えば１００％の同一性を有し、好ましくは、モエゾマイセス（Ｍｏｅｓｚｉｏｍｙｃｅｓ）属の菌株、例えば、モエゾマイセス・アンタルクチクス（Ｍｏｅｓｚｉｏｍｙｃｅｓ　ａｎｔａｒｃｔｉｃｕｓ）（カンジダ・アンタルクチカ（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ））の菌株に由来する。

【００９６】

一実施形態では、ｓｎ－２リパーゼは、配列番号３若しくは配列番号４のアミノ酸配列又はその対立遺伝子変異体を含むか又はそれからなるか、或いはｓｎ－２位リパーゼ活性を有するその断片である。別の実施形態では、ｓｎ－２位リパーゼは、配列番号３若しくは配列番号４の成熟ポリペプチド、又は１つ以上の位置での置換、欠失、及び／又は挿入を含む配列番号３若しくは配列番号４の成熟ポリペプチドの変異体を含むか又はそれからなる。

【００９７】

より好ましい実施形態では、本発明に従って使用されるｓｎ－２リパーゼは、バシラス・ピュミルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｕｍｉｌｕｓ）の菌株、バシラス・ステアロサーモフィラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）の菌株 カンジダ・シリンドラセア（Ｃａｎｄｉｄａ　ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）の菌株、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）、特にカンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＡ（国際公開第８８／０２７７５号パンフレットに記載されているように得られる）に由来する。

【００９８】

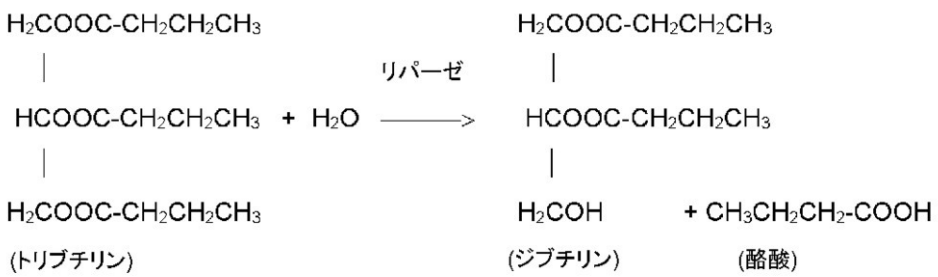
本発明のプロセスで使用するために好適な市販のリパーゼ調製物としては、ＬＩＰＯＺＹＭＥ（登録商標）ＴＬ　１００Ｌ、ＣＡＬＬＥＲＡ（商標）ＴＲＡＮＳ及びＥｖｅｒｓａ（登録商標）Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ、Ｅｖｅｒｓａ（登録商標）Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ ２．０、Ｎｏｖｏｃｏｒ　ＡＤＬ（全てＮｏｖｏｚｙｍｅｓ　Ａ／Ｓから入手可能）、又はそれらの混合物が挙げられる。

【００９９】

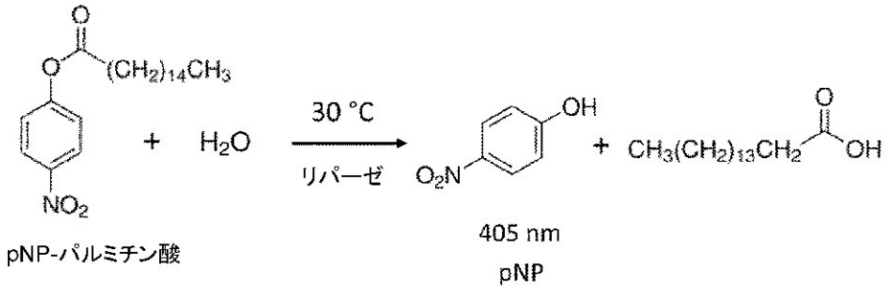
リパーゼ活性：

本発明の文脈では、脂肪分解活性は、基質としてトリブチラートを用いて、リパーゼ単位（ＬＵ）として決定され得る。本方法は、酵素によるトリブチリンの加水分解に基づくものであり、加水分解中ｐＨを一定に維持するためのアルカリ消費が時間の関数として記録される。

【化１】



【０１００】
１リパーゼ単位（ＬＵ）は、標準条件（即ち、３０℃、ｐＨ７．０、乳化剤として０．１％（ｗ／ｖ）アラビアゴム及び基質としての０．１６Ｍトリブチリンを用いて）下で、毎分１マイクロモルの滴定可能な酪酸を遊離する酵素の量として定義され得る。
【０１０１】
選択的に、脂肪分解活性は、ｐＨ８．０、３０℃でインキュベートされると、基質ｐＮＰ－パルミチン酸（Ｃ：１６）を用いて長鎖リパーゼ単位（ＬＣＬＵ）として決定され得、リパーゼは、エステル結合を加水分解し、黄色であり、４０５ｎｍで検出できるｐＮＰを放出する。
【化２】



【０１０２】
脂肪分解酵素の投与量
酵素の投与量は、本発明の目的のために、基質に対して反応混合物に添加された脂肪分解酵素の重量／重量パーセント（ｗ／ｗ％）として表される。例えば、１００ｇの油中の１０％の酵素は、１０ｇの酵素を添加したことになる。一般に、脂肪分解酵素の増加量は、転化時間が短縮されるが、経済的な観点から、酵素の投与量を減らして操作することが望ましい。
【０１０３】
所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルを製造するためのプロセスに関し、酵素組成物は、約０．０１～１．０ｇの酵素タンパク質（ＥＰ）／ｋｇの基質を投与される。
【０１０４】
酵素供給源及び製剤：本発明のプロセスで使用される２つ以上の脂肪分解酵素は、本明細書で言及される供給源のいずれかに由来し得るか、又はそれから入手可能であり得る。この文脈では、用語「由来する」は、酵素が元々存在する生物から単離され得ること、即ち、酵素のアミノ酸配列の同一性が、元の酵素と同一であることを意味する。用語「由来する」はまた、酵素が宿主生物において組換え製造され得ることを意味し、組換え製造される酵素は、元の酵素と同一の同一性を有するか、又は修飾されたアミノ酸配列、例えば、欠失、挿入及び／又は置換される１つ以上のアミノ酸、即ち、元のアミノ酸配列の変異及び／又は断片である組換え製造される酵素を有する。元の酵素の意味の中には、天然の変異体が含まれる。さらに、用語「由来する」は、例えば、ペプチド合成によって合成的に製造される酵素を含む。用語「由来する」はまた、インビボかインビトロかを問わず、例えば、グリコシル化、リン酸化などによって修飾された酵素も包含する。この文脈では、用語「入手可能」は、酵素が、元の酵素に同一のアミノ酸配列を有することを意味する。この用語は、元々存在する生物から単離された酵素、又は同種の生物若しくは別の生物で組換え発現されたもの、又は例えばペプチド合成によって合成的に製造された酵素を包含する。組換え製造された酵素に関して、用語「入手可能」及び「由来する」は、酵素の同一性を指し、組換え製造された宿主生物の同一性を指さない。
【０１０５】
したがって、２つ以上の脂肪分解酵素は、任意の好適な技術を使用することによって微生物から得られ得る。例えば、酵素調製物は、好適な微生物を発酵させ、その後、当該技

術分野で公知の方法によって、得られた発酵ブロス又は微生物から酵素調製物を単離することによって得られ得る。酵素はまた、組換えＤＮＡ技術を使用することによって得られ得る。そのような方法は通常、問題の酵素をコードするＤＮＡ配列を含み、そのＤＮＡ配列が酵素の発現を可能にする条件下で培養培地中で酵素を発現できるように適切な発現シグナルと操作可能に繋がっている組換えＤＮＡベクターで形質転換された宿主細胞を培養し、培養から酵素を回収することを含む。ＤＮＡ配列はまた、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。ＤＮＡ配列は、ゲノム起源、ｃＤＮＡ起源若しくは合成起源、又はこれらの任意の組み合わせであり得、当該技術分野で公知の方法に従って単離又は合成され得る。

【０１０６】

２つ以上の脂肪分解酵素は、任意の好適な製剤、例えば、凍結乾燥粉末又は液体／水溶液として適用され得る。

【０１０７】

さらに、本発明は、上記に記載される第１及び第２の脂肪分解酵素を用いて脂肪酸アルキルエステルを製造するバッチプロセス及び／又は連続的、段階的プロセスに関し、アルコールは、連続的及び／又は段階的に添加され、酵素は、リサイクルされるか、又は１回のみ使用される。酵素が水相にある場合、この相はデカンター、セトラー、又は遠心分離によって脂肪相から分離することができる。連続的プロセスにおいて、油相及び水相の２相をそれぞれ向流で処理することができる。

【０１０８】

脂肪分解酵素をコードするＤＮＡ配列のクローニング

親脂肪分解酵素をコードするＤＮＡ配列は、当該技術分野で周知の様々な方法を用いて、問題の脂肪分解酵素を製造する任意の細胞又は微生物から単離され得る。まず、研究すべき脂肪分解酵素を製造する生物からの染色体ＤＮＡ又はメッセンジャーＲＮＡを用いて、ゲノムＤＮＡ及び／又はｃＤＮＡライブラリーを構築すべきである。次いで、脂肪分解酵素のアミノ酸配列が公知である場合、標識化オリゴヌクレオチドプローブを合成し、これを使用して、問題の生物から調製したゲノムライブラリーから脂肪分解酵素をコードするクローンを同定することができる。選択的に、低いストリンジェンシイのハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件を用いて、プローブとして他の公知の脂肪分解酵素遺伝子に対して相同的である配列を含有する標識化オリゴヌクレオチドプローブを使用して、脂肪分解酵素をコードするクローンを同定することができる。

【０１０９】

脂肪分解酵素をコードするクローンを同定するさらに他の方法は、発現ベクター、例えば、プラスミドの中にゲノムＤＮＡ断片を挿入し、得られたゲノムＤＮＡライブラリーでクチナーゼ陰性細菌を形質転換し、次いで形質転換された細菌を脂肪分解酵素の基質（即ち、トリグリセリド）を含有する寒天上に配置し、それによって脂肪分解酵素を発現するクローンの同定を可能とすることを伴う。

【０１１０】

選択的に、酵素をコードするＤＮＡ配列は、確立された標準的な方法、例えば、Ｓ．Ｌ．Ｂｅａｕｃａｇｅ ａｎｄ Ｍ．Ｈ．Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ，（１９８１），Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２２，ｐ．１８５９－１８６９によって記載されるホスホロアミダイト方法、又はＭａｔｔｈｅｓ ｅｔ ａｌ．，（１９８４），ＥＭＢＯ Ｊ．３，ｐ．８０１－８０５に記載される方法によって合成的に調製され得る。ホスホロアミダイト法では、オリゴヌクレオチドを、例えば、自動ＤＮＡ合成装置により合成し、精製し、アニーリングし、連結し、適切なベクター中でクローニングする。

【０１１１】

最後に、ＤＮＡ配列は混合ゲノム及び合成起源、混合合成及びｃＤＮＡ起源又は混合ゲノム及びｃＤＮＡ起源であり得、合成、ゲノム又はｃＤＮＡ起源の断片（適宜、全ＤＮＡ配列の様々な部分に対応する断片）を標準的な技術に従って連結することによって調製される。ＤＮＡ配列はまた、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって、特異的プライマーを用いて、例えば、米国特許第４，６８３，２０２号明細書又はＲ．Ｋ．Ｓａｉｋｉ ｅ

ｔ ａｌ．，（１９８８），Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９，１９８８，ｐｐ．４８７－４９１に記載されるように調製され得る。

【０１１２】

発現ベクター

本発明の脂肪分解酵素をコードするＤＮＡ配列を担持する組換え発現ベクターは、組換えＤＮＡ手順に好都合に供され得る任意のベクターであり得、ベクターの選択は、それが導入される宿主細胞に依存することが多い。ベクターは、宿主細胞に導入されると、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体と共に複製されるものであり得る。好適な発現ベクターの例としては、ｐＭＴ８３８が挙げられる。

【０１１３】

本発明の発現ベクターはまた、好適な転写ターミネーター及び、真核生物において、本発明の脂肪分解酵素をコードするＤＮＡ配列に作用可能に接続されているポリアデニル化配列を含み得る。停止配列及びポリアデニル化配列は、プロモーターと同一の供給源に好適に由来し得る。

【０１１４】

ベクターは、問題の宿主細胞においてベクターの複製を可能とするＤＮＡ配列をさらに含み得る。そのような配列の例は、プラスミドｐＵＣ１９、ｐＡＣＹＣ１７７、ｐＵＢ１１０、ｐＥ１９４、ｐＡＭＢ１及びｐＩＪ７０２の複製の起源である。

【０１１５】

ベクターはまた、選択可能なマーカー、例えば、その産物が宿主細胞における欠陥を補足する遺伝子、例えば、Ｂ．サチリス（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）若しくはＢ．リケニホルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）からのｄａｌ遺伝子、又は抗生物質耐性、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール若しくはテトラサイクリンの耐性を与える遺伝子を含み得る。さらに、ベクターは、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）選択マーカー、例えば、ａｍｄＳ、ａｒｇＢ、ｎｉａＤ及びｓＣ、即ち、ハイグロマイシン（ｈｙｇｒｏｍｙｃｉｎ）耐性を生ずるマーカーを含み得るか、又は選択は、共形質転換によって、例えば、国際公開第９１／１７２４３号パンフレットに記載されているように達成され得る。

【０１１６】

それぞれクチナーゼ変異体をコードする本発明のＤＮＡ構築物、プロモーター、ターミネーター及び他の要素を連結し、複製に必要な情報を含有する好適なベクター中にそれらを挿入するために使用する手順は、当業者に周知である（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，１９８９を参照のこと）。

【０１１７】

プロモーター

ベクターにおいて、ＤＮＡ配列は、好適なプロモーター配列に作用可能に接続されているべきである。プロモーターは、選択の宿主細胞において、転写活性を示す任意のＤＮＡ配列であり得、宿主細胞に対して相同的又は異種的いずれかのタンパク質をコードする遺伝子に由来し得る。

【０１１８】

特に細菌宿主において、本発明の脂肪分解酵素をコードするＤＮＡ配列の転写を指令するために好適なプロモーターの例は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のｌａｃオペロンのプロモーター、ストレプトマイセス・ケリコロル（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｃｏｅｌｉｃｏｌｏｒ）アガロース遺伝子ｄａｇＡプロモーター、バシラス・リヘニフォルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）α－アミラーゼ遺伝子（ａｍｙＬ）のプロモーター、バシラス・ステアロサーモフィラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）マルトジェニックアミラーゼ遺伝子（ａｍｙＭ）のプロモーター、バシラス・アミロリクファシエンス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅ

ｎｓ）α－アミラーゼ（ａｍｙＱ）のプロモーター、バシラス・サチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）ｘｙｌＡ及びｘｙｌＢ遺伝子などのプロモーターである。真菌宿主における転写のために、有効なプロモーターの例は、Ａ．オリゼ（Ａ．ｏｒｙｚａｅ）ＴＡＫＡアミラーゼに由来するプロモーター、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（Ａｌｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８２），Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ　１，ｐ．４１９－４３４、リゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉ）アスパラギン酸プロテイナーゼ、Ａ．ニガー（Ａ．ｎｉｇｅｒ）中性α－アミラーゼ、Ａ．ニガー（Ａ．ｎｉｇｅｒ）酸安定性α－アミラーゼ、Ａ．ニガー（Ａ．ｎｉｇｅｒ）グルコアミラーゼ、リゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉ）リパーゼ、Ａ．オリゼ（Ａ．ｏｒｙｚａｅ）アルカリ性プロテアーゼ、Ａ．オリゼ（Ａ．ｏｒｙｚａｅ）トリオースリン酸イソメラーゼ、又はＡ．ニヅランス（Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ）アセトアミダーゼからのＴＰＩ（トリオースリン酸イソメラーゼ）プロモーターである。

【０１１９】

宿主細胞

上に定義される本発明のＤＮＡ構築物又は発現ベクターのいずれかを含む、本発明の細胞は、本発明の脂肪分解酵素の組換え製造において宿主細胞として好都合に使用される。脂肪分解酵素をコードする本発明のＤＮＡ構築物で、好都合に宿主染色体中にＤＮＡ構築物（１つ以上のコピーで）を組み込むことによって、細胞を形質転換することができる。組み込みは、一般に、ＤＮＡ配列が、細胞内に安定して維持される可能性がより高いため、有利であるとみなされる。宿主染色体中のＤＮＡ構築物の組み込みは、従来の方法に従って、例えば、相同的又は異種的組換えによって実施され得る。選択的に、細胞は、異なる型の宿主細胞に関して上記に記載される発現ベクターで形質転換され得る。

【０１２０】

本発明の細胞は、高等生物、例えば、哺乳動物又は昆虫の細胞、特に微生物細胞、例えば、細菌又は真菌（酵母を含む）細胞であり得る。

【０１２１】

好適な細菌の例は、グラム陽性細菌、例えば、バシラス・サチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、バシラス・リヘニフォルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）、バシラス・レンツス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｅｎｔｕｓ）、バシラス・ブレビス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｂｒｅｖｉｓ）、バシラス・ステアロサーモフィラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、バシラス・アルカロフィルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｌｋａｌｏｐｈｉｌｌｕｓ）、バシラス・アミロリクファシエンス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ）、バシラス・コアギュランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｏａｇｕｌａｎｓ）、バシラス・サーキュランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｉｒｃｕｌａｎｓ）、バシラス・ラウツス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌａｕｔｕｓ）、バシラス・メガテリウム（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ）、バシラス・スリンジェンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）又はストレプトマイセス・リビダンス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｌｉｖｉｄａｎｓ）若しくはストレプトマイセス・ムリヌス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｍｕｒｉｎｕｓ）、又はグラム陰性細菌、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）である。細菌の形質転換は、例えば、プロトプラスト形質転換により又はそれ自体公知の方法においてコンピテント細胞を使用することによって引き起こされ得る。

【０１２２】

酵母生物は、サッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）又はシゾサッカロマイセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）から好適に選択され得る。

【０１２３】

宿主細胞はまた、糸状真菌、例えば、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）の種、特にアスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）若しくはアス

ペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）に属する菌株、又はフザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）の菌株、例えば、フザリウム・オキシスポラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）、フザリウム・グラミネアラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）（完全な状態の名称ジッベレラ・セエ（Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ　ｚｅａｅ）、以前においてスフェリア・ゼエ（Ｓｐｈａｅｒｉａ　ｚｅａｅ）、ジッベレラ・ロゼウム（Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ　ｒｏｓｅｕｍ）及びジッベレラ・ロゼウム（Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ　ｒｏｓｅｕｍ）ｆ．種セレアリス（ｃｅｒｅａｌｉｓ）と同義）、又はフザリウム・スルフレウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｓｕｌｐｈｕｒｅｕｍ）（完全な状態の名称ジッベレラ・プリカリス（Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ　ｐｕｒｉｃａｒｉｓ）、フザリウム・トリコテキオイデス（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｔｒｉｃｈｏｔｈｅｃｉｏｉｄｅｓ）、フザリウム・バクトリジオイデス（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｂａｃｔｒｉｄｉｏｉｄｅｓ）、フザリウム・サムブシヌム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｓａｍｂｕｃｉｎｕｍ）、フザリウム・ロゼウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｒｏｓｅｕｍ）、及びフザリウム・ロゼウム変種グラミネアルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｒｏｓｅｕｍ　ｖａｒ．ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ）と同義）、フザリウム・セレアリス（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｃｅｒｅａｌｉｓ）（フザリウム・クロックウェレンセ（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｃｒｏｏｋｗｅｌｌｅｎｓｅ）と同義）、若しくはフザリウム・ベネナツム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ　ｖｅｎｅｎａｔｕｍ）の菌株であり得る。

【０１２４】

本発明の特定の態様では、宿主細胞は、プロテアーゼ欠乏菌株又はプロテアーゼマイナス菌株である。これは、例えば、名称「ａｌｐ」のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子が欠失したプロテアーゼ欠乏菌株アスペルギルス・オリゼ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）ＪａＬ１２５であり得る。この菌株は、国際公開第９７／３５９５６号パンフレット（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ）に記載されている。

【０１２５】

糸状真菌細胞は、それ自体知られている方法において、プロトプラストの形成及びプロトプラストの形質転換、続いて、細胞壁の再生を伴うプロセスによって形質転換され得る。宿主微生物としてのアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）の使用は、欧州特許第２３８０２３号明細書（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ　Ａ／Ｓ）（その内容が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１２６】

形質転換体の培養による脂肪分解酵素の製造

本発明は、とりわけ、本発明の脂肪分解酵素を製造する方法であって、脂肪分解酵素の製造を促す条件下に宿主細胞を培養し、細胞及び／又は培養培地から脂肪分解酵素を回収することを含む、方法に関する。

【０１２７】

細胞を培養するために使用される培地は、問題の宿主細胞を増殖させ、本発明の脂肪分解酵素の発現を得るために好適な任意の従来の培地であり得る。好適な培地は、商業的供給者から入手可能であるか、又は公開されている処方に従って調製され得る（例えば、米国培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）のカタログに記載されているように）。

【０１２８】

宿主細胞から分泌される脂肪分解酵素は、遠心又は濾過によって培地からの細胞の分離、及び塩、例えば、硫酸アンモニウムによる培地からのタンパク質成分の沈降、続いて、クロマトグラフィー手順、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの使用を含む周知の手順によって培養培地から好都合に回収され得る。

【０１２９】

酵素バイオディーゼルプロセス設計

反応／産物混合物の均一性、アルコールの溶解度、酵素の安定性、酵素の回収などの技術的問題を考慮しなければならないため、プロセスの設定は非常に重要である。考慮すべ

きプロセス設計はいくつかある：バッチ式撹拌タンク反応器及び連続式撹拌タンク反応器。これらについて以下のパラグラフに簡単に概説する。

【０１３０】

バッチプロセスは、セットアップが簡単なため、実験室で使用される典型的なプロセスである。本プロセスは、最初から全成分を添加する、即ちバルクで操作することができ、又は段階的及び／又は連続的なアルコールの添加が推奨されている。バッチプロセスは、酵素の生産性など、プロセスについてのデータを収集するのに有用である。この大規模なプロセス設定のマイナス要素は、必要なタンク容積が大きいこと、反応時間が長いこと、及びこのプロセスが連続的でないことである。考慮すべき別の非常に重要な事実は、再使用の回数が増加するにつれて酵素活性が徐々に低下していくことである。酵素活性が減少すると、一定の転化を維持するために、反応時間を適宜長くしなければならないか、又は活性の低下を補うために追加の酵素を添加することができる。

【０１３１】

連続式撹拌タンク反応器は、連続的にフィードを供給し、産物を取り出す容器である。この設計では、同じ反応時間で同程度の転化を確保するために、複数のタンクを直列に並べる必要があり、連続システムでの総滞留時間が増加するため、同様のバッチシステムに比べてタンク総容量が増加する可能性が高いことを意味する。そのような連続システムの利点は、空／充填に必要な時間がなくなるため、典型的にはプラントの能力が増加することである。連続式設計の別の利点は、形成されたグリセロールを連続的に除去するような分離工程をタンク間に導入できることである。さらに、連続システムは、入力パラメータが一定であると仮定した場合、ほとんどのプロセスパラメータがかなり一定に保たれる定常状態に到達する。これにより、反応時間を通して操作条件、特に成分濃度が自然に変化する進化型バッチシステムよりも優れた定常操作条件を提供することによって、酵素の最適操作を可能にする方法で連続システムを調整することができる。

【０１３２】

所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルを製造するプロセスに関し、前記プロセスは、バッチ式、連続式撹拌タンク反応器、及び他のものを含有するプロセス設計からなる群から選択される。

【０１３３】

バイオディーゼルの酵素製造のためのフィードストック

脂肪酸エチルエステルは、数種類の植物油から調製され得る。世界の植物油製造において、パーム油は、利益では首位を占め、他の植物油の収率と比較して、最も高い収率を有し、したがって、パーム油をバイオディーゼル製造の有利なフィードストックとして考慮することは、経済的に言えば直感的である。しかしながら、食用油は、余剰供給ではないため、ジャトロファ油などの非食用油の使用に賛成する意見もある。脂肪酸エチルエステルの製造に基質として使用するための植物油のフィードストックとして役立ち得る植物の例としては、例えば、ババス、ルリジサ、カノーラ、ココナッツ、トウモロコシ、綿、麻、ジャトロファ、カランジ、マスタード、パーム、ピーナッツ、菜種、米、大豆、及びヒマワリである。

【０１３４】

微細藻類は、植物に比べて微細藻類の光合成効率が高く、単位面積当たりの生産性が高い可能性があるため、バイオディーゼル製造のフィードストックともみなされる。

【０１３５】

選択的に、脂肪酸エチルエステルは、ラード、獣脂、バター脂及び鶏油又は海産物油などの動物の脂肪のような非植物フィードストックから調製され得る。

【０１３６】

バイオディーゼルのコストの６０～９０％は、フィードストック油のコストに起因すると推定されており、安価な廃油の利用は、バイオディーゼルのコスト削減に大きな影響を与える。加えて、廃油の低減及びリサイクルの重要な一歩とみなされる。新鮮な植物油及びその廃棄物は、水及び遊離脂肪酸の含有量が異なる。ディーゼル燃料の合成のための従

来の化学的ルートとは異なり、生体触媒ルートでは、遊離脂肪酸などの酸性不純物の存在下で、幅広い種類の油フィードストックのエステル交換反応を実行することができる。したがって、脂肪酸留出物（脱臭／脂肪酸ストリッピングから）、酸化油（化学石油精製におけるソープストック分割から）、廃油及び使用済み油は、バイオディーゼルの製造におけるフィードストックとして役立ち得る。

【０１３７】

したがって、フィードストックは、粗製の品質であるか、又はさらに処理（精製、漂白及び脱臭）することができる。好適な油及び脂肪は、純粋なトリグリセリド又は廃棄された植物油及び動物の脂肪の中に一般に見られるトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、及び遊離脂肪酸の混合物であり得る。フィードストックはまた、植物油脱臭留出物から得ることができる。フィードストック中の脂肪酸の種類は、植物及び動物の脂肪及び油にグリセリドとして天然に存在するものを含む。これらとしては、いくつかの例を挙げれば、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、パルミチン酸、ステリン酸、及びラウリン酸が挙げられる。粗製植物油中の微量成分は、典型的には、リン脂質、遊離脂肪酸及び部分的グリセリド、即ちモノグリセリド及びジグリセリドである。

【０１３８】

所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルを製造するプロセスに関し、基質は、ババス油、ボラージ油、カノーラ油、ココナッツ油、トウモロコシ油、綿油、麻油、ジャトロファ油、カランジ油、マスタード油、パーム油、ピーナッツ油、菜種油、米油、大豆油、及びヒマワリ油、微細藻類からの油、動物の脂肪、獣脂、ラード、バター脂肪、鶏油、海産物油、マグロ油、脂肪酸留出物、酸化油、廃油、使用済み油、部分的グリセリド及びそれらの任意の組み合わせを含有する群から選択される。

【０１３９】

脂肪酸エチルエステルの製造における脂肪分解酵素組成物の再使用

所定の実施形態では、本発明は、メタノールを、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸又はそれらの任意の組み合わせを含む基質と反応させることによって得られる脂肪酸エチルエステルの製造における酵素組成物の再使用に関し、基質中のメタノールの脂肪酸に対するモル比（ＭｅｔＯＨ：ＦＡ）は、約１．０～４．０当量であり、酵素の投与量が、基質に対して１％ｗ／ｗ（油に対する酵素タンパク質）未満であり、転化反応に使用した後の酵素が、得られた反応混合物から分離され、次の転化反応において修飾することなく直接再使用される。修飾とは、反応混合物から脂肪分解酵素を分離することとは別に、活性化、洗浄、乾燥などの任意の処理又は活性を意味する。

【０１４０】

所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルの製造における酵素組成物の再使用に関し、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼは、テルモマイセス・ラヌジノーサ（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ　ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）リパーゼ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）Ｂリパーゼ、カンジダ・デフォルマンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｄｅｆｏｒｍａｎｓ）リパーゼ、カンジダ・リポリティカ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）リパーゼ、カンジダ・パラプシローシス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）リパーゼ、カンジダ・ルゴサ（Ｃａｄｉｄａ　ｒｕｇｏｓａ）リパーゼ、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｓ－２リパーゼ、リゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｍｉｅｈｅｉ）リパーゼ、リゾムーコル・デレマー（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ　ｄｅｌｅｍａｒ）リパーゼ、ブルコルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）セパシア（ｃｅｐａｃｉａ）リパーゼ、シュードモナス・カメンベルティ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｃａｍｅｍｂｅｒｔｉｉ）リパーゼ、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）リパーゼ、ゲオトリクム・キャンディダム（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｉｕｍ　ｃａｎｄｉｄｕｍ）リパーゼ、ハイフォザイマ（Ｈｙｐｈｏｚｙｍａ）種リパーゼ、クレブシエラ・オキシトカ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｏｘｙｔｏｃａ）リパーゼ、及びそれらの変異体を含有する群から選択されるものからなる群から選択され

る。
【０１４１】
所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルの製造における酵素組成物の再使用に関し、酵素組成物は、０．０１～１．０ｇの酵素タンパク質（ＥＰ）／ｋｇの範囲内の基質を投与される。
【０１４２】
所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルの製造における酵素組成物の再使用に関し、メタノールは、連続的又は段階的に添加される。
【０１４３】
所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルの製造における酵素組成物の再使用に関し、前記プロセスは、バッチ式、連続式撹拌タンク反応器、及び他のものを含有するプロセス設計からなる群から選択される。
【０１４４】
所定の実施形態では、本発明は、脂肪酸エチルエステルの製造における酵素組成物の少なくとも再使用に関し、基質は、ババス油、ボラージ油、カノーラ油、ココナッツ油、トウモロコシ油、綿油、麻油、ジャトロファ油、カランジ油、マスタード油、パーム油、ピーナッツ油、菜種油、米油、大豆油、及びヒマワリ油、微細藻類からの油、動物の脂肪、獣脂、ラード、バター脂肪、鶏油、海産物油、マグロ油、脂肪酸留出物、酸化油、廃油、使用済み油、部分的グリセリド及びそれらの任意の組み合わせを含有する群から選択される。
【０１４５】
本発明の所定の実施形態では、酵素組成物の再使用は、反応から生じる重相の全部又は一部を再循環させることによって容易にされる。特に、液体酵素組成物製剤の場合、酵素組成物は、ほとんど全て重相で見つかり、例えば遠心分離又はデカンテーションなどの重力沈降原理による軽相及び重相の分離によって再使用できる。
【０１４６】
本発明を以下の付番されたパラグラフに記載する。
【０１４７】
１．脂肪酸アルキルエステルを製造するためのプロセスであって、
ａ）トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸、又はそれらの任意の組み合わせを含む基質を提供する工程と、
ｂ）基質を、ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む酵素組成物と反応させ、脂肪酸アルキルエステルを製造する工程と
を含む、プロセス。
【０１４８】
２．酵素又は酸の存在下でのけん化及び／又はエステル化、続いて、分離及び任意選択でグリセロールの回収によって、工程ｂ）において製造される脂肪酸アルキルエステル中の遊離脂肪酸の還元をさらに含む、パラグラフ１に記載のプロセス。
【０１４９】
３．アルコール及び任意選択で水が、工程ｂ）中に添加される、パラグラフ１又は２に記載のプロセス。
【０１５０】
４．前記アルコールが、Ｃ１－Ｃ５アルコール、好ましくは、メタノール、エタノール、プロパノール、又はそれらの混合物である、パラグラフ１～３のいずれか１つに記載のプロセス。
【０１５１】
５．基質中のメタノールの脂肪酸に対するモル比（ＭｅｔＯＨ：ＦＡ）が、約１．０～４．０モル当量、例えば、１．３～３．５モル当量、例えば、１．５～２．５当量である、パラグラフ１～４のいずれか１つに記載のプロセス。
【０１５２】

６．プロセスが、バッチ又は連続的モードで進行中である、パラグラフ１～５のいずれか１つに記載のプロセス。

【０１５３】

７．基質が、藻類油、カノーラ油、ヤシ油、ヒマシ油、ヤシ油、コプラ油、トウモロコシ油、蒸留トウモロコシ油、綿実油、亜麻油、魚油、ブドウ種子油、麻油、ジャトロファ油、ホホバ油、マスタード油、カノーラ油、パーム油、パームステアリン、パームオレイン、パーム核油、ピーナッツ油、菜種油、米ぬか油、サフラワー油、大豆油、ヒマワリ油、トール油、塩生植物からの油、及び／又はブタ、ウシ、及びヒツジ由来の獣脂、ラード、鶏脂、魚油を含む動物の脂肪、パーム油遊離脂肪酸留出物、大豆油遊離脂肪酸留出物、ソープストック脂肪酸材料、黄色グリース、使用済み調理油、パーム油工場廃液、及び褐色グリース、又はそれらの任意の組み合わせのうちの１つ以上に由来する、パラグラフ１～６のいずれか１つに記載のプロセス。

【０１５４】

８．工程ｂ）の総時間が、バッチプロセスでは、５～７２時間、例えば１０～７０時間、例えば１２～６８時間、例えば１８～６０時間、例えば２４～４８時間である、パラグラフ１～７のいずれか１つに記載のプロセス。

【０１５５】

９．工程ｂ）の総時間が、連続的プロセスでは、５～８０時間、例えば１０～７５時間、例えば１２～７２時間、例えば１８～６０時間、例えば２４～４８時間である、パラグラフ１～８のいずれか１つに記載のプロセス。

【０１５６】

１０．任意選択で、工程ｂ）で添加される水の量が、総基質の０．０１％～１０％の範囲である、パラグラフ１～９のいずれか１つに記載のプロセス。

【０１５７】

１１．前記基質中の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は例えば少なくとも９５％の脂肪酸アシル基又は遊離脂肪酸が、脂肪酸アルキルエステルに転化されている、パラグラフ１～１０のいずれか１つに記載のプロセス。

【０１５８】

１２．ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼを含む脂肪酸アルキルエステルを製造するための酵素組成物。

【０１５９】

１３．ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼが、微生物起源のもの、特に真菌又は細菌起源のものである、パラグラフ１２に記載の組成物。

【０１６０】

１４．ｓｎ－１，３位リパーゼ及びｓｎ－２位リパーゼが、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）リパーゼ、アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）リパーゼ、テルモマイセス・ラヌジノーサ（Ｔｈｅｒｍｏｍｙｃｅｓ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）リパーゼ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＡ、カンジダ・アンタークティカ（Ｃａｎｄｉｄａ Ａｎｔａｒｃｔｉｃａ）リパーゼＢ、カンジダ・シリンドラセア（Ｃａｎｄｉｄａ ｃｙｌｉｎｄｒａｃｅａ）リパーゼ、カンジダ・デフォルマンス（Ｃａｎｄｉｄａ ｄｅｆｏｒｍａｎｓ）リパーゼ、カンジダ・リポリティカ（Ｃａｎｄｉｄａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）リパーゼ、カンジダ・パラプシローシス（Ｃａｎｄｉｄａ ｐａｒａｐｓｉｌｏｓｉｓ）リパーゼ、ムーコル・ミーヘイ（Ｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉ）、カンジダ・ルゴサ（Ｃａｄｉｄａ ｒｕｇｏｓａ）リパーゼ、コリネバクテリウム・アクネ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｎｅｓ）リパーゼ、フミコラ・ラヌジノーサ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ ｌａｎｕｇｉｎｏｓａ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｓ－２リパーゼ、フザリウム・クルモルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｃｕｌｍｏｒｕｍ）リパーゼ、フザリウム・ヘテロスポルム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｈｅｔｅｒｏｓｐｏｒｕｍ）リパーゼ、フザリウム・オキシスポラム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）リパーゼ、ムコールジャパニカス（

Ｍｕｃｏｒｊａｖａｎｉｃｕｓ）リパーゼ、リゾムーコル・ミーヘイ（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｍｉｅｈｅｉ）リパーゼ、リゾムーコル・デレマー（Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ ｄｅｌｅｍａｒ）リパーゼ、ブルコルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ）シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）セパシア（ｃｅｐａｃｉａ）リパーゼ、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）種ＡＴＣＣ ２１８０８、シュードモナス・カメンベルティ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃａｍｅｍｂｅｒｔｉｉ）リパーゼ、シュードモナス・フルオレッセンス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）リパーゼ、リゾプス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）リパーゼ、リゾプス・アリツス（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ａｒｒｈｉｚｕｓ）リパーゼ、スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）リパーゼ、ゲオトリクム・キャンディダム（Ｇｅｏｔｒｉｃｈｉｕｍ ｃａｎｄｉｄｕｍ）リパーゼ、ハイフォザイマ（Ｈｙｐｈｏｚｙｍａ）種リパーゼ、クレブシエラ・オキシトカ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｏｘｙｔｏｃａ）リパーゼからなる群から選択される、パラグラフ１２又は１３に記載の組成物。

【０１６１】

１５．ｓｎ－１，３位リパーゼが、

ｉ）配列番号１に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼ、

ｉｉ）配列番号１に示されるリパーゼに対して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有するリパーゼ活性を有する親リパーゼの変異体、

ｉｉｉ）リパーゼ活性を有する（ｉ）又は（ｉｉ）のリパーゼの断片、である、パラグラフ１２～１４のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６２】

１６．ｓｎ－１，３位リパーゼが、Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ及び任意選択で配列番号１のＤ９６Ｅ、Ｄ１１１Ａ、Ｄ２５４Ｓ、Ｇ１６３Ｋ、Ｐ２５６Ｔ、Ｇ９１Ｔ及びＧ３８Ａの少なくとも１つ以上（例えば、複数）に対応する位置での置換を含む変異体である、パラグラフ１２～１５のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６３】

１７．ｓｎ－１，３位リパーゼが、親リパーゼの変異体であり、変異体が、配列番号１と少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有するリパーゼ活性を有し、Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ及び

ａ．Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、

ｂ．Ｎ３３Ｑ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、

ｃ．Ｎ３３Ｑ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ、

ｄ．Ｎ３３Ｑ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、

ｅ．Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ、

ｆ．Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、

ｇ．Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、

ｈ．Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ、

ｉ．Ｄ２７Ｒ＋Ｎ３３Ｑ＋Ｇ３８Ａ＋Ｇ９１Ｔ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ

231R+N233R+D254S、
j．D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
k．D96E+T231R+N233R+D254S、
l．T231R+N233R+D254S+P256T、
m．G163K+T231R+N233R+D254S、
n．D27R+N33Q+G38A+G91T+D96E+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
o．D27R+G91T+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
p．D96E+G163K+T231R+N233R+D254S、
q．D27R+G163K+T231R+N233R+D254S、
r．D27R+G38A+G91T+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S、
s．D27R+G38A+G91T+D96E+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
t．D27R+G38A+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
u．D27R+D96E+G163K+T231R+N233R+D254S、
v．D27R+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
w．D27R+G38A+D96E+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T
x．D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
y．D111A+T231R+N233R、
z．D111A+T231R+N233R+D254S+P256T、
aa．D27R+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R、
bb．D27R+D96E+D111A+T231R+N233R、
cc．D27R+N33Q+G38A+D96E+D111A+T231R+N233R+D254S+P256T、
dd．D27R+G38A+D96E+D111A+G163K+E210Q+T231R+N233R+D254S+P256T、
ee．D27R+T231R+N233R+D254S+P256T、
ff．D96E+D111A+G163K+T231R+N233R、
gg．D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
hh．D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+P256T、
ii．D96E+D111A+T231R+N233R、
jj．D96E+D111A+T231R+N233R+D254S、
kk．D96E+D111A+T231R+N233R+D254S+P256T
ll．D96E+D111A+T231R+N233R+P256T、
mm．D96E+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
nn．D96E+T231R+N233R+D254S+P256T、
oo．D96E+T231R+N233R+P256T、
pp．G38A+D96E+D111A+T231R+N233R、
qq．G91T+D96E+D111A+G163K+T231R+N233R+D254S+P256T、
rr．G91T+D96E+D111A+T231R+N233R、
ss．G91T+D96E+T231R+N233R、
tt．G91T+T231R+N233R+D254S+P256T、

ｕｕ．Ｎ３３Ｑ＋Ｄ９６Ｅ＋Ｄ１１１Ａ＋Ｇ１６３Ｋ＋Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
ｖｖ．Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｄ２５４Ｓ＋Ｐ２５６Ｔ、
ｗｗ．Ｔ２３１Ｒ＋Ｎ２３３Ｒ＋Ｐ２５６Ｔ
からなる群から選択される配列番号１のＤ９６Ｅ、Ｄ１１１Ａ、Ｄ２５４Ｓ、Ｇ１６３Ｋ、Ｐ２５６Ｔ、Ｇ９１Ｔ及びＧ３８Ａの少なくとも１つ以上（例えば、複数）に対応する位置での置換を含む、パラグラフ１２～１６のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６４】

１８．ｓｎ－１，３位リパーゼが、親リパーゼの変異体であり、前記変異体が、
（ａ）配列番号１のＥ１、Ｖ２、Ｎ３３、Ｆ５１、Ｅ５６、Ｌ６９、Ｋ９８、Ｖ１７６、Ｈ１９８、Ｅ２１０、Ｙ２２０、Ｌ２２７、及びＫ２３７位に対応する少なくとも１つの位置において修飾を含み、任意選択で、配列番号１のＤ２７、Ｇ３８、Ｄ９６、Ｄ１１１、Ｇ１６３、Ｔ２３１、Ｎ２３３、Ｄ２５４、及びＰ２５６位に対応する少なくとも１つの位置において修飾をさらに含み、
（ｂ）配列番号１に対して少なくとも６０％であるが、１００％未満の配列同一性を有し、
（ｃ）リパーゼ活性を有する
パラグラフ１２～１７のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６５】

１９．前記ｓｎ－１，３位リパーゼ変異体が、以下の位置：Ｅ１、Ｖ２、Ｄ２７、Ｎ３３、Ｇ３８、Ｆ５１、Ｅ５６、Ｌ６９、Ｄ９６、Ｋ９８、Ｄ１１１、Ｇ１６３、Ｖ１７６、Ｈ１９８、Ｅ２１０、Ｙ２２０、Ｌ２２７、Ｔ２３１、Ｎ２３３、Ｋ２３７、Ｄ２５４、及びＰ２５６のうちの少なくとも１つにおいて修飾を含み、番号付けが、配列番号１に従う、パラグラフ１２～１８のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６６】

２０．前記ｓｎ－１，３位リパーゼ変異体が、以下の修飾：Ｅ１Ｃ、Ｖ２Ｙ、Ｄ２７Ｒ、Ｎ３３Ｋ、Ｎ３３Ｑ、Ｇ３８Ａ、Ｆ５１Ｖ、Ｅ５６Ｋ、Ｌ６９Ｒ、Ｄ９６Ｅ、Ｄ９６Ｌ、Ｋ９８Ｉ、Ｋ９８Ｑ、Ｄ１１１Ａ、Ｇ１６３Ｋ、Ｖ１７６Ｌ、Ｈ１９８Ｓ、Ｅ２１０Ｋ、Ｙ２２０Ｆ、Ｌ２２７Ｇ、Ｔ２３１Ｒ、Ｎ２３３Ｒ、Ｎ２３３Ｃ、Ｋ２３７Ｃ、Ｄ２５４Ｓ、及びＰ２５６Ｔのうちの少なくとも１つを含み、番号付けが、配列番号１に従う、パラグラフ１８又は１９に記載の組成物。

【０１６７】

２１．前記ｓｎ－１，３位リパーゼ変異体が、Ｓ５４Ｔ、Ｓ８３Ｔ、Ｇ９１Ａ、Ａ１５０Ｇ、Ｉ２５５Ａ、及びＥ２３９Ｃからなる群から選択される置換のうちの１つをさらに含み、番号付けが、配列番号１に従う、パラグラフ１８～２０のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６８】

２２．ｓｎ－１，３位リパーゼ変異体が、置換Ｅ１Ｃ＋Ｎ２３３Ｃ及び１つ以上の追加の置換を含み、番号付けが、配列番号１に従う、パラグラフ１８～２１のいずれか１つに記載の組成物。

【０１６９】

２３．ｓｎ－１，３位リパーゼが、リパーゼ活性を有し、配列番号１と少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有し、番号付けのために配列番号１を用いた以下の置換のセットの１つに対応する置換を含むか又はそれからなる、パラグラフ１８～２２のいずれか１つに記載の組成物。

【０１７０】

【表４】

E1C+H198L+N233C
E1C+H198G+N233C
E1C+L69V+N233C
E1C+L69T+N233C
E1C+L69S+N233C
E1C+L69H+N233C
E1C+L69F+N233C
E1C+L69C+N233C
E1C+H198Y+N233C
E1C+H198T+N233C
E1C+H198G+N233C
E1C+L227F+N233C
E1C+L227R+N233C
E1C+E210T+N233C
E1C+E210N+N233C
E1C+V176M+N233C
E1C+K98T+N233C
E1C+K98E+N233C
E1C+E56S+N233C
E1C+E56Q+N233C
E1C+E56R+N233C
E1C+F51M+N233C
E1C+D27R+F51Y+N233C
E1C+V2I+N233C
E1C+V2N+N233C
E1C+V2K+N233C
E1C+V2A+N233C
E1C+D96L+N233C
E1C+L69R+N233C
E1C+V2Y+N233C
E1C+N233C+P256T
E1C+N233C+D254S
E1C+T231R+N233C
E1C+H198S+N233C

【０１７１】

【表５】

E1C+D111A+N233C
E1C+D96E+N233C
E1C+G38A+N233C
E1C+N33Q+N233C
E1C+N33K+N233C
E1C+E210A+N233C
E1C+E210Q+N233C
E1C+E210R+N233C
E1C+H198D+N233C
E1C+K98R+N233C
E1C+K98V+N233C
E1C+F51L+N233C
E1C+F51I+N233C
E1C+K237C
E1C+L227G+N233C
E1C+E210K+N233C
E1C+V176L+N233C
E1C+K98Q+N233C
E1C+E56K+N233C
E1C+L147S+N233C+D254S
E1C+Y220F+N233C
E1C+K98I+N233C
E1C+N233C
E1C+D27R+F51I+E56R+K98E+T231R+N233C
E1C+D27R+F51I+E56R+K98E+T231R+N233C+D254S
E1C+D27R+G38A+F51L+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+G38A+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+G38R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51L+D96I+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+G38A+F51I+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+

【０１７２】

【表６】

D254S+P256T
E1C+D27R+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+D27R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51V+D96I+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51V+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51V+D96E+K98I+D111A+G163S+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+P256T
E1C+F51V+D96I+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51V+K98I+D111A+G163K+H19S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51I+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+F51L+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+N33K+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C
E1C+G38R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+G38A+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T
E1C+D27R+G38R+F51V+D96E+K98I+D111A+G163K+H198S+Y220F+T231R+N233C+D254S+P256T.

【０１７３】

２４．ｓｎ－１，３位リパーゼが、

ｉ）配列番号２に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼ、

ｉｉ）配列番号２に示されるリパーゼに対して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、

少なくとも９８％、又は少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有するリパーゼ活性を有する変異体、
ｉｉｉ）リパーゼ活性を有する（ｉ）又は（ｉｉ）のリパーゼの断片
である、パラグラフ１２～２３のいずれか１つに記載の組成物。
【０１７４】
２５．ｓｎ－２位リパーゼが、
ｉ）配列番号３に対して少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％、又は１００％の配列同一性を有するリパーゼ、
ｉｉ）配列番号３に示されるリパーゼに対して少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％であるが、１００％未満の配列同一性を有するリパーゼ活性を有する変異体、
ｉｉｉ）リパーゼ活性を有する（ｉ）又は（ｉｉ）のリパーゼの断片
である、パラグラフ１２に記載の組成物。
【０１７５】
２６．前記酵素組成物の総量が、０．０１～１．０ｇの酵素タンパク質（ＥＰ）／ｋｇの基質の範囲内である、パラグラフ１２～２５のいずれか１つに記載の組成物。
【０１７６】
２７．脂肪酸アルキルエステルを製造するための、パラグラフ１２～２６のいずれか１つに記載の酵素組成物の使用。
【実施例】
【０１７７】
実施例１：Ｎｏｖｏｃｏｒ ＡＤＬ（ＣａｌＡ製剤）（配列番号３）と組み合わされたＥｖｅｒｓａ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ（ＥＴ）２．０（配列番号１）の組み合わせを試験する。両方の酵素ともＮｏｖｏｚｙｍｅｓ、Ｄｅｎｍａｒｋ製。
３０ｇの粗製パーム油（ＣＰＯ）又は粗製パーム核油（ＣＰＫＯ）、ＮａＯＨ（ＣＰＯの場合１０ｐｐｍ、ＣＰＫＯの場合５０ｐｐｍ）、２．５％の水、ＭｅＯＨ １．７当量、開始時から０．３当量、２０時間の間に１．４当量。
【０１７８】
酵素組成物：
１：０，１％のＥＴ２．０ＨＳ、
２：０，０８％のＥＴ２．０ＨＳ＋ＣａｌＡ当量～０，０２％のＥＴ２．０、
３：０，０６％のＥＴ２．０ＨＳ＋ＣａｌＡ当量～０，０４％のＥＴ２．０ＨＳ、
ＮＢは低酵素の投与量０．１％のＥＴ２．０ＨＳ。
【０１７９】
試料をダブレットで作成する。４０℃、インキュベーター２５０ｒｐｍで振とう。それぞれ１、３、２０及び２４時間でサンプリング。ＤＧ、相対グリセリド組成物の分析、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ製のＱＴＡ上で、較正Ｂ－１００（ＡＯＣＳ方法ＣＫ２－０９に従った方法）（２４時間試料）によって分析し、２４時間試料のＦＦＡ％は滴定によって測定。試料は、スピード真空で乾燥させる。
ＥＴ ＨＳ３．９％活性酵素－タンパク質（３９ｍｇ／ｍＬ）
Ｎｏｖｏｃｏｒ（ＣａｌＡ）ＡＤＬ １．６５％ 活性酵素－タンパク質。
０．２４３％ Ｎｏｖｏｃｏｒ（ＣａｌＡ）ＡＤＬ＝０．１％ ＥＴ２．０ＨＳ
【０１８０】

【表７】

QTA B100				
試料 24 時間	MG, % 平均	DG, % 平均	TG, % 平均	FAME, % 平均
1: CPO – 0,1%の et2.0 HS	6,0	3,1	1,9	74,0
2: CPO – 0,08%の ET2.0 HS + CalA 当量～0,02%の ET2.0	4,8	2,9	1,8	77,3
3: CPO - 0,06%の ET2.0 HS + CalA 当量～0,04%の ET2.1	4,7	2,7	1,6	78,5
4: CPKO - 0,1%の ET2.0 HS	7,88	>5,5	異常値	*87,53
5: CPKO – 0,08%の ET2.0 HS + CalA 当量～0,02%の ET2.0	6,226	4,987	異常値	*92,72
6: CPKO – 0,06%の ET2.0 HS + CalA 当量～0,04%の ET2.1	9,666	異常値	異常値	*80,51

【０１８１】

【表８】

FFA, %	
試料 24 時間	FFA, % 平均
1: CPO - 0,1%の ET2.0 HS	2.3
2: CPO - 0,08%の ET2.0 HS + CalA 当量~0,02%の ET2.0	2.1
3: CPO - 0,06%の ET2.0 HS + CalA 当量~0,04%の ET2.1	2.2
4: CPKO - 0,1%の ET2.0 HS	3.5
5: CPKO - 0,08%の ET2.0 HS + CalA 当量~0,02% ET2.0	3.3
6: CPKO - 0,06%の ET2.0 HS + CalA 当量~ 0,04% ET2.1	4.1

【０１８２】

結果は、ＣＰＯの場合、ＣａｌＡ置換の増加に伴うより良い転化を示し、ＣＰＫＯの場合、２０％の置換のみが良好な転化を示したが、４０％の置換は純粋なＥＴと同様であった。

【０１８３】

実施例２：反応終了時の総グリセリドに重点を置いた様々なフィードストック：

様々な品質の脂肪酸フィードストック３０ｇ。ＰＯＭＥ及びＵＣＯは、典型的には、初期ＦＦＡレベルが高い低品質のフィードストックであるのに比べて、ＣＰＫＯ及びＣＰＯは、比較的高品質のトリグリセリド油である。

【０１８４】

初期ＦＦＡが高いということは、エンドポイント反応混合物中の水が多いことになり、したがって平衡でのＦＦＡが高くなる。

【０１８５】

酵素混合物に２％の水を添加する。混合物中の総酵素タンパク質は、全ての場合において同様であり、０．２％のＥＴ２．０を用いて投与された酵素の量に対応する。

【０１８６】

ｔ＝３０時間でＮＩＲ（ＱＴＡ，Ｅｕｒｏｆｉｎｓ、Ｂ１００法）を用いた濃度測定

ＣＰＫＯ及びＣＰＯの場合、低ＭｅＯＨ投与量（１．６当量）及び低速の２０時間の投与速度が最適であり、以下に報告されている。

ＰＯＭＥ及びＵＣＯの場合、高ＭｅＯＨ投与量（２．２当量）及び高速の１０時間の投与

速度が最適であり、以下に報告されている。

【０１８７】

【表９】

CPKO	FAME	FFA	総グリセリド
100%の ET	100	2,6	2,8
80/20 ET/CalA	100	2,5	1,5

注:QTA 方法は、CPKO の FAME に対して有意な偏差を有することが知られている。

【０１８８】

【表１０】

CPO	FAME	FFA	総グリセリド
100%の ET	93,3	1,8	2,2
80/20 ET/CalA	95,9	1,7	0,5

【０１８９】

【表１１】

POME	FAME	FFA	総グリセリド
100%の ET	90,4	3,8	0,4
80/20 ET/CalA	90,7	3,9	0

【０１９０】

【表１２】

UCO	FAME	FFA	総グリセリド
100%の ET	88,6	3,2	0,9
80/20 ET/CalA	88,8	3,2	0,5

【０１９１】

一般に、ＥＴ／ＣＡＬＡ混合物を用いると、総グリセリドレベルは低下する。

【０１９２】

実施例３：配列番号４対配列番号３の比較：

２％の水、５０ｐｐｍの水酸化ナトリウムとの標準的なバイオディーゼル反応。１．７当量メタノールを、２０時間にわたって投与。１００ｍＬの角型ブルーキャップフラスコ中の３０ｇのＣＰＯを、３５Ｃ、２５０ｒｐｍの振とうインキュベーターでインキュベートした。標準化された酵素タンパク質質量の投与量としての配列番号１の酵素の０．２％は、全ての試験で合計２．３４ｍｇの酵素タンパク質である。８０／２０　配列番号１／配列番号３（タンパク質質量ベース）、又は配列番号１／配列番号４（タンパク質質量ベース）。試料を重複して作成する。

【０１９３】

【表１３】

酵素	#	時間	MG wt%	DG wt%	TG wt%
100% 配列番号 1 1.7 当量 MeOH/20 時間	1	20 時間	2.39	3.74	3.11
		22 時間	2.35	1.29	1.00
		24 時間	1.63	1.03	0.75
80%配列番号 1/20%配列番号 3 1.7 当量 MeOH/20 時間	1	20 時間	1.81	2.32	1.37
		22 時間	1.79	1.06	0.74
		24 時間	1.30	0.86	0.65
	2	20 時間	2.35	1.34	1.11
		22 時間	1.82	1.15	0.83
		24 時間	1.38	0.83	0.59
80%配列番号 1/20%配列番号 4 1.7 当量 MeOH/20 時間	1	20 時間	3.12	1.82	1.25
		22 時間	2.46	1.48	1.01
		24 時間	1.95	1.18	0.77
	2	20 時間	3.86	1.77	1.14
		22 時間	2.69	1.69	1.07
		24 時間	2.15	1.28	0.88

【０１９４】

平衡から最も遠い２０時間の試料を考慮すると、配列番号３は、配列番号１単独に比べて反応速度を増加させ、配列番号３は、配列番号４よりも改善をもたらすことが明らかである。次いで、２４時間の試料を考慮すると、配列番号３は、配列番号４及び配列番号１単独に比べて改善をもたらす。配列番号１単独は、２４時間の反応時間で配列番号４より優れており、平衡に近いことを意味し、配列番号４の格別のエステル化能力が結果に悪影響を及ぼし得る。したがって、配列番号３は、好ましい。

【０１９５】

本明細書に記載され、且つ特許請求される本発明は、開示される本明細書の特定の態様による範囲に限定されるべきではなく、なぜなら、これらの態様は、本発明のいくつかの態様の例示であることが意図されているためである。任意の均等な態様が本発明の範囲内であることが意図される。実際に、本明細書に示され、記載されるものに追加した本発明の様々な変更形態が前述の記載から当業者に明らかとなるであろう。そのような変更形態も添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。競合する場合、定義を含む本開示が優先されることとなる。

【配列表】

<u>2025513557000001.xml</u>

【国際調査報告】

International application No.
PCT/EP2023/061073

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P7/649 C07K14/40 C07K14/39 C12R1/72
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P C12R C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 225 385 B1 (TRANS BIO DIESEL LTD [IL]) 16 April 2014 (2014-04-16)	1-10
Y	the whole document	1-10
X	WO 2006/072256 A2 (NOVOZYMES AS [DK]; ABO MASANOBU [JP] ET AL.) 13 July 2006 (2006-07-13)	1-10
Y	the whole document	1-10

-/--

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 September 2023	13/09/2023

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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061073

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAN JINYONG ET AL: "Efficient production of biodiesel from waste grease: One-pot esterification and transesterification with tandem lipases", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 123, 4 August 2012 (2012-08-04), pages 332-337, XP055974780, AMSTERDAM, NL ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.103	1-10
Y	the whole document	1-10

Y	WO 2021/037878 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 4 March 2021 (2021-03-04) SEQ ID NO:1 is 100% identical to SEQ ID NO:1; the whole document	1-10

Y	WO 2019/154954 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 15 August 2019 (2019-08-15) SEQ ID NO:2 is 100% identical to SEQ ID NO:2; the whole document	1-10

Y	WO 2012/146937 A1 (FRITO LAY TRADING CO GMBH [CH]; BORNSCHEUER UWE [DE] ET AL.) 1 November 2012 (2012-11-01) SEQ ID NO:3 is 100% identical to SEQ ID NO:3; the whole document	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/061073

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2225385 B1	16-04-2014	AU 2008331092 A1	04-06-2009
		BR PI0820646 A2	04-11-2014
		CA 2706972 A1	04-06-2009
		CN 101932717 A	29-12-2010
		CY 1115205 T1	04-01-2017
		DK 2225385 T3	14-07-2014
		EP 2225385 A2	08-09-2010
		ES 2469790 T3	20-06-2014
		JP 5737943 B2	17-06-2015
		JP 2011504745 A	17-02-2011
		KR 20100098421 A	06-09-2010
		RU 2010126177 A	10-01-2012
		US 2009133322 A1	28-05-2009
		WO 2009069116 A2	04-06-2009
		ZA 201003980 B	30-03-2011
WO 2006072256 A2	13-07-2006	AT 503019 T	15-04-2011
		BR PI0606389 A2	23-08-2011
		CA 2593282 A1	13-07-2006
		CN 101103118 A	09-01-2008
		EP 1838860 A2	03-10-2007
		ES 2363094 T3	20-07-2011
		JP 5133701 B2	30-01-2013
		JP 2008526217 A	24-07-2008
		US 2008113419 A1	15-05-2008
		US 2011201066 A1	18-08-2011
		WO 2006072256 A2	13-07-2006
WO 2021037878 A1	04-03-2021	CN 114555769 A	27-05-2022
		EP 4022020 A1	06-07-2022
		WO 2021037878 A1	04-03-2021
WO 2019154954 A1	15-08-2019	CN 111757930 A	09-10-2020
		CN 111788305 A	16-10-2020
		CN 111801416 A	20-10-2020
		EP 3749758 A1	16-12-2020
		EP 3749759 A1	16-12-2020
		EP 3749760 A1	16-12-2020
		US 2021071155 A1	11-03-2021
		US 2021071156 A1	11-03-2021
		US 2021071157 A1	11-03-2021
		WO 2019154952 A1	15-08-2019
		WO 2019154954 A1	15-08-2019
		WO 2019154955 A1	15-08-2019
WO 2012146937 A1	01-11-2012	EP 2702151 A1	05-03-2014
		US 2012276247 A1	01-11-2012
		US 2013171321 A1	04-07-2013
		US 2013196411 A1	01-08-2013
		WO 2012146937 A1	01-11-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

弁理士　喜多村 久美

(72)発明者　ラスムス ボーク ハンスン

デンマーク国，２８８０ バグスバエルト，クロシェイバイ ３６

(72)発明者　ピア モンク ニルスン

デンマーク国，２８８０ バグスバエルト，クロシェイバイ ３６

Ｆターム（参考）　4B064　AD87 CA21 CA50 CB01 CB03 CD01 CD06 CE20 DA16