(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 9/50
C12N 15/57

(45) 공고일자 2000년06월01일
(11) 등록번호 10-0258460
(24) 등록일자 2000년03월11일

(21) 출원번호	10-1993-0703300	(65) 공개번호	특1994-0700523
(22) 출원일자	1993년11월01일	(43) 공개일자	1994년02월22일
번역문제출일자	1993년11월01일		
(86) 국제출원번호	PCT/DK 92/00138	(87) 국제공개번호	WO 92/19729
(86) 국제출원일자	1992년04월30일	(87) 국제공개일자	1992년11월12일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 핀란드		
	국내특허 : 일본 대한민국 미국		
(30) 우선권주장	91610036.5 1991년05월01일 EP(EP)		

(73) 특허권자
노보 노르디스크 에이/에스 한센 핀 베네드
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레노보 노르디스크 에이/에스
안네 제헤르
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레노보 노르디스크 에이/에스
웨이콥 마리안느
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레
(72) 발명자
클라우스 폰 데르 오스텐
덴마아크 디케이-2800 링비 엘 66 볼러파르덴 14
스펜 브란너
덴마아크 디케이-2800 링비 페드 스메데박켄 7 에이
알란 스펜드센
덴마아크 디케이-3460 비르케뢰드 박케레데트 28
리스베트 히데가르트
덴마아크 디케이-2100 코펜하겐 외 5. 티. 에이치. 클라센스가데 35
니나 에릭센
덴마아크 디케이-2000 프레데릭스버그 아이. 티. 브이. 마틸데베이 15
마아르텐 로버트 에그몬드
네덜란드 엔엘-3461 지디 린쇼텐 데 네쓰 34
에릭 카스텔레옌
네덜란드 엔엘-2907 시지 카펠 에이 / 디 예셀 팔레티에르버그 105
(74) 대리인
정진상

심사관 : 이처영

(54) 안정화 효소 및 세제 조성물

요약

본 발명은 신규 안정화 프로테아제를 함유한 효소 세제 조성물에 관한 것인바, 프로테아제는 본래 존재하는 아미노산 잔기(프롤린 제외)가 하나 또는 그 이상의 위치에서 프롤린 잔기로 치환되고, 그 위치(들)에서의 이면각 ϕ(파이) 및 ψ(프사이)는 [-90° <ϕ<-40° 및 -180° <ψ 180°]사이의 값을 가지며, 그 위치(들)는 프로테아제가 α-나선 또는 β-시트 구조를 지니는 것에 의해 특성화 된 부분에는 위치하지 않는다.

대표도

도1a

명세서

[명의 명칭]

정화된 효소 및 세제 조성물

[기술분야]

본 발명은 신규 안정화된 프로테아제, 안정화된 프로테아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 및 신규 안정화된 프로테아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 유기체에 관한 것이다.

[배경기술]

프로테아제, 또는 (교환가능하게) 펩티다제는 단백질 기질의 아미드결합을 절단하는 효소이다. 바실러스(Bacillus)종의 박테리아는 두가지 종류의 세포외 프로테아제인, 중성 또는 금속성 프로테아제, 및 기능적으로 세린 엔도펩티다제이고 서브틸리신이라 불리는 알칼리성 프로테아제를 분비한다.

세린 프로테아제는 펩티드 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로서, 활성부위에 필수 세린 잔기가 존재한다[White, Handler 및 Smith(1973); Principles of Biochemistry; 5 판, McGraw-Hill Book Company, NY, 271-272].

박테리아의 세린 프로테아제는 20,000 내지 45,000 범위의 분자량을 갖는다. 그것들은 간단한 말단 에수테르를 가수분해하고 역시 세린 프로테아제인 진핵세포의 키모트립신과 유사하게 작용한다. 아-군(Sub-group)을 나타내는, 더욱 한정적인 용어인 알칼리성 프로테아제는 일부 세린 프로테아제에 해당하는 pH 9.0 내지 11.0의 높은 최적 pH 를 나타낸다[Priest; Bacteriological Rer., 41 711-753(1977) 참조].

본 발명과 관련된 서브틸리신은 그램-양성 박테리아 또는 균류에 의해 생산되는 세린 프로테아제이다. 다른 정의에 의하면 서브틸리신은 세린 프로테아제로, 촉매 트리아드(triad)에 존재하는 아미노산 잔기의 상대적인 순서는 Asp-His-Ser(위치 32, 64, 및 221)이다. 각종 서브틸리신이 확인되었고, 많은 서브틸리신의 아미노산 서열이 결정되었다. 이중에는 바실러스(Bacillus)균주에서 얻은 6가지 서브틸리신인 서브틸리신 168, 서브틸리신 BPN', 서브틸리신 칼스버그(Carlsberg), 서브틸리신 DY, 서브틸리신 아밀로사카리티쿠스, 및 메센테리코펩티다제[Kurihara 등(1972); J. Biol. Chem. ; 247 5629-5631 ; Wells등(1983); Nucleic Acide Res. ; 11 7911-7925; Stahl 및 Ferrari(1984); J. Bacteriol. ; 159 811-819; Jacobs등(1985); Nucl. Acids Res. ; 13 8913-8926; Nedkov 등 (1985); Biol. Chem. Hoppe-Seyler; 366 421-430; Svendsen 등(1985); FEBS LETTERS; 196 228-232] 및 악타노마 이세탈레스(actinomycetales) 에서 얻은 하나의 서브틸리신인 테르모악티노마이세스 불가리스(Thermoactinomyces vulgaris)의 테르미타제[Meloun 등(1985); FEBS LETTERS; 1983 195-200], 및 하나의 균류 서브틸리신인 트리타라키움 알붐(Tritirachium album)의 프로틴아제 K [Jany 및 Mayer(1985); Biol. Chem. Hoppes-Seyler; 366 584-492]가 있다. 서브틸리신과 같은 프로테아제는 단백질성 얼룩의 제거에 유용하므로 산업에 있어서 용도가 다양하며, 특히 세제 제제에 유용하다.

단백질 구조

프로테이제는 구형의 단백질이고 긴 폴리펩티드 사슬의 상당량이 접혀있어 매우 촘촘하다. 폴리펩티드 사슬은 본질적으로 '골격(backbone)' 및 그의 '측면- 기(side-groups)'로 이루어진다. 펩티드 결합이 평면이므로, C_α - N축 및 C_α - C' 축 주위에서만 회전이 허용된다. 펩티드 골격의 C_α- N 결합 주위에서의 회전은 비틀림 각 ϕ(파이)로 표시되고, C_α - C' 결합 주위에서의 회전은 ψ(프사이)로 표시된다[Creighton, T.E. (1984), Proteins; W.H. Freeman and Company, 뉴욕 참조]. 이들 회전각의 값에 대한 선택은 최대로 확장된 사슬에 대해 +180°(-180°와 동일함)의 최대값을 부여하므로서 이루어진다. 완전히 확장된 폴리팹티드 사슬에 있어서, N, C_α 및 C' 원자는 서로간에 모두 '트랜스(trans)'이다. '시스(cis)'구조에 있어서, 각 ϕ 및 ψ는 0° 값에 해당한다. 결합주위를 이 위치로 부터 회전하므로써, 회전한 결합의 뒤에 보이는 원자가 '시계반대방향'으로 움직이므로 정의에 따라 음의 값이 부여되고, '시계방향' 에는 양의 값이 부여된다. 그러므로 비틀림 각의 값은 -180° 내지 +180° 범위에 놓인다.

C_α- 원자는 사슬에 대한 회전 지점이므로, C_α- 원자와 연결된 측면-기(R-기) 은분자의 구조와 관련하여 매우 중요하다.

'형태(conformation)' 용어는 단백질의 전체 구조를 형성하는데 있어 2차 및 3차 구조의 관여를 규정한다. 단백질의 정확한 형태는 단백질의 특정 구조에 매우 중요하며 효소의 유일한 촉매 특성(예컨대 활성 및 특이성) 및 효소의 안정성에 크게 기여한다.

폴리펩티드의 아미노산은 일반적인 4그룹으로 나뉜다: 비극성, 하전되지않은 극성, 및 음으로 또는 양으로 하전된 극성 아미노산. 단백질 분자는 정상적으로 존재하는 수성환경에 잠겨있는 경우, 극성 측면-기의 최대수가 효소를 둘러싸는 환경에 노출되는 반면, 비극성 측면-기의 대부분은 내부를 향하게 된다. 측면-기의 이러한 배향은 단백질 형태의 안정화에 기여한다.

그러므로 단백질은 접히고 정연한 상태, 및 펴지고 불규칙한 상태 사이에서 동적평형상태로 존재한다. 이러한 부분적인 평형은 폴리펩티드 사슬의 다른 절편간의 짧은 범위의 상호작용을 반영하므로, 단백질의 전체 구조를 안정화시킨다. 동시에 열역학적인 힘은 펴진 분자의 무질서화를 증대시킨다.

안정화된 단백질을 만드는 한가지 방법은 폴리펩티드 골격에 유연성을 감소시키면서 동시에 펴진 사슬의 엔트로피를 감소시켜 펴짐(unfolding) 정도를 감소시키는 것이다. 이제까지 신규 안정화된 효소의 개발에 이러한 원리를 제공하기 위해 극소수의 시도만이 있어 왔다.

단백질의 열안정성을 증가시키는 개괄적인 원리가 제시되었다 [Suzuki, Y. (1989), Proc. Japan Acad. ; 65 Ser. B]. 이 논문에서 Suzuki는 2차 및 3차 구조 뿐만아니라 효소의 촉매기능의 현저한 변화없이 β-턴(β-turn)의 제2위치에서 프롤린의 존재 빈도를 증가시켜 구형 단백질의 열안정성을 점진적으로 크게 증대시킬 수 있다고 주장하였다. 그 원리는 여러 사실과 발견에 근거하고 있는바, 그중 한가지 사실은 프롤린 잔기가 β-턴의 제2위치에 우선적으로 존재하게 되는 경향을 보인다는 것이다 [Levitt, M(1978); Biochemistry; 17 4277-4285; 및 Chou, P.Y. & Fasman, G.D (1977); J. Mol. Biol. ; 115 135-175]. 그 원리는 단백질내 β-턴의 제2위치에 프롤린을 삽입시키는 것에 한정되며, 다른 위치에 대해서는 언급되지 않았다.

국제특허공개 WO 89/01520 (Cetus Corporation, USA)에는 단백질의 펴짐의 공간배열 엔트로피를 감소시켜 단백질의 안정성을 증가시키는 방법이 개시되어 있다. 방법은 스트렙토마이세스 루비키노수스 (Streptomyces rubiginosus) 크실로스 이소메라제에 이용되며, 예상되는 치환 위치에서 아미노산을 프롤

린으로 치환하거나, 또는 글리신을 알라닌으로 치환하는 것을 포함한다.

국제특허공개 WO 89/09819(Genex Corporation, USA)에는 서브틸리신의 안정화에 대한 복합 돌연변이 방법이 제시되어 있다. 이 공개에는 열 안정화 돌연변이로 판정된 많은 아미노산 돌연변이가 실려있다. 목록에는 서브틸리신의 위치 188(BPN' 번호매김) 에서 세린이 프롤린으로 치환된 것도 포함되어 있다.

국제특허공개 WO 87/05050(Genex Corporation, USA)에는 돌연변이유발 및 스크리닝 방법이 개시되어 있다. 이 방법을 통해 하나 또는 그 이상의 돌연변이가 돌연변이유 발원의 처리에 의해 도입되며, 방법은 변화한 특성을 지닌 생성물을 연속해서 스크리닝하는 것을 포한다. 이러한 무작위 돌연변이유발의 결과로서, 위치 188(BPN' 번호매김) 에 프롤린 잔기를 지닌 서브틸리신이 제공되었다.

본 발명의 목적은 개선된 안정성을 지니는 신규 프로테아제를 제공하는 것이다.

발명의 요약

본 발명은 본래 존재하는 아미노산 잔기(프롤린 이외의)가 하나 또는 그 이상의 위치에서 프롤린 잔기로 치환되어 있는 신규 안정화 프로테아제에 관한 것이다. 그 위치(들)에서는 이면각 φ(파이) 및 ψ(프사이)는 [-90°<φ<-40° 및 -180°<ψ<180°]사이, 바람직하게는 [-90°<φ<-40° 및 120°<ψ<180°] 또는 [-90°<φ<-40° 및 -50°<ψ<10°] 사이의 값을 가지며, 그 위치(들) 는 프로테아제가 α-나선 또는 β-시트 구조를 지니는 것에 의해 특성화되는 부위에는 위치하지 않는다.

다른 일면에 있어서, 본 발명은 프로테아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 더나아가서, 본 발명은 프로테아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터, 및 발현벡터를 포함하는 숙주 유기체에 관한 것이다.

서브틸리신

본 발명과 관련된 서브틸리신은 그램-양성 박테리아 또는 균류에 의해 생산된 세린 프로테아제로 정의되어 있다. 다른 정의에 의하면, 서브틸리신은 촉매트리아드에 존재하는 아미노산의 상대적인 순서가 Asp-His-Ser(위치 32, 64 및 221, BPN' 번호매김)인 세린 프로테아제이다.

아미노산

다음 기로를 아미노산의 약자로 사용하였다.

A = Ala = 알라닌

C = Cys = 시스테인

D = Asp = 아스파르트산

E = Glu = 글루탐산

F = Phe = 페닐알라닌

G = Gly = 글리신

H = His = 히스티딘

I = Ile = 이소루신

K = Lys = 리신

L = Leu = 루신

M = Met = 메티오닌

N = Asn = 아스파라긴

P = Pro = 프롤린

Q = Gln = 글루타민

R = Arg = 아르기닌

S = Ser = 세린

T = Thr = 트레오닌

V = Val = 발린

W = Trp = 트립토판

Y = Tyr = 티로신

B = Asx = Asp (D) 또는 Asn (N)

Z = Glx = Glu (E) 또는 Gln (Q)

X = 임의 아미노산

* = 치환 또는 부재 아미노산

프로테아제 변이체

본 발명의 안정화된 프로테아제는 프로테아제 변이체 또는 돌연변이된 프로테아제이다. 프로테아제 변이

체 또는 돌연변이된 프로테아제는 본래 유전자 또는 그 유도체의 DNA 뉴클레오티드 서열을 변화시켜 얻어지는 프로테아제를 의미한다. 프로테아제 변이체 및 돌연변이된 프로테아제는, 프로테아제를 암호화한 DNA뉴클레오티드 서열이 적절한 숙주 유기체에 존재하는 적합한 벡터에 삽입되어 있는 경우, 발현되어 생산되어질 것이다. 숙주 유기체는 본래 유전자가 기원된 유기체와 반드시 동일할 필요는 없다.

아미노산 번호매김]

본 발명과 관련하여 서브틸리신에 존재하는 아미노산 잔기의 특수한 번호매김을 이용하였다. 각종 서브틸리신의 아미노산 서열을 서브틸리신 BPN' 에 따라 정렬하므로서, 서브틸리신 BPN' 의 유사한 아미노산 위치의 번호에 대해 어느 서브틸리신의 아미노산 잔기에 번호를 부여하는 것이 가능하다('BPN' 번호매김', 국제특허공개 제 WO 89/0679 호 및 제 WO91/00345호 참조).

본 발명에 따라 생산되거나 고려되는 각종 프로테아제 변이체을 기재하는데 있어, 참조를 용이하게 하기 위하여 다음의 명명법을 채용하였다.

(본래 아미노산; 위치; 치환된 아미노산)

따라서, 위치 195의 알라닌이 프롤린으로 치환되면 다음과 같이 표시된다:

A195P

위치 36에서 아스파르트산이 제거되면 *D36으로 표시되고, 위치 36에 아스파르트산이삽입되면 36D로 표시된다.

다중 돌연변이는 플러스로 분리된. 즉: A194P + G195E는 위치 194 및 195에서 알라닌이 프롤린으로 및 글리신이 글루탐산으로 각각 돌연변이 되었음을 나타낸다.

만일 치환이 예를들어 서브틸리신 309에서 돌연변이에 의해 일어난 경우, 생성물은 '서브틸리신 309/G195E'로 표시된다.

본 명세서에 언급된 모든 위치는 상기 BPN' 번호를 나타낸다.

단백질분해 활성

본 발명의 명세서에서 단백질분해 활성은 Kio NOVO 프로테아제 단위(KNPU)로 표현되어 있다. 활성은 효소 표준(SAVINASE ™) 에 대해 상대적으로 결정되고, 결정은 표준조건(50℃, pH8.3, 반응시간 9분, 측정시간 3분) 에서 디메틸 카세인(DMC) 용액의 소화에 근거하였다. 인쇄물 AF 220/1 을 요구에 의해 덴마크의 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브(Novo Nordisk A/S)로 부터 구입할 수 있으며, 인쇄물이 여기에 참고로 포함되어 있다.

세척능

세척시에 세정할 물체에 존재하는 각종 본래기질의 분해를 촉매하는 효소의 능력을 세척능력, 세척력, 세척성, 또는 세척능이라고 한다. 본 출원에서는 이러한 특성을 망라하여 세척능 용어를 사용할 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 본래 존재하는 아미노산 잔기(프롤린 이외의)가 하나 또는 그 이상의 위치에서 프롤린 잔기로 치환되어 있는 신규 안정화 프로테아제에 관한 것으로, 그 위치(들) 에서 이면각 φ(파이) 및 ψ(프사이)는 [-90°<φ<-40° 및 -180°<ψ<180°]사이, 바람직하게는 [-90°<φ<-40° 및 -120°<ψ<180°] 또는 [-90°<φ<-40° 및 -50°<ψ<10°] 사이의 값을 가지며, 그 위치(들)는 프로테아제가 α-나선 또는 β-시트 구조를 지니는 것에 의해 특성화되는 부위에는 위치하지 않는다.

본 발명의 명세서에서, 안정화된 프로테아제는 본래 존재하는 프로테이제와 기능적으로 동일하거나 또는 유사한 구조적 특징을 지니는 프로테아제 변이체 또는 돌연변이된 프로테아제이다. 그러한 프로테아제에서, 본래 존재하는 아미노산 잔기(프롤린 이외의)는 하나 또는 그 이상의 위치에서 프롤린 잔기로 치환되어 있다. 그 위치(들)에서 이면각 φ(파이) 및 ψ(프사이)는 [-90°<φ<-40° 및 -180°<ψ<180°] 사이, 바람직하게는 [-90°<φ<-40° 및 -120°<ψ<180°] 또는 [-90°<φ<-40° 및 -50°<ψ<10°] 사이의 값을 지니며, 그위치(들)는 프로테아제가 α-나선 또는 β-시트 구조를 지니는 것에 의해 특성화되는 부위에는 위치하지 않는다.

더욱이, 본 발명과 관련된 안정화 프로테아제는 본래 효소와 비교하여 열안정성, 저장 인정성등에 있어서 개선된 안정성을 지니는 프로테아제이다.

단백질의 2차 구조 한정

본발명의 안정화된 프로테아제는 문제 프로테아제의 2차 구조를 분석하고, [-90°<φ<-40° 및 -180°<ψ<180°], 바람직하게 [-90°<φ<-40° 및 -120°<ψ<180°] 또는 [-90°<φ<-40° 및 -50°<ψ<10°] 사이의 이면각 φ(파이) 및 ψ(프사이)를 지니는 프로테아제의 잔기를 확인하고, 프로테아제가 α-나선 또는 β-시트구조를 지닌 것에 의해 특성화되는 위치에 존재하는 잔기를 제외하고, 이미 프롤린 잔기가 확인된 위치에 존재하지 않을 경우) 바람직하게 문제의 프로테아제를 암호화하는 유전자에 위치 지정 돌연변이를 일으켜 확인된 위치에서 본래 존재하는 아미노산 잔기를 프롤린잔기로 치환하고, 및 적절한 숙주 유기체에서 안정화 프로테아제를 암호화하는 유전자를 삽입시키고 적합한 영양배지에서 상기 숙주 유기체를 배양하여 유전자를 발현시킨 후 원하는 프로테아제를 회수하므로서 얻을 수 있다.

이러한 안정화된 프로테아제의 제법은 문제의 프로테아제에 대한 2차 구조를 분석하는 것을 포함한다. 그러한 분석을 수행하는 한가지 방법에 있어서, 효소의 원자구조가 규명되어져야 한다. 원자구조는 X-선 회절 기술로 결정될 수 있다. X-선 회절 기술은 Hendrickson, W.A. [X-ray diffraction; in Protein Engineering (Ed: Oxender, D.L 및 Fox, C.F.), 1장; Alan R. Liss, Inc.(1987)] 및 Creighton, T.E.(상

기 참조; 6장)에 의해 개시되었다.

서브틸리신 309의 결정 구조가 밝혀졌고 [Betzel, B., Klupsch, S., Papendorf, G., Hastrup, S., Branner, S., 및 Wilson, K.S.(1992); J. Mol. Biol. 223 427-445 참조], 그 좌표(coordinates)가 기탁되어 있어 Brookhaven Protein Data Bank로 부터 구입할 수 있다 [Bernstein 등 (1977); J. Mol. Biol. 112 535-542].

원자구조가 결정되면, 원자 좌표로부터 이면각을 계산하는 것이 가능하다. 더욱이, 2차 구조 요소는 수소결합에 근거하여 정해진다. 협동적인 2차 구조는 요소의 수소결합 패턴 '턴' 및 '브리지(bridge)' 의 반복으로 알려져 있다. 반복되는 턴은 '나선(he1ix)', 반복되는 브리지는 '사다리(ladder)', 연결된 사다리는 '시트'이다.

2차 구조 요소에 대한 분석은 원자 좌표에서 뽑은 구조배정 및 기하학적 특징을 컴퓨터로 처리한 편집물을 필요로 한다. 원자 좌표에 근거하여 단백질의 2차 구조를 밝히는 통상적인 방법은 Kabsch, W, 및 Sander, C. [Biopolymers(1983) 22 2577-2637]에 의해 개시되었다. 이 논문에는 패턴-인식방법을 이용하여 원자 좌표로 부터 구조적 특징을 뽑아내는 알고리즘이 제시되어 있다. 첫째로, H-결합이 H-결합 그룹쌍 간의 정전기적 상호작용에 근거하여 확인된다. 다음에, H-결합의 패턴은 턴(T), 구부러짐(bend)(S), 브리지(B), 나선(G, H. I), β- 사다리(E) 및 β-시트(E) 등의 2차 구조 요소를 정하는데 이용된다.

Kabsch & Sander 파일의 컴퓨터 처리가 가능하고 표준 PASCAL로 쓰여진 컴퓨터 프로그램 DSSP (Define Secondary Structure of Proteins)를 Protem Data Bank, Chemistry Dept., Brookhaven National Laboratory, Upton, N.Y. 11973 으로부터 구입할 수 있다.

결정형 프로테아제의 원자구조에 근거하여 아미노산에 대한 이면각 ϕ(파이) 및 ψ(프사이)가 계산되면, 프롤린 잔기로 치환시키기에 적절한 이면 파이 및 프사이각을 갖는 위치(들)를 선택할 수 있다.

프롤린 잔기의 방향족 곁사슬은 펩티드 원자의 질소원자에 공유결합되어 있다. 얻어지는 원형의 5-원 고리는 결과적으로, 펩티드 골격의 N-Cα 결합에 대한 회전에 강한 구속력을 부여하고 동시에 골격 N-원자에 대한 수소결합의 형성을 방지한다. 이러한 구조적 이유때문에, 프롤린은 일반적으로 α-나선 또는 β-시트 2차구조와 양립할 수 없다. Cα-N결합에 대한 동일한 회전 구속력, 및 사슬내 인접한 아미노산이 교란되지 않아야할 필요성 때문에 이면각 파이 및 프사이(특히 파이)의 크기는 폴리펩티드내의 프롤린 잔기에 대한 제한된 범위의 값에 한정된다. 폴리펩티드내의 프롤린 잔기에 대한 이면각은 전적으로 [-90° <ϕ <-40° 및 -180° <ψ<180°] 사이, 바람직하게는 [-90° <ϕ<-40° 및 -120° <ψ<180°] 또는 [-90° <ϕ<-40° 및 -50° <ψ<10°] 사이이다. 본 명세서에는 시스- 및 트랜스- 프롤린 잔기가 둘다 고려되어 있다.

프롤린 잔기는 상기 방법을 통해 지적된 하나 또는 그 이상의 위치에 이미 존재할 수 있으며, 그때 치환은 물론 타당하지 않다. 반면에, 방법은 본래 존재하는 아미노산 잔기를 프롤린으로 치환하는 것을 포함한다.

그러나, 예상된 모든 위치에서 프롤린으로의 치환이 항상 프로테아제의 안정성을 개선시키는 것은 아니다. 본 방법으로 나타낸 일부 위치에서 본래 존재하는 아미노산의 프롤린 잔기로의 치환은 예상하지 못한 요인, 예컨대 필수적인 유연성의 손실, H-결합 가능성의 손실, 예상하지 못한 입체 장애등에 의해 불안정화를 일으킬 수도 있다. 그러한 '중요한 위치' 는 예측되지 않는다.

각 치환의 안정학(또는 불안정화) 효과는 부가적인 것으로 여겨진다. 예를들어 Wells, J.A. [Biochemstry(1990) 29(37) 8510-8517] 및 하기의 표4를 참조하라.

만일 서브틸리신 309와 다른 서브틸리신이 본 방법의 적용을 받는 경우(비록 두가지 서브틸리신이 매우 유사할지라도), 같은 수의 위치나 동일한 위치가 본 방법에서 반드시 비롯되는 것은 아니다. 위치의 일부는 동일할 수 있고, 위치의 수도 같을 수 있으나, 예측되지는 않는다.

그러나 특정 프로테아제에 적용되는 상기 방법에서 얻어지는 안정화 프롤린 치환은 그러한 프로테아제에 적용되는 상기 방법의 결과와는 무관하게 다른 프로테아제에 대해 또한 안정화 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

서브틸리신 309분자에 대해 본 방법을 수행하는 경우(국제특허출원 제 PCT/DK88/00002 호 참조), 표1 및 표2에 열거한 일련의 데이타가 얻어질 것이다. 표1은- 파이 및 프사이 각에 대해-한가지 기준을 만족하는 일련의 위치를 나타내고, 표2는 다른 기준을 만족하는 일련의 부가적인 위치를 나타낸다.

[표 1]

파이 및 프사이 각에 근거하여 서브틸리신 309에서 제안된 프롤린 돌연변이체.

기준 : -90° <파이<-40° 및 120° <프사이<180° ,

또는 -90° <파이<-40° 및 -50° <프사이<10°

알파 나선과 베타 시트 구조부분이 아님.

BPN' 번호	파이각	프사이각	아미노산	구조	돌연변이체 & 주해
5	-59	148	P		서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
11	-80	-1	V	T	
19	-85	1	R	T	
24	-57	132	S	T	
33	-79	10	T	S	
37	-89	145	S		
38	-58	146	T		
40	-60	-27	P	T	서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
52	-59	131	P	T	서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
55	-71	-22	P		서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
57	-90	167	S	S	
59	-60	151	Q		
74	-57	141	A		
75	-67	148	L		
83	-81	173	G		
84	-72	-35	V	S	
86	-59	-12	P	T	서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
88	-68	152	A		
97	-73	174	G		
98	-57	-32	A	T	
99	-67	-12	S	T	
119	-70	149	M		
129	-68	-24	P	S	서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
130	-85	126	S	S	
131	-63	156	P		서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
145	-88	10	R	T	
147	-86	134	V		
153	-74	-20	S		
156	-82	-11	S	S	
158	-70	159	A		
163	-66	166	S		
169	-52	-33	A	T	
170	-66	-21	R	T	
171	-67	141	Y	S	
172	-52	-43	A	T	
173	-79	1	N	T	
182	-63	-16	Q	T	
186	-65	133	R	B	
187	-65	151	A		
188	-64	-27	S	T	
189	-77	-17	F	T	
191	-69	151	Q		
194	-56	130	A	T	
210	-53	155	P	T	서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
239	-58	-25	P	T	서브틸리신 309에 이미존재하는 Pro
241	-79	149	W		
242	-86	178	S		
254	-71	165	A	S	
256	-59	136	S		
259	-48	131	S		
265	-69	-20	S	T	
267	-79	127	L	B	
268	-58	141	V		

표 1에 나타낸 기준과 관련하여 프사이 각에 대한 구속력을 완화하므로서, 4 가지의 부가적인 돌연변이체를 표 2에 제시하였다.

[표 2]

파이 및 프사이 각에 근거하여 서브틸리신 309에서 제안된 프롤린 돌연변이체.

완화된 기준 -90° <파이<-40° 및 -180° <프사이<180° ,

알파 나선과 베타 시트 구조부분이 아님.

BPN' 번호	파이 각	프사이 각	아미노산	구조	돌연변이체 & 주해
76	-89	102	N	S	
125	-90	67	S		
160	-83	27	G	S	
255	-89	111	T	B	

바람직한 안정화된 프로테아제

바람직하게, 본 발명의 프로테아제는 안정화된 서브틸리신 프로테아제이다. 더욱 구체적인 면에 있어서, 본 발명의 바람직한 프로테아제는 얻어진 안정화 서브틸리신이 표 1 및 표 2에 열거한 위치(BPN' 번호), 또는 이와 유사한 위치의 하나 또는 그 이상에서 프롤린 잔기로 치환된 서브틸리신이다.

더욱 구체적인 면에 있어서, 본 발명의 프로테아제는 위치: 38, 57, 172, 188, 194, 242 및 259(BPN' 번호)의 하나 또는 그 이상에서 본래 존재하는 아미노산(프롤린 이외의)이 프롤린 잔기로 치환된 서브틸리신이다. 더욱 바람직한 구체예에서, 서브틸리신은 하나 또는 그 이상의 다음 치환을 부가적으로 포함한다: 27R, 36D, 76D, 97N, 98R, 104Y, 120D, 128G, 195E, 206C, 218S, 235L, 235R, 237R, 251E 및 263F(BPN' 번호).

훨씬 더 구체적인 면에 있어서, 본 발명의 프로테아제는 안정화 서브틸리신 309, 안정화 서브틸리신 147, 안정화 서브틸린신 BPN', 또는 안정화 서브틸리신 칼스버그이다. 서브틸리신 309 및 서브틸리신 147은 바실러스 렌투스(Bacillus lentus)의 변이체이며 미국특허 제3,723,250호 및 국제특허출원 PCT/DK88/00002에 기재되어있고, 서브틸리신 BPN'은 Wells 등[Nucleic Acides Re.(1983) 11 7911-7925]에 의해 기재되어 있으며 서브틸리신 칼스버스는 Smith등 [Smith, E.L.; Delange R.J.; Evans, W.H,; Landon, W.; Markland. F.S.(1968); Subtilisin Carlsberg V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN'; Evolutionary relationships.; J. Biol. Chem. 243(9) 2184-2191], 및 Jacobs 등 [Nucl. Acid Res. (1985) 13 8913-8926]에 기재되어 있다.

다른 한가지의 구체적인 면에 있어서, 본 발명의 프로테아제는 다음 치환중 하나 또는 그 이상이 도입된 안정화 서브틸리신 309이다: T38P, S57P, A98P, S188P, A172P, A194P, S242P, 및 S259P(BPN' 번호). 더욱 바람직한 구체예에서, 이 서브틸리신은 부가적으로 다음 치환중 하나 또는 그 이상을 포함한다: K27R, *36D, N76D, G97N, A98R, V104Y, H120D, S128G, G195E, Q206C, N218C, K235L, K235R, K237R, K251E, 및 Y263F(BPN' 번호).

다른 더 바람직한 구체예에서, 본 발명의 프로테아제는 다음 치환의 하나 또는 그 이상이 도입된 서브틸리신 309이다: T38P, S57P, A98P, A172P. A194P, S242P. 및 S259P(BPN' 번호). 더욱 바람직한 구체예에서, 이 서브틸리신 309는 부가적으로 다음 치환의 하나 또는 그 이상을 포함한다: K27R, *36D, N76D, G97N, A98R, V104Y, H120D, S128G, G195E, Q206C, N218S, K235L, K235R, K237R, K251E, 및 Y263F(BPN' 번호).

본 발명의 가장 바람직한 프로테아제는 다음과 같다: 서브틸리신 309/K27R+*36D+G97N+A98R+A194P+K235R+K237R+K251E+Y263F, 서브틸리신 309/K27R+*36D+G97N+A194P+K235R+K237R+K251E+Y263F, 서브틸리신 309/K27R+* 36D+G97N+A194P+K235R+K237R+Y263F, 서브틸리신 309/* 36D+N76D+H120D+A194P+G195E+K235L, 서브틸리신 309/*36D+G97N+V104Y+H120D+A194P+G195E, 서브틸리신 309/*36D+G97N+V104Y, H120D+A194P+G195E+K235L, 서브틸리신 309/*36D+G97N+H120D+A194P+G195E, 서브틸리신 309/* 36D+G97N+H120D+A194P+G195E+K235L, 서브틸리신 309/* 36D+V104Y+H120D+A194P+G195E, 서브틸리신 309/* 36D+V104Y+H120D+A194P+G195E+K235L, 서브틸리신 309/* 36D+H120D+A194P+G195E, 서브틸리신 309/*36D+H120D+A194P+G195E+K235L 및 서브틸리신 309/A194P(BPN' 번호)

프롤린 안정화의 효과

본 발명에 따라 얻은 정제된 변이체을 야생형 서브틸리신(서브틸리신 309) 과 비교하여 최소한 동등하게 잘 세척하는지를 시험하였다. 실험자료에 대해서는 실시예 5를 참조하라.

저장 안정성은 일반적으로 열안정성을 반영하는 바, 개선된 열안정성은 개선된 저장안정성과 일치한다. 정제한 변이체의 열안정성 개선을 시차 주사 열량측정(DSC)방법으로 시험자료에 대해서는 실시예 3을 참조하라. 이들 시험의 결과를 아래의 표 3에 나타냈다. 미니 저장 시험(Mini Storage Test)으로 저장안정성을 시험하였다. 실험자료에 대해서는실시예 4를 참조하라. 저장안정성 시험의 결과를 표 2에 나타냈다.

[표 3]

서브틸리신 309에 대한 안정화

변형물	상대적인 안정화 Δ DSC (℃)
S24P	-2.0 ℃
T38P	-0.1 ℃
S57P	0.7 ℃
A98P	0.1 ℃
S99P	-0.2 ℃
A172P	0.1 ℃
Q182P	-2.5 ℃
S188P	1.5 ℃
A194P	2.6 ℃
S242P	1.4 ℃
S256P	-2.1 ℃
S259P	0.6 ℃

야생형 효소에 비하여, 제조된 변이체중 3개가 현저히 개선된 열안정성을 지니고, 변이체 중 2개는 단지 약간만 개선된 열안정성을 지니고, 변이체중 4개는 열안정성에 있어서 중요한 변화를 지니지 않고, 및 변이체중 3개는 현저히 감소한 열안정성을 지니는 것이 표 3에 나타나 있다.

이들 결과는 본 명세서에 기재된 파이- 프사이- 개념에 의해 프롤린 잔기를 단백질에 도입시켜 안정화하는데에 분명한 원리가 존재하지만, 각 변이체의 안정화 효과에 대한 결과는 예측할 수 없음을 나타낸다.

그러나, 개선된 열안정성을 지니는 변이체이 얻어지는 경우 일반적인 각 돌연변이의 안정화 효과는부가적인 것으로 여겨진다. 이것을 하기 표 4에 나타낸바, 시차 주사 열량측정(DSC) 으로 측정하여 나타낸 서브틸리신 309변이체의 열변성 온도가 야생형 효소와 비교되어 나타나 있다.

그러므로 삽입된 안정화 프롤린 잔기(들)외에, 본 명세서에 기재된 하나 또는 그 이상의 부가적인 안정화 돌연변이를 포함하는 안정화프로테아제 변이체은 본 발명의 범위내에서 고려되고 있다.

[표 4]

서브틸리신 309변형물에서의 부가적인 안정화 효과

괄호안의 숫자는 시험한 각 변형물에 대한 △DSC 온도의 합을 나타낸다.

변형물								△ DSC (°C)	
G195E								0.1	
	H120D							0.2	
		K235L						0.0	
			*36D					4.0	
				N76D				4.3	
					A194P			2.6	
						G97N		-0.3	
							V104Y	2.3	
G195E	H120D	K235L						0.3	(0.3)
G195E	H120D	K235L	*36D					4.0	(4.3)
G195E	H120D	K235L	*36D		A194P			7.0	(6.9)
G195E	H120D	K235L	*36D	N76D				7.0	(8.6)
G195E	H120D	K235L	*36D	N76D	A194P			10.4	(11.2)
G195E	H120D		*36D		A194P	G97N		7.4	(6.6)
G195E	H120D		*36D		A194P	G97N	V104Y	8.2	(8.2)
G195E	H120D	K235L	*36D		A194P	G97N		6.9	(6.6)
G195E	H120D	K235L	*36D		A194P	G97N	V104Y	8.0	(8.9)

프로테아제를 암호화하는 유전자에서의 돌연변이 생성방법

유전자에 돌연변이를 도입시키는 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다. 서브틸리신 유전자의 클로닝이 간략히 논의된 후 서브틸리신 유전자내의 특정한 위치에서 돌연변이를 일으키는 방법이 논의될 것이다.

서브틸리신 유전자 클로닝

서브틸리신을 암호화하는 유전자는 당업계에 공지된 각종 방법을 이용하여 그램-양성 박테리아 또는 균류에서 클로닝할 수 있다. 먼저, 연구할 서브틸리신을 생산하는 유기체에서 얻은 염색체 DNA 또는 전령 DNA를 이용하여 DNA의 게놈, 및/ 또는 cDNA 라이브러리를 제조하여야 한다.

다음에, 만약 서브틸리신의 아미노산 서열이 공지되어 있으면, 유사한 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성하고 표지하여, 박테리아 DNA익 게놈 라이브러리 또는 균주 cDNA 라이브러리로 부터 서브틸리신-암호화 클론을 확인한다. 선택적으로, 다른 박테리아 또는 균류의 균주에서 얻은 서브틸리신에 유사한 서열을 포함하는 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여 낮은 스트린젠시(stringency) 세척조건 및 혼성화를 통해 서브틸리신-암호화 클론을 확인할 수 있다.

서브틸리신-생산 클론을 확인하는 다른 한가지 방법은 플라스미드의 발현벡터에 게놈 DNA의 절편을 삽입시키는 것, 얻어진 게놈 DNA 라이브러리를 지닌 프로테아제-음성 박테리아를 형질전환시키는 것, 및 이어서 형질전환된 박테리아를 탈지유등의 서브틸리신용 기질을 함유하는 한천에 플레이팅하는 것을 포함한다. 서브틸리신-생산 플라스미드를 포함하는 박테리아는 분비된 서브틸리신에 의해 탈지유가 소화되어 투명한 한천의 할로(halo)로 둘러싸인 콜로니를 형성한다.

서브틸리신 유전자에 있어서 위치 지정 돌연변이의 유발

일단 서브틸리신 유전자가 클로닝되면, 돌연변이 유발을 위한 바람직한 위치가 확인되고, 합성 올리고뉴클레오티드를 이용하여 돌연변이가 도입될 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드가 원하는 돌연변이 위치의 옆에 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 돌연변이체 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 합성시에 삽입된다. 바람직한 방법에서, 서브틸리신 유전자를 연결하는 DNA의 단일 가닥 갭은 서브틸리신 유전자를 지니는 벡터에서 형성될 수 있다. 이어서 원하는 돌연변이를 지니는 합성 뉴클레오티드는 단일가닥 DNA의 유사한 부분에 어닐링 된다. 다음에 나머지 갭은 DNA 폴리머라제 I (클레노우 절편)에 의해 채워지고 구조체는 T_4 리가제에 의해 연결된다. 이 방법의 특정한 예가 개시되었다[Morinaga 등(1984); Biotechnology, 2 646-639]. Morinaga등에 의하면 유전자내의 절편은 제한 엔도뉴클레아제에 의해 제거된다. 이제 갭을 지니는 벡터/ 유전자는 이어서, 갭을 포함하는 대신에 갭에 포함된 부위 이외의 위치에서 다른 제한 엔도뉴클레아제에 의해 절단된 벡터/ 유전 혼성화된다. 다음에 유전자의 단일가닥 부위는 돌연변이된 올리고뉴클레오티드와 혼성화될 수 있으며, 남아있는 갭은 DNA 폴리어라제 1의 클레노우 절편에 의해 채워지고, 삽입체는 T_4 DNA 리가제로 연결되어, 복제의 사이클후에 원하는 돌연변이를 지니는 이중-가닥 플라스미드가 생성된다. Morinaga방법은 새로운 제한 위치를 만드는 부가적인 조작을 제거하므로, 많은 위치에서 돌연변이가 일어나도록 촉진한다. 1988년 7월 26일에 간행된 Estell등의 미국특허 제4,760,025호는 카세트에 적은 변화를 일으켜 다수의 돌연변이를 지니는 올리고 뉴클레오티드를 도입하는 것이 가능함을 보여주고 있으나, Morinaga방법에 의하면 한번에 아주 많은 돌연변이를 도입시키는 것이 가능한데, 그 이유는 길이가 다양한 다수의 올리고뉴클레오티드가 도입될 수 있기 때문이다.

서브틸리신 변이체의 발현

본 발명에 따라, 상기방법 실시예 1에 기재된 방법, 또는 당업계에 공지된 모든 선택적인 방법으로 제조된 돌연변이된 서브틸리신 유전자는 발현벡터를 이용하여 효소 형태로 발현될 수 있다. 발현벡터는 일반적으로 클로닝 벡터의 정의에 속하는데, 그 이유는 발현벡터는 일반적으로 전형적인 클로닝 벡터의 구성요소, 즉 미생물의 게놈과는 독립적으로 미생물내에 존재하는 벡터의 독립적인 복제를 허용하는 요소, 및 선별 목적을 위한 하나 또는 그 이상의 표현형 마커를 포함하기 때문이다. 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터 유전자 리보솜 결합위치, 번역개시신호, 및 선택적으로, 리프레서 유전자 또는 각종 활성 유전자를 암호화하는 조절 서열을 포함한다.

발현된 단백질을 분비시키기 위해, '신호 서열'을 암호화하는 뉴클레오티드를 유전자의 코딩서열앞에 삽입할 수 있다. 조절 서열의 지시하에 발현시키기 위해, 본 발명에 따라 처리될 표적서열은 적당한 리딩 프레임(reading frame)의 조절서열에 적절하게 연결된다. 플라스미드 벡터에 삽입되어 돌연변이체 서브틸리된 유전자의 전사를 일으키는 프로모터 서열이 포함되는데 프로모터 서열은 원핵세포의 β-락타마제 프로모터[Villa-Kamaroff. 등(1978); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 75 3727-3731] 및 tac 프로모터(DeBoer.등.(1983); Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; 80 21-25]에만 제한되지 않는다. 다른 참고가 또한 Scientific American(1980); 242 74-94의 'Useful proteins from recombinant bacteria'에 제시되어 있다.

한가지 구체예에 의하면, 바실러스 서브틸리스(B. subtilis)는 돌연변이된 DNA를 지니는 발현 벡터에 의해 형질전환된다. 만약 발현이 바실러스 서브틸리스등의 분비 미생물에서 일어나는 경우, 신호서열은 번역개시 신호의 뒤 및 관련 DNA서열의 앞에 존재할 것이다. 신호 서열은 발현 생성물을 세포벽에 수송하며, 그곳에서 분비되는 생성물로부터 분리된다. 상기의 '조절 서열' 용어는, 존재하는 경우, 신호서열을 가리킨다.

본 발명의 안정화된 효소를 생산할 수 있는 미생물은 동화가능한 탄소 및 질소를 다른 필수영양분과 함께 포함하는 영양배지에서 통상적인 발효방법으로 배양될 수 있다. 배지는 당업계에 공지된 것과 동일한 원리로 만들어진다.

뉴클레오티드 서열 및 미생물

본 발명은 본 발명의 안정화된 프로테아제를 암호화하는 DNA 뉴클레오티드 서열 및 안정화된 프로테아제를 암호화한 DNA 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

안정화된 프로테아제는 이 프르테아제를 암호화하는 DNA 뉴클레오티드 서열이 적절한 숙주 유기체내에 존재하는 적합한 발현벡터에 삽입된 경우 발현되어 생산된다. 숙주 유기체는 본래 유전자가 기원된 유기체와 반드시 동일할 필요는 없다. 돌연변이된 유전자, 벡터 및 돌연변이체 및 형질전환된 미생물의 제조는 당업계에 공지된 적절한 재조합 DNA기술로 수행될 수 있다.

본 발명은 또한 안정화된 프로테아제를 암호화하는 DNA 뉴클레오티드 서열을 지니는 발현벡터를 포함하는 숙주 유기체에 관한 것이다.

세제 조성물

본 발명은 또한 세척 및 세제 조성물에 있어서 본 발명의 안정화된 프로테아제의 용도, 및 안정화된 프르테아제를 함유하는 그러한 조성물에 관한 것이다.

그러한 조성물은 당업계의 기술자에게 잘 공지된 조성물에 포함된 통상의 성분과 조합되거나 또는 단독으로 본 발명 프로테아제의 하나 또는 그 이상을 포함할 것이다.

그러한 조성분에는 빌더, 예컨대 인산염 또는 제올라이트 빌더, 계면활성제, 예컨대 음이온성, 양이온성, 비-이온성 또는 쯔비터이온형 계면활성제, 중합체, 예컨대 아크릴 또는 등가의 중합체, 표백 시스템, 예컨대 과붕산염-또는 아미노-함유 표백 전구체 또는 활성제, 구조제(Structurant), 예컨대 규산염 구조제, pH조절용 알칼리 또는 산, 습윤제, 및/또는 중성 무기염 등이 있다.

본 발명의 세제 조성물은 분말, 액체등의 편리한 형태로 제조될 수 있다.

효소는 세제 조성물의 잘 공지된 표준량으로 사용된다. 양은 매우 넓은 범위, 예컨대 세제조성물 그램당 약0.0002 내지 0.01, 약0.005 내지 0.05 안손(Anson)단위이다. 다른 단위로 표현하면, 프로테아제는 약 0.1 내지 100GU/ 세제 제제㎎(예컨대, 1 내지 50, 특히 5 내지 20GU/㎎), 또는 세제 제제 g당 약 0.01 내지 4, 0.1 내지 0.4KNPU 범위의 양으로 조성물에 포함될 것이다.

KNPU는 앞에 정의되어 있다. GU는 글리신 단위(Glycine Unit)로서, 표준조건하에 N-아세틸 카세인을 기질로해서 40℃에서 15분간 배양하여 글리신 1마이크로몰에 해당하는 양의 NH_2-기를 생성하는 단배질분해 효소 활성으로 정의된다.

예를들어, 리터당 0.08KNPU의 효소활성에 해당하는 양인 세척액당 효소단백질 약 0.25㎎의 속도로 본 발명의 효소를 사용하는 것이 적합하다. 해당하는 세제 제제는 예를들어 0.1 내지 0.4KNPU/g범위에 해당하는 양의 효소를 포함한다.

세제 조성물은 또한 다른 효소로 포함할 수 있다.

예를들어, 리파제는 담체와 함께 지질분해 효소의 과립조성물(선택적으로 용액 또는 슬러리) 형태로 첨가될 것이다(예를들어, EP특허공개 제258,068호(Novo Nordisk A/S) 및 Novo Nordisk A/S의 Lipolase™ 및 다른 효소조성물에서와 같이).

리파제의 첨가량은 넓은 범위, 예를들어 계면활성 시스템 또는 세제 조성물 그램당 50 내지 30,000LU/g, 예컨대 대개 최소 100LU/g, 매우 유용하게 최소 500LU/g, 가끔 바람직하게 1000LU/g 이상 2000LU/g이상 또는 4000LU/g 이상, 매우 빈도높게 50 내지 4000LU/g 범위, 및 가능하게 200 내지 1000LU/g 이다. 본 명세서에서, 리파제 단위는 EP 특허공개 제258,068호에 정의되어 있는바와 같다.

지질분해 효소는 넓은 범위의 리파제에서 선택될 수 있다. 특히, 예를들어 다음 특허명세서에 기재된 리파제; EP특허공개 제214,761호(Novo Nordisk A/S). 제258,068호, 및 특히 테르모마이세스 라누기노수스(Thermomyces lanuginosus) ATCC 22070의 리파제에 대해 생성된 항혈청과 면역학적 교차반응을 보이는 리파아제, EP특허공개 제205,208호 및 제206,390호, 및 특히 크로모박터 비스코숨(Chromobacter viscosum) 변종 리포리티쿰(lipooyticum)NRRL B-3673의 리파제, 또는 알칼리겐스(Alcaligenes)PL-679, ATCC31371 및 FERM-P 3783의 리파제에 대해 생성된 항혈청과 면역학적 교차반응을 보이는 리파제, 또한 WO 87/00859(Gist-Brocades) 및 EP 특허공개 제204,284호(Sapporo Breweries)의 명세서에 기재된 리파아제, 특히, 예를들어, 시판되는 다음 리파제 제제가 적합하다. 리폴라제(Lipolase) 노보 노르디스크 아크티에셀스카브, 아마노(Amano) 리파제 CE, P, B, AP, M-AP, AML, 및 CES, 및 메이토(Meito) 리파제 MY-30, OF, 및 PL, 또한 에스테라제(Esterase)MM, 리포자임(LiPozym), SP225, SP285, 사이켄(Saiken) 리파제, 엔제코(Enzeco) 리파제, 토요조조(Toyo Jozo) 리파제 및 디오신트(Diosynth) 리파제(상표).

아밀라제는 필요한 경우, 예를들어 세제조성물 그램당 약 1 내지 약 100MU(말토스단위)(또는 0.014 내지 1.4, 예컨대 0.07 내지 0.7, KNU/g(Novo 단위)) 범위의 양으로 사용된다. 셀룰라제는 필요한 경우 예를들어 세제 조성물 그램당 약0.3 내지 약35 CEVU단위 범위의 양으로 사용된다.

본 발명의 세제조성물에 통상적인 양으로 존재하는 조성분은 통상의 세제에 대해 다음과 같다: 조성물은 제조되어 있거나, 또는 제조되어 있지 않을 수 있으며, 제로-P타입(즉, 인 함유 빌더를 전혀 포함하지 않음) 에 속할 수도 있다. 그러므로, 조성물은 총합해서 하나 또는 그 이상의 유기 및/ 또는 무기 빌더를 예컨대 1 내지 50중량%, 즉 최소한 약 5중량%, 및 대개는 약 35-40% 중량% 포함할 것이다. 통상적인 빌더의 예에는 위에 기재된 것외에 알칼리 금속 오르토, 피로, 및 트리폴리포스페이트, 단독으로 또는 방해석과 혼합된 알칼리 금속 탄산염, 알칼리 금속 시트르산염, 알칼리 금속 니트릴로트리아세트산염, 카르복시메틸 옥시숙신산염, 제올라이트, 폴리아세탈카르복실산염등이 있다.

더욱이, 세제 조성물은 1 내지 35%의 표백제 또는 전구체 또는 활성제를 지닌 표백제 및/또는 전구체를 포함할 것이다. 선택적인 조성분에는 비누거품 촉진제, 거품 억제물, 항-부식제, 얼룩-현탁제, 격리제, 얼룩재침착 방지제, 향료, 염료, 효소용 안정화-제등이 있다.

조성물은 면 및 폴리에스테르 기저 직물 및 이들 혼합물에 대해 제한없이 직물의 세척에 사용될 수 있다. 세척 과정은 예를들어 약60내지 65℃ 또는그 이하, 예컨대 약30 내지 35℃ 또는 그 이하의 온도에서 수행되는 것이 특히 적합하다. 세척액에 존재하는 계면활성제의 약 0.4 내지 0.8g/ℓ를 제공하기에 충분한 속도로 조성물을 사용하는 것이 매우 적합하다. 필요한 경우, 물론 보다 낮거나 높은 농도로 사용하는 것이 가능하다.

제한없이, 제제가 실질적으로 실시예에서와 같은 경우. 세제 제제의 약 1 내지 10g/ℓ, 예컨대 약 3 내지 6g/ℓ의 사용- 속도가 적합할 것이다.

몇가지 유용한 구체예에 있어서, 세제조성물이 다음과 같이 제조된다.

세제 Ⅰ:

본 발명의 구체예에 따른 제올라이트 빌더 함유세제 분말이 다음을 포함하도록 제조하였다.

총 약16%의 활성 세제, 음이온 세제 약 9%, 비이온성 세제 약 6%, 제올라이트함유 빌더 약20%, 아크릴 또는 등가의 중합체 약3.5%, 과붕산염 표백전구체 약 6 내지 18%, 아미노-함유 표백활성제 약 2%, 규산염 또는 다른 구조제 약 3.5%(선택적으로 약 2.5%까지 낮출수 있음), 효소 약 8(선택적으로 약 15)글리신 단위/mg 등급(알칼리를 이용하여 원하는 pH로 조절하여 사용), 및 중성 무기염 및 효소(각 효소 0.5%).

음이온성 세제는 소디움 도데실- 벤젠 술포네이트, 선택적으로 소디움 선형 알킬- 벤젠-술포네이트 6% 및 1차 알킬 술페이트 3%의 혼합물이다. 비이온성 세제는 몰당 7 에톡실레이트 잔기를 지닌 약 C13 내지 C15의 에톡실레이트이다. 제올라이트빌더는 타입 A 빌더이다. 중합체는 폴리아크릴산이다. 과붕산염 표백 전구체는 사붕산 나트륨 사수화물 또는 일수화물이다. 활성제는 데트라아세틸-에틸렌디아민이다. 구조제는 규산나트륨이다. 중성무기염은 황산나트륨이다.

세제Ⅱ:

본 발명의 구체예에 따라 세제수용액이 다음을 포함하도록 제조하였다:

도데실벤젠-술폰산 16%, 7몰/ 산화에틸렌 몰로 축합된 C12 내지 C15선형 알코올 7%, 모노에탄올아민 2%, 시트르산 6.5%, 크실렌술폰산 나트륨 6%, 수산화나트륨 약 4.1%, 프로테아제 0.5%, 기타 미량의 물질 및 물을 합하여 100%, pH는 9 내지 10 사이의 값으로 조절된 다.

다른 유용한 구체에에서, 세제 조성물은 국제특허공개 제 WO 91/00334호, 제 WO 91/00335호, 국제특허출원 제 PCT/DK91/00399호에 따라 제조될 수 있다.

본 발명은 더나아가서 하기 실시예에 예시되어 있는 바, 그것을 주장하는 본 발명의 범위를 어떤 식으로도 제한하기 위해 의도된 것이 아니다.

[실시예]

[실시예 1]

제조 실시예

야생형 및 본 발명의 구체예에 따른 프로테아제 효소를 암호화하는 유전자의 제조 및 발현을 위한 최근의 바람직한 방법이 하기 실시예에 에시되어 있는 바, 다음 재료가 언급되어 있다:

바실러스 서브틸리스 309 및 147은 바실러스 렌투스(Bacillus lentus)의 변이체로서 NCIB 에 수탁번호 NCIB 10147 및 NCIB 10309로 기탁되어 있고, 미국특허 제 3,723,250호에 기재되어 있으며, 여기에 참고로 포함되어 있다. 이 콜라이(E. coli) MC 1000(M.J. Casadaban 및 S.N. Cohen(1980); J. Mol. Biol.; 138

179-207)을 통상적인 방법으로 r-, m+로 만들었으며, 이것은 미국특허출원 제 039,298호에 또한 기재되어 있다.

서브틸리신 309 및 그 돌연변이체를 암호화한 합성유전자에 적합한 벡터를 제조하였다. 벡터는 본질적으로 pUC19 플라스미드[C. Yanish-Perron 및 J. Messing(1985); Gene; 33 103-119]였으며, 이 플라스미드의 다수 클로닝 위치는 유전자를 구성하는 5개의 아절편을 분리하는데 이용되는 제한위치를 포함하는 링커에 의해 치환되었다. 새로운 링커를 EcoRI-Hind III로 절단한 pUC19에 삽입하여 이들 위치를 파괴하였다.

(RI) KpnI PstI EcoRI Hind3 ClaI SphI Bam (H3)

5'-AATTGGTACCCTGCAGGAATTCAAGCTTATCGATGGCATGCGGATCC-3'

3'- CCATGGGACGTCCTTAAGTTCGAATAGCTACCGTACGCCTAGGTCGA-5'

서브틸리신 309의 완전한 부분을 암호화한 합성유전자를 하기 설명 및 첨부된 도면의 제1도(1/7 내지 7/7면) 에 나타낸 그림에서와 같이 제조하였다. 합성유전자의 구조를 1/7 내지 4/7면에 요약하여 나타냈다. 제조에 사용한 절편도 또한 나타냈다. 각 아절편은 6내지 12 올리고뉴클레오티드로부터 만들었다. 올리고뉴클레오티드는 조절된 유리 지지체상에서 포라미디트 화학반응을 이용하여 자동 DNA합성기에서 합성하였다[S.L. Beaucage 및 M.H. Caruthers(1981); Tetrahedron Letters; 22 1859-1869]. 도면에 있는 올리고뉴클레오티드의 5'-말단에 존재하는 점은 이들 올리고뉴클레오티드가 인산화되어 있음을 의미한다. 2중가닥(1/7 내지 4/7면에 나타냈음) 은 올리고뉴클레오티드의 대응하는 쌍을 90℃에서 5분간 가열한 후 75분간에 걸쳐 실온으로 냉각시켜 만들었다. 2중 가닥을 혼합하고 T_4 DNA 리가제로 처리하였다.

5개의 아절편을 2% 아가로스 겔에서 분리하여 pSX191 에 삽입하였다. 디데옥시뉴클레오티드 서열결정법으로 서열을 확인하였다. 절편 A-E를 분리하고 KpnI-BamHI 로 절단된 pSX191과 함께 연결하였다. 반응혼합물을 이용하여 암피실린 저항성 선별이 가능한 컴피턴트 이. 콜라이 MC 1000 r-, m+를 형질전환시켰다. 이어서 효소의 완전한 부분을 암호화한 서브틸리신 309 유전자의 부분을 구성하는 850bp KpnI-BamHI 절편을 이용하여 pSX212의 야생형 유전형를 치환시켜 pSX222를 제조한 후 컴피던트 바실러스 서브틸리스 SHa273으로 형질전환시켰다. 형질전환된 균주를 배양하여 효소를 정제한 결과 생성물은 아생형 생성물과 구별할 수 없었다.

합성 유전자에서 유도된 프르테아제 변이체은 돌연변이가 요구되는 위치에 변화된 서열을 지니는 올리고뉴클레오티드(하기 서열참조)를 합성유전자에 적합한 올리고뉴클레오티드와 혼합하여 만들었다. 벼형된 유전자의 어셈블리는 상기와 유사한 방법으로 변형된 재료를 이용하여 수행하였다. 널리 알려진 합성 유전자에 관한 더 이상의 정보를 Agarval등(1970); Nature;227 27-34에서 얻을 수 있다.

KpNI 위치를 효소의 완전한 부분을 암호화한 서브틸리신 309 합성유전자의 처으머에 삽입하였다. 이용한 방법은 올리고뉴클레오티드 지령 2중가닥 파괴 수선 돌연변이 유발이라 불리며 Wlodek Mandecki(1986); Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 83 7177-7181에 기재되어 있다. NcoI을 이용하여 pSX172를 서브틸리신 309의 완전한 부분의 처음부분에서 개환시키고 올리고뉴클레오티드 NOR789(제1도(7/7)의 서열참조)와 혼합한 후, 100℃로 가열하고, 0℃로 냉각시킨 후 이. 콜라이로 형질전환시켰다. 재형질전환시킨후, 32-P-표지 NOR 789를 이용하여 콜로니 혼성화에 의해 재조합체를 스크리닝하였다. 스크리닝에서 양성으로 판별된 재조합체는 아미노산 서열의 변화없이 2개의 염기가 변화되어 NcoI의 바로 앞에 도입된 KphI 위치를 지녔다. pSX172는 EP 특허공개 제405,901호에 기재되어 있다. 그와같이 생성된 KpnI 위치를 400-bp PvuI-NheI 단편상에서 pSX120에 삽입시켜 pSX212를 만들었다. pSX120은 역시 EP특허공개 제405,901호에 기재되어 있다.

합성유전자를 pSX212 상의 KpnI 및 BamHI 사이에 삽입시켜 pSX222를 만들었다.

올리고뉴클레오티드의 대응하는 서열 및 돌연변이가 하기에 예시되어 있다:

A194P (단편 D3)

```
5'- AACAACCGCGCTAGCTTTTCACAGTATGGCCCAGGC - 3'
          ||||||||||||||||||||||||*||||||
    3'- GCGCGATCGAAAAGTGTCATACCGGGTCCGGAACTG - 5'
```

A172P (단편 D2)

```
5'- CGCTATCCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGATCAAAAC - 3'
         *|||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     3' - GGCTTGCGTTACCGTCAGCCTCGATGACTAGTTTTGTTGTTG - 5'
```

S57P (단편 B1)

```
5' - AGCTTTGTACCAGGGGAACCGCCGACTCAAGATGGG - 3'
          ||||||||||||||||||*||||||||||||||
    3' - AACATGGTCCCCTTGGCGGCTGAGTTCTACCCTTACCC - 5'
```

이들 올리고뉴클레오티드를 변화되지 않은 합성유전자로부터 얻은 올리고뉴클레오티드의 나머지와 결합시켰다.

[실시예 2]

정제 실시예

이 방법은 서브틸리신 147효소, 서브틸리신 309효소 또는 그 돌연변이체의 10 리터 규모 발효의 정제에 관한 것이다.

대략 8리터의 발효액을 5000rpm에서 35 분간 1리터 비커에서 원심분리하였다. 10% 아세트산을 이용하여 상징액을 pH 6.5로 조절한 후 Seitz Supra S100필터 플레이트에서 여과하였다.

Amicon S1Y10 UF 카트리지가 설치된 Amicon Ch2A UF 유니트를 이용하여 여과물을 약 400㎖로 농축시켰다. UF 농축물을 원심분리하고 여과한 후 실온에서 pH7의 바시트라신(Bacitracin) 친화컬럼에 넣었다. 0.01 디메틸글루타르산 0.1M 붕산 및 0.002M 염화칼슘이 들어있는 pH7의 완충액중의 1M 염화나트륨 및 25% 2-프로판올을 이용하여 실온에서 프로테아제를 바시트라신 칼럼에서 용출시켰다.

바시트라신 정제 단계에서 분리된, 프로테아제 활성을 지니는 분획을 모아서 0.01디메틸글루타르산 0.2M 붕산 및 0.002m 염화칼슘을 함유하는 pH6.5의 완충액으로 평형화된 세파덱스 G25 컬럼(직경 5㎝) 750㎖에 적용시켰다.

세파덱스 G25 컬럼에서 얻은, 단백질분해 활성을 지니는 분획을 모아서 0.01M 디메틸글루타르신, 0.2M 붕산, 및 0.002M 염화칼슘을 함유하는 DH 6.5의 완충액으로 평형화된 CM세파로스 CL 6B 양이온 교환컬럼(직경 5㎝)150㎖에 적용시켰다.

2리터의 동일한 완충액에서 0 내지 0.1M 염화나트륨(서브(sub)147의 경우 0 내지 0.2M 염화나트륨)의 선형 구배를 이용하여 프로테아제를 용출시켰다.

최종 정제단계에서, CM 세파로스 컬럼에서 얻은 프로테아제 함유 분획을 모아 GR81pp 막이 설치된 Amicon 초여과 셀(Danish Sugar Factories Irc. 에서 구입)에서 농축시켰다.

[실사예 3]

시차 주사 열량측정

정제된 프르테아제 변이체을 시차 주사 열량측정(DSC)을 이용하여 열분석을 수행하였다.

계기는 자료의 수집 및 분석을 위해 HP86 컴퓨터에 연결된 세타람(Setaram) 마이크로 DSC 장치였다. 세타람 소프트웨어를 이용하였다.

효소를 하기 조성분의 액체형 세제(pH 8.5)에서 농도가 바람직하게 2㎎/㎖이 되게 희석하였다.

AE^{1} (C_{12-14}) ; EO 6 15%

LAS^{2} (C_{12}) 10%

코코넛 지방산 9%

올레산(C_{18}) 1%

트리에탄올아민 (pKA 7.9) 9%

글리세롤 10.5%

에탄올 1.5%

시트르산나트륨 8%

CaCl ; $2H_2O$ 0.1%

NaOH 1%

물 34.9%

[1]) 알코올 에톡실레이트

[2]) 선형 알킬벤젠 술포네이트

가열 속도는 25℃에서 90℃까지 0.5℃/분이었다.

야생형 효소에 대한 서브틸리신 309 변이체의 안정화를 이 방법으로 측정하여 상기 표 3에 나타냈다.

[실시예 4]

저장 안정성

본 발명 효소의 저장 안정성을 측정하여 서브틸리신 309(야생형)의 저장 안정성과 비교하였다. 이 저장 안정성 시험은 미니 저장시험으로 수행하였다. 각 튜브에 샘플 100㎕를 사용하였다.

효소 용량은 효소 0.25㎎/세제g 이었다. 액체세제 조성물을 이 시험에 사용하였다. 상기의 세제II를 참조한다.

튜브를 35℃에서 3, 7, 14, 및 21일동안 각각 배양하여 잔류활성을 결정하였다.

잔류활성 측정 방법은 단백질분해 효소에 의한 디메틸카세인(DMC) 용액의 소화에 근거하였다. 이 반응에서 생성된 1차 아미노기는 트리니트로벤젠 술폰산(TNBS)과 반응하여 채색된 복합체를 형성하였다. 반응은

시간단위당 흡광도의 변화를 측정할 수 있도록 인 시투에서 수행하였다.

세제는 I차 아미노기를 지닌 화합물을 포함할 수 있기 때문에, 이를 측정하여 세제효과를 수정하는 것이 필요하다. 순수세제의 블라인드(blind) 값을 측정하고 상기와 같이 측정한 값에서 이값을 빼서 수정하였다.

활성은 제조후 즉시 냉동되어 분석시까지 -10℃에 보관된 샘플에 대해 측정하였다. 이 샘플의 활성을 100% 로 설정하였다. 저장 시험에서 얻은 대응샘플의 활성은 100%샘플에 대해 결정하였다.

반응조건:

온도 : 40℃

pH: 8.3

파장: 420㎚

반응시간: 9분

측정시간: 3분

기구: Roche 에서 구입한 <COBAS> FARA II

원심분리 분석기

모든 활성을 중복해서 측정하였다.

이 분석방법이 기재된 인쇄물 AF 285/1(또는 재판)은 요구에 의해 덴마크의 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브로 부터 구입할 수 있고, 여기에 참고로 포함되어 있다.

저장 안정성 시험의 결과를 제2도에 나타냈다. 일반적으로 DSC로 측정한 열안정성 및 저장 안정성은 매우 상관적이다.

[실시예 5]

세척능

세척능 시험은 풀즙(grass juice)을 묻힌 면에 대해 20℃의 등온에서 10 분간 모델워시(model wash)에서 수행하였다.

세제로는 분말세제 5g/ℓ를 사용하였다. 상기의 세제 I 을 참조하라. NaOH/HCl 을 첨가하여 pH를 10.2 로 조절하였다. 표5에 나타낸 실험에 대해 사용한 물은 대략 9° dH(독일경도) 였다. 표6에 나타낸 시험에서는 6° dH물을 사용하였다. 직물/세척액 비는세척액 리터당 직물 6g이었다.

시험은 다음의 효소농도에서 수행하였다: 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 및 20㎎ 효소 단백질/ℓ, 독립적인 두세트의 시험을 각 효소에 대해 수행하였다. 이들 시험에 대한 결과를 표 5 내지 6에 나타냈다.

세척후, 직물을 흐르는 수돗물에서 헹군후 공기중에서 건조시켰다. 프로테아제 효능을 Datacolor Elrephometer 2000으로 460㎚에서 경감(%R)의 변화(△R)로 측정하였다. △R은 프로테아제를 첨가하여 세척한 후의 경감도에서 프로테아제를 첨가하지 않고 세척한 후의 경감도를 뺀 값이다.

세척능 시험의 결과를 표5 내지 표6에 나타냈다. 서브틸리신 309/S256P를 제외한 모든 변이체은 최소한 서브틸리신 309(야생형)와 동일한 효능을 나타냈다.

[표5]

미분 경감도, 델타 R

변형물	효소 용량 효소㎎/ 세제ℓ 0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0
S57P	2.4	4.4	7.4	16.8	20.0	22.1
A172P	2.4	4.4	7.5	16.9	20.1	22.3
S188P	2.2	4.8	7.5	16.9	20.9	21.7
A194P	2.5	5.3	7.6	17.5	20.5	20.8
서브틸린신 309	3.2	4.6	6.9	16.1	20.4	20.7
S259P	1.7	2.5	3.9	6.7	7.2	7.0
서브틸린신 309	0.8	2.2	3.6	5.8	6.5	6.6

[표6]

미분 경감도, 델타 R

변형물	효소 용량 효소mg/ 세제g 0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0
T38P	1.9	3.7	7.0	14.7	16.9	16.7
S99P	1.8	3.1	5.4	15.4	16.4	16.9
S256P	0.7	1.5	3.0	9.7	15.2	16.8
서브틸린신 309	1.9	3.9	6.9	14.5	16.2	17.1

[도면의 간단한 설명]

제1도(1/20-15/20면)는 합성유전자의 제조를 보여주는 도면; 및

제2도(16/20-20/20면)는 액체 세제에 저장한 후 야생형 효소와 비교한 서브틸리신 309 변이체의 잔류 활성을 보여주는 도면이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

위치: 57, 98, 172, 194 및 259(BPN' 번호)중의 하나 이상에서 본래 존재하는 이미노(프롤린 이외의)이 프롤린 잔기로 치환된 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 2

제4항에 있어서, 다음의 치환: 27R, 36D, 38P, 76D, 97N, 98R, 104Y, 120D, 128G, 188P, 195E, 206C, 218S, 235L, 235R, 237R, 242P, 251E 및 263F(BPN' 번호)중의 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 서브틸리신이 안정화된 서브틸리신 309, 안정화된 서브틸리신 147, 안정화된 서브틸리신 BPN' 또는 안정화된 서브틸리신 칼스버그(Calsberg)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 4

(2회정정) 제1항 또는 제2항에 있어서, 다음의 치환: T38P, S57P, A98P, A172P, S188P, A194P, S242P 및 S259P(BPN' 번호)중의 하나 이상이 도입된 서브틸리신 309인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 5

제4항에 었어서, 다음의 치환: K27R, *36D, N76D, G97N, A98R, V104Y, H120D, S128G, G195E, Q206C, N218S, K235L, K235R, K251E 및 Y263(BPN' 번호)중의 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 6

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/K27R+*36D+G97N+A98R+A194P+K235R+K237R+K251E+Y263F(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 7

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/K27R+*36D+G97N+A194P+K235R+K237R+K251E+Y263F(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 8

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/K271+*36D+G97N+A194P+K235R+K237R+Y263F(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 9

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+N76D+H120D+A194P+G195E+K235(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 10

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+G97N+V104Y+H120D+A194P+G195PE(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 11

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+G97N+V104Y+H120D+A194P+G195E+K235L(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 12

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+G97N+H120D+A194P+G195E(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 13

제5항에 었어서, 서브틸리신 309/*36D+G97N+H120D+A194P+G195E+K235L(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 14

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+V104Y+H120D+A194P+G195E(BPN' 번호)인 것을 특징으르 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 15

제8항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+V104Y+H120D+A194P+G195E+K235L(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 서브틸리신.

청구항 16

제8항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+H120D+A194P+G195E(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 17

제5항에 있어서, 서브틸리신 309/*36D+H120D+A194P+G195E+K235L(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 18

제8항에 있이서, 서브틸리신 309/A194P(BPN' 번호)인 것을 특징으로 하는 안정화된 서브틸리신.

청구항 19

제1항, 제2항 및 제6항 내지 제18항중의 어느 한항의 안정화된 서브틸리신을 암호화하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 20

제1항, 제2항 및 제6항 내지 제18항중의 어느 한항의 안정화된 서브틸리신을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터.

청구항 21

제1항, 제2항 및 제6항 내지 제18항중의 어느 한항의 안정화된 서브틸리신을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 발현벡터를 포함하는 바실러스(Bacillus) 숙주유기체.

청구항 22

제3항의 안정화된 서브틸리신을 암호화하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 23

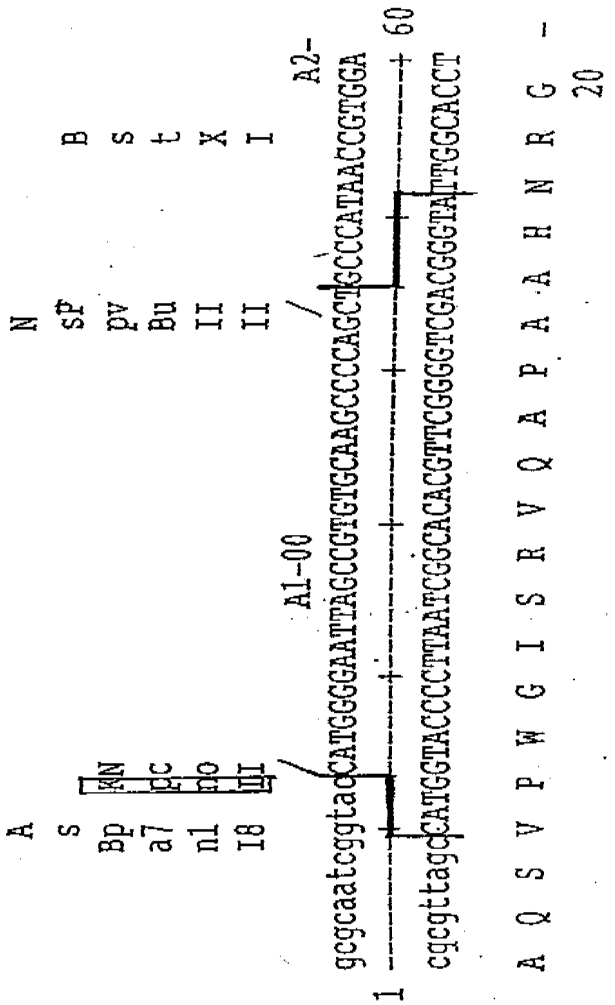
제3항의 안정화된 서브틸리신을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현벡터.

청구항 24

제3항의 안정화된 서브틸리신을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 지니는 발현벡터를 포함하는 바실러스(Bacillus) 숙주유기체.

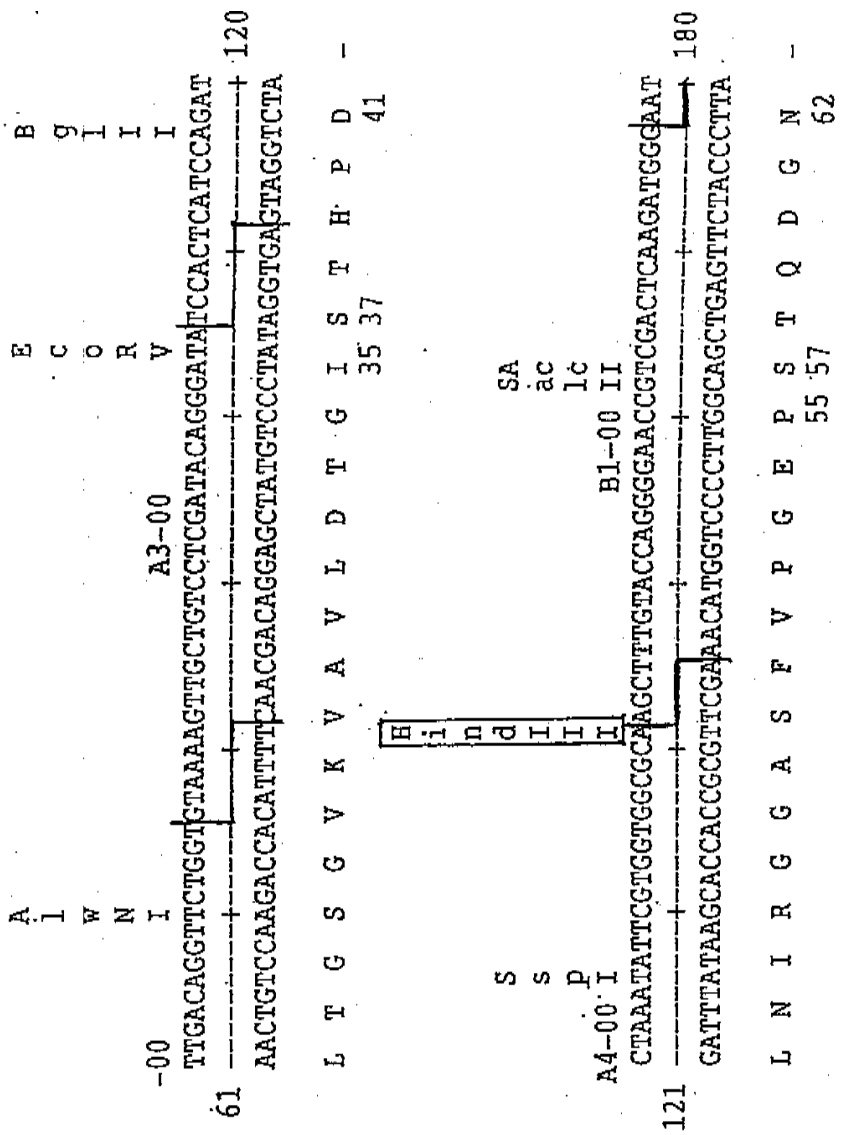
도면

도면1a

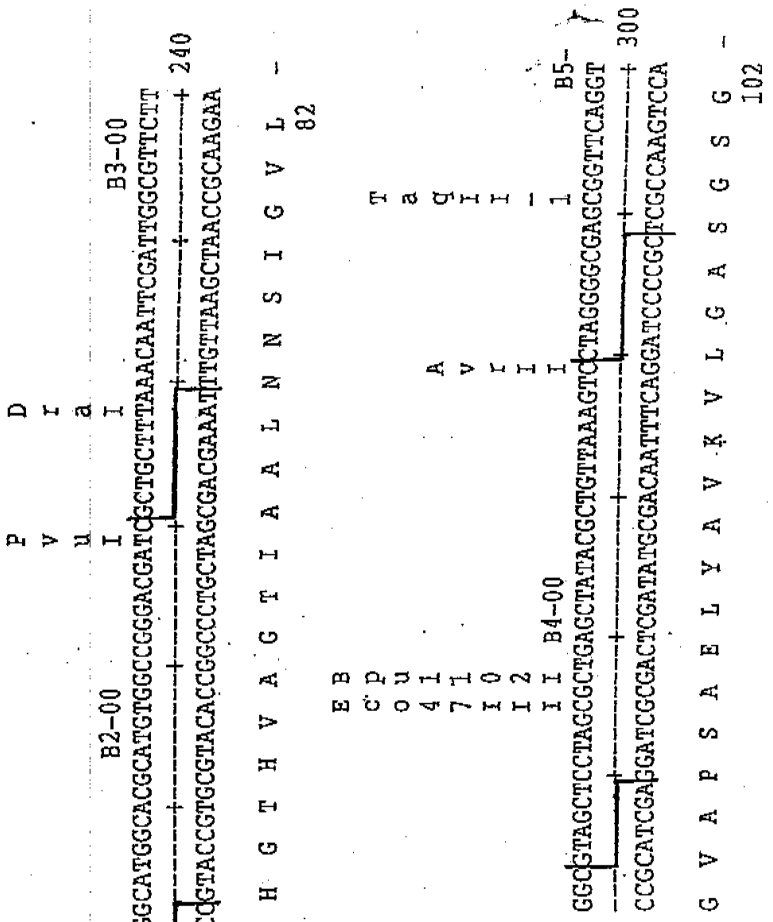

A1-00
A2-
gcgcaatcggtagCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCCAGCTGCCCATAACCGTGGA
cgcgttagccATGGTACCCCTTAATCGGCACACGTTCGGGGGTCGACGGGTATTGGCACCT
A Q S V P W G I S R V Q A P A H N R G -
20
60

도면16

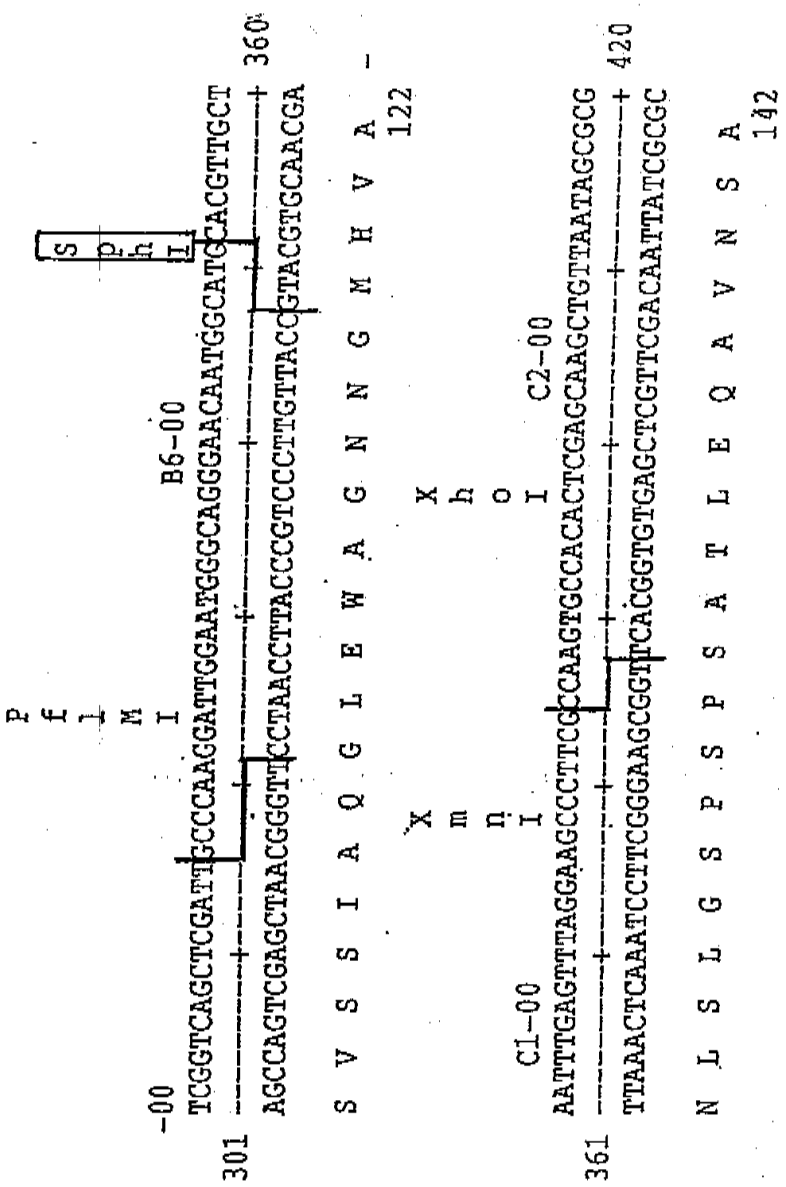
```
          A                                  E          B
          l                                  c          g
          w                                  o          l
          N                                  R          I
  -00     I                    A3-00         V          I
  TTGACAGGTTCTGGTGTAAAAGTTGCTGTCCTCGATACAGGGATATCCACTCATCCAGAT
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
  AACTGTCCAAGACCACATTTTCAACGACAGGAGCTATGTCCCTATAGGTGAGTAGGTCTA

  L  T  G  S  G  V  K  V  A  V  L  D  T  G  I  S  T  H  P  D  -
                                            35 37          41
                    H
                    i
                    n
      S             d                       SA
      s             I                       ac
      p             I                       lc
  A4-00 I           I                B1-00 II
  CTAAATATTCGTGGTGGCGCAAGCTTTGTACCAGGGGAACCGTCGACTCAAGATGGGAAT
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
  GATTTATAAGCACCACCGCGTTCGAAACATGGTCCCCTTGGCAGCTGAGTTCTACCCTTA

  L  N  I  R  G  G  A  S  F  V  P  G  E  P  S  T  Q  D  G  N  -
                                         55 57          62
```



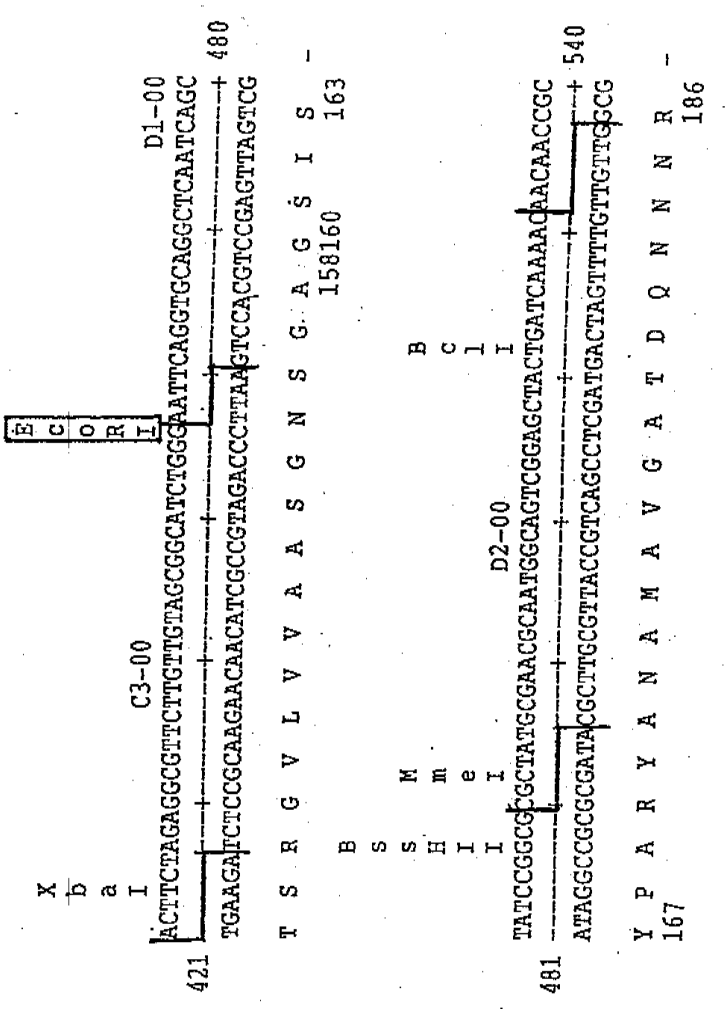
도면1c


P D
v r
u a
I I
B2-00 B3-00
GGGCATGGCACGCATGTGGCCCGGGACGATCGCTGCTTTAAACAATTCGATTGGCGTTCTT
181 + + + + 240
CCCGTACCGTGCGTACACCGGCCCTGCTAGCGACGAAATTTGTTAAGCTAACCGCAAGAA
G H G T H V A G T I A A L N N S I G V L -
82
E B
c P
o u
4 1
7 1
I 0
I 2
I I B4-00
GGCGTAGCTCCTAGCGCTGAGCTATACGCTGTTAAAGTCCTAGGGGCGAGCGGTTCAGGT
241 + + + + 300
CCGCATCGAGGATCGCGACTCGATATGCGACAATTTCAGGATCCCCGCTCGCCAAGTCCA
G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G -
102
I
1
B5-

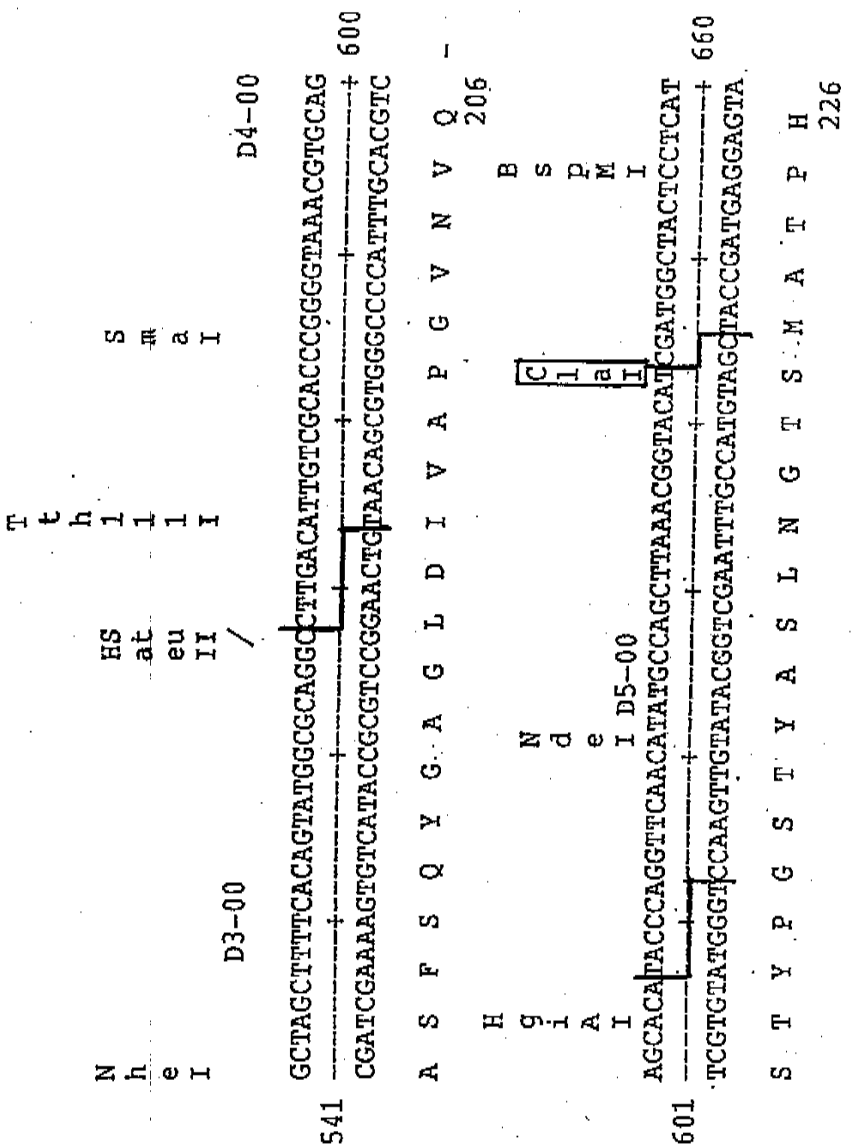
도면1d


P
f
l
M
I
S
p
h
L
-00
B6-00
TCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCT
301
AGCCAGTCGAGCTAACGGGTTCCTAACCTTACCCGTCCCTTGTTACCGTACGTGCAACGA
360
S V S S I A Q G L E W A G N N G M H V A -
X
m
n
X
h
o
122
C1-00
I
C2-00
AATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCAAGTGCCACACTCGAGCAAGCTGTTAATAGCGCG
361
TTAAACTCAAATCCTTCGGGAAGCGGTTCACGGTGTGAGCTCGTTCGACAATTATCGCGC
420
N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A
142

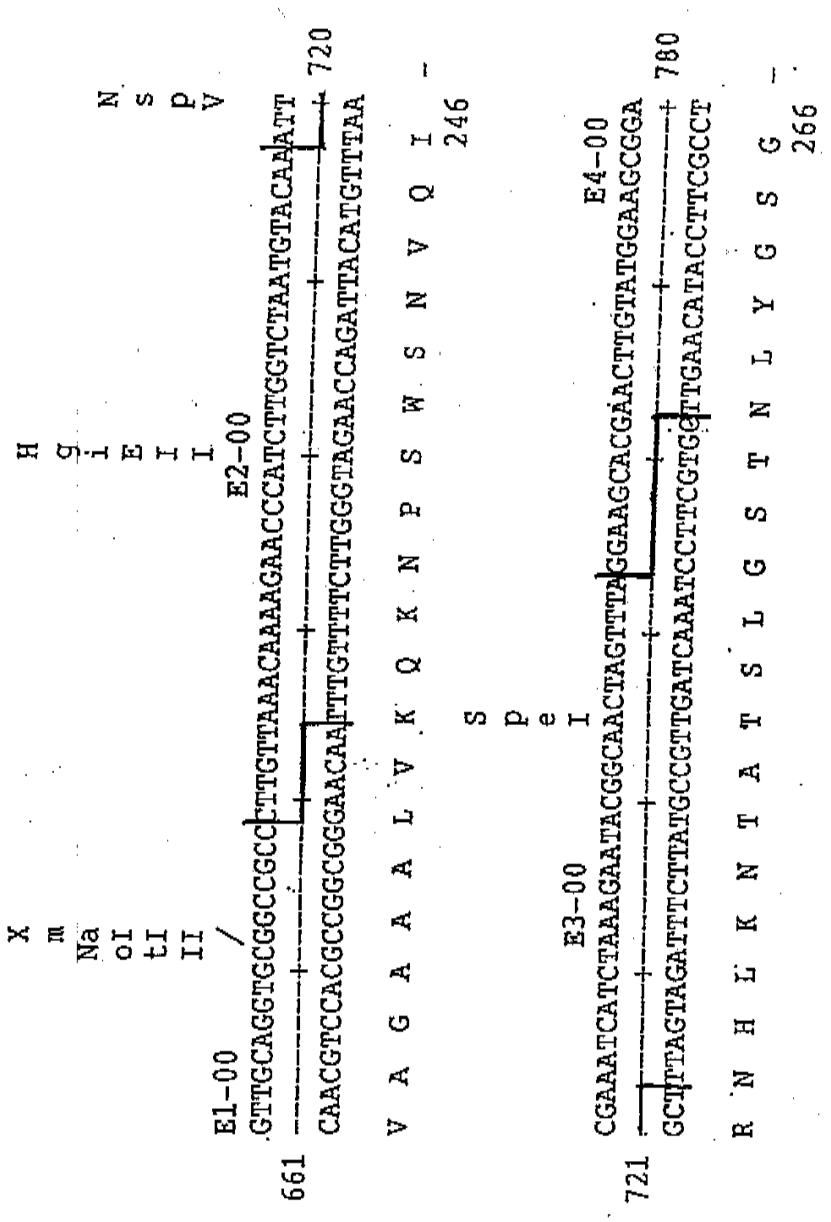
도면1e


EcoRI
C3-00
D1-00
ACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTAGCGGCATCTGGCAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGC
TGAAGATCTCCGCAAGAACAACATCGCCGTAGACCCTTAAGTCCACGTCCGAGTTAGTCG
421
480
T S R G V L V V A A S G N S G A G S I S -
158160
163
D2-00
TATCCGGCGCGCTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGATCAAAACAACAACCGC
ATAGGCCGCGCGATACGCTTGCGTTACCGTCAGCCTCGATGACTAGTTTTGTTGTTGGCG
481
540
Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R -
167
186

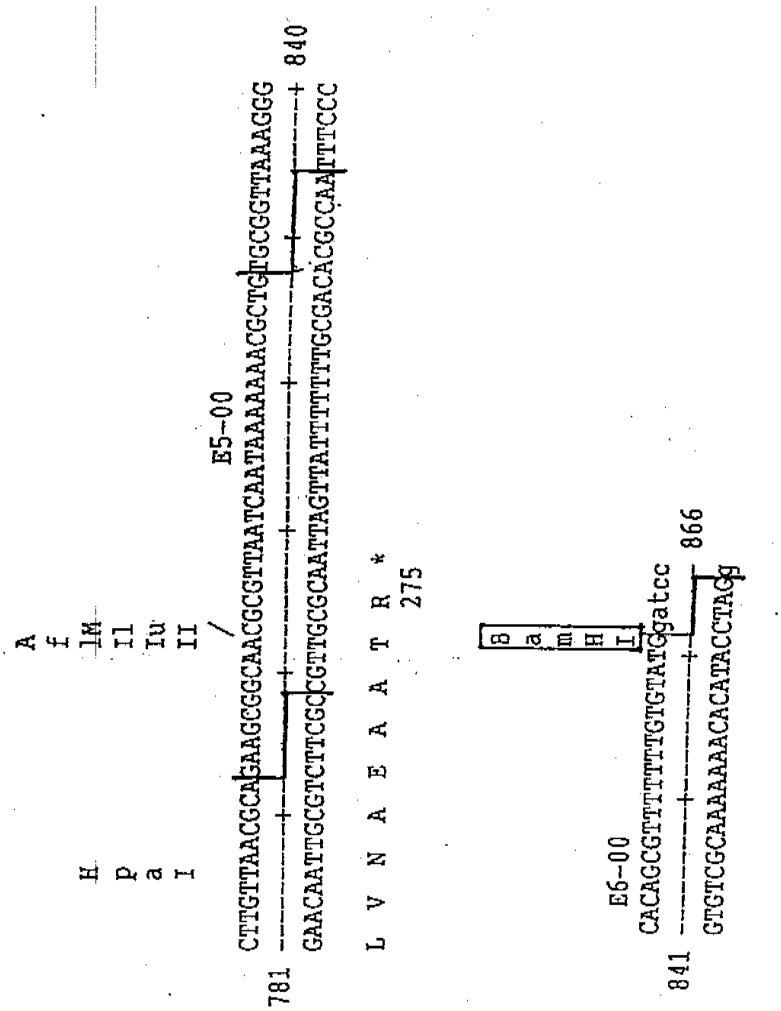
도면1f


T
t
h
N 1 S
h 1 m
e 1 a
I I I
D3-00 D4-00
HS
at
eu
II
/
GCTAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGCCTTGACATTGTCGCACCCGGGGTAAACGTGCAG
541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
CGATCGAAAAGTGTCATACCGCGTCCGGAACTGTAACAGCGTGGGCCCCATTTGCACGTC
A S F S Q Y G A G L D I V A P G G V N V Q -
206
H B
g C s
i l d
A a e
I I I D5-00 I
AGCACATACCCAGGTTCAACATATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCAT
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660
TCGTGTATGGGTCCAAGTTGTATACGGTCGAATTTGCCATGTAGCTACCGATGAGGAGTA
S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H
226

도면1g


X
m
Na
oI
tI
II
H
g
i
E
I
I
N
s
p
V
E1-00
E2-00
E3-00
E4-00
GTTGCAGGTGCGGCCGCCTTGTTAAACAAAGAACCCATCTTGGTCTAATGTACAAATT
661
720
CAACGTCCACGCCGGCGGGAACAATTTGTTTCTTGGGTAGAACCAGATTACATGTTTAA
V A G A A A L V K Q K N P S W S N V Q I
S P e I
246
CGAAATCATCTAAAGAATACGGCAACTAGTTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAAGCGGA
721
780
GCTTTAGTAGATTTCTTATGCCGTTGATCAAATCCTTCGTGGTTGAACATACCTTCGCCT
R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G
266

도면1h


A
f
lM
Il
Iu
II
H
P
a
I
E5-00
CTTGTTAACGCAAAGCGGCAACGCGTTAATCAATAAAAAAACGCTGTGCGGTAAAGGG
781
GAACAATTGCGTCTTCGCCGTTGCGCAATTAGTTATTTTTTGCGACACGCCAATTTCCC
840
L V N A E A A T R *
275
E6-00
CACAGCGTTTTTTTGTGTATGgatcc
841
GTGTCGCAAAAAACACATACCTAGg
866
B
a
m
H
I

도면11

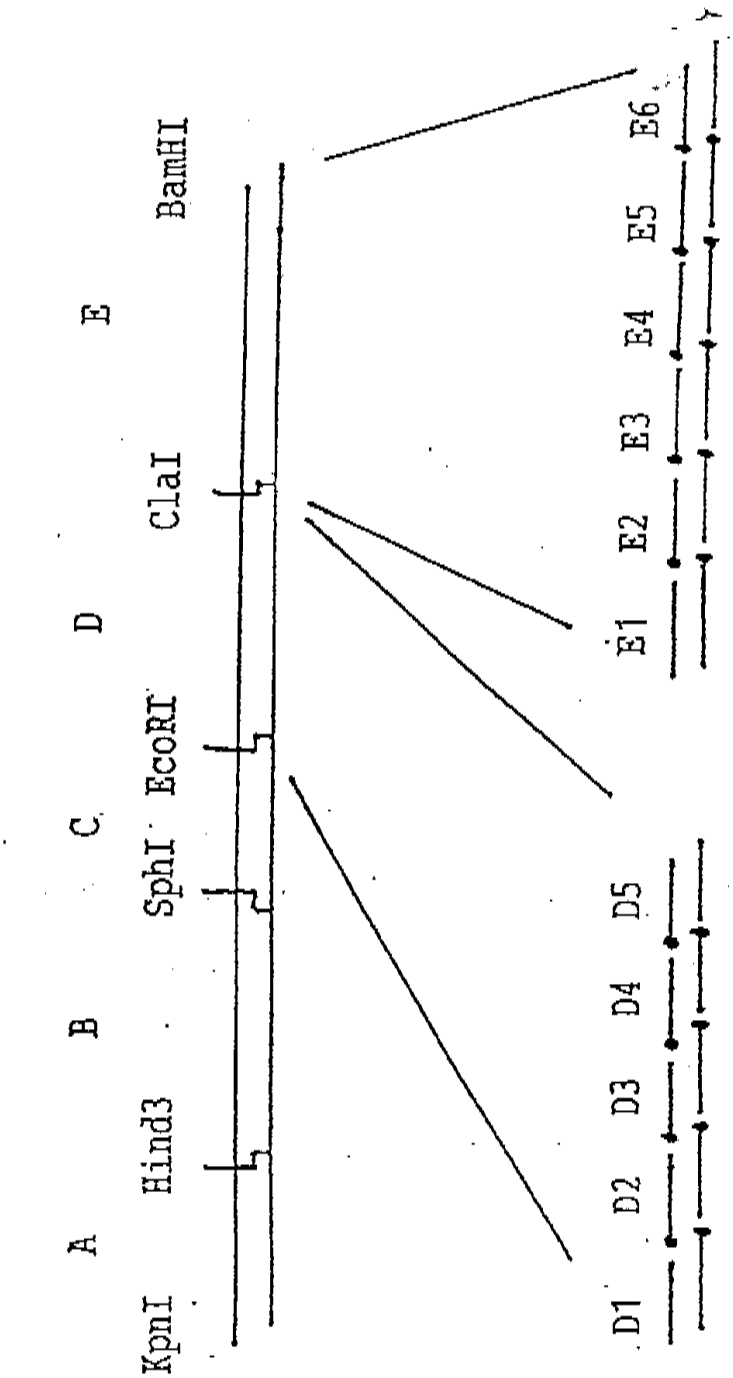
한단하는 표1:

AccI	AflIII	AlwNI	AvaI	AvrII	BamHI	BanI	BclI
BglII	Bpu1102I	BsgI	BsiEI	Bsp1286I	BspMI	BssHII	BstXI
BstYI	ClaI	DraI	DsaI	EaeI	Eco47III	EcoRI	EcoRV
FsiI	GdiII	HaeI	HaeII	HgiAI	HgiEII	HincII	HindIII
HpaI	KpnI	MluI	MmeI	MslI	NcoI	NdeI	NheI
NotI	NspI	NspV	NspBII	PflMI	PvuI	PvuII	SalI
SmaI	SpeI	SphI	SspI	StuI	StyI	TaqII-1	Tth111I
XbaI	XhoI	XmaIII	XmnI				

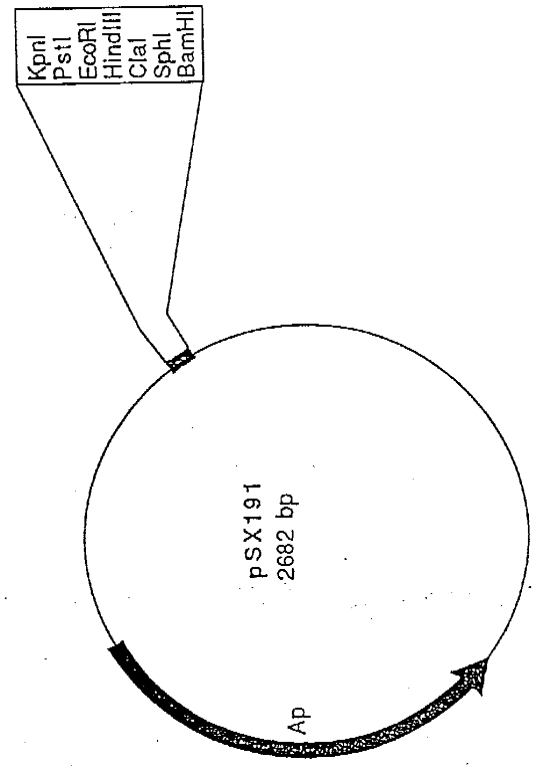
도면1j

AatII AflII AgeI ApaI ApaBI ApaLI AscI AseI
BaeI BalI BanII BbsI BcgI BcgI BetI BglI
Bpu10I BsaI BsaAI BsaBI BsaHI BsiI BsiWI BsmI
BspEI BspGI BspHI Bst1107I BstEII Bsu36I Cfr10I DraIII
DrdI DrdII Eam1105I EarI EciI Eco57I EcoNI Eco0109I
Esp3I FseI FspI GsuI MunI NaeI NarI NruI
NsiI PacI Pfl1108I PmeI PmlI PpuMI PshAI PstI
RleAI RsrII SacII SapI ScaI SfcI SfiI SgrAI
SnaBI Sse8387I SstI SwaI TaqII-2 Tth111II XcmI

도면1k


A
B
C
D
E
KpnI
Hind3
SphI
EcoRI
ClaI
BamHI
D1
D2
D3
D4
D5
E1
E2
E3
E4
E5
E6

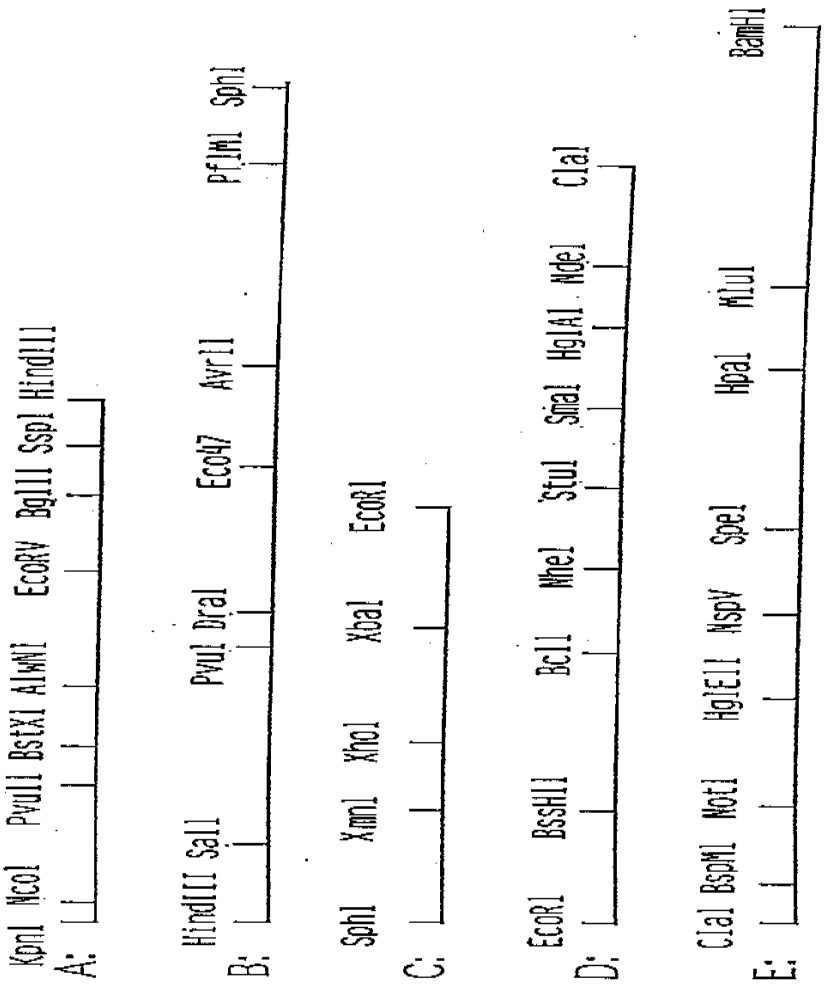
도면11



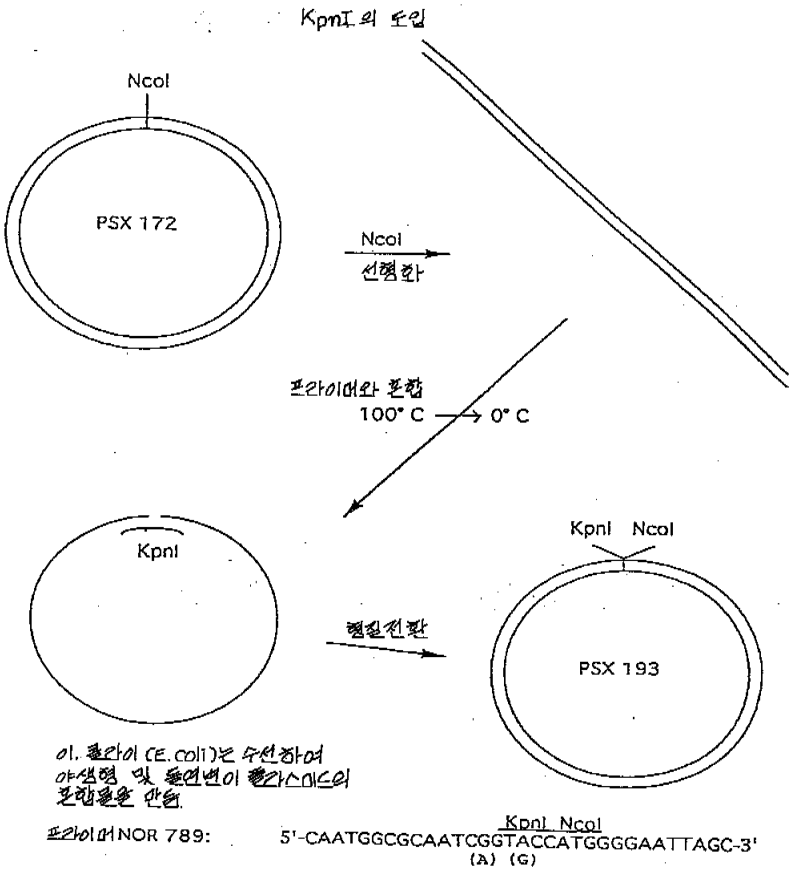
도면1m

KpnI PstI EcoRI Hind3 ClaI SphI BamHI
5'-AATTGGTACCCTGCAGGAATTCAAGCTTATCGATGCATGCGGATCC-3'
3'-CCATGGGACGTCCTTAAGTTCGAATAGCTACGTACGCCTAGGTCGA-5'

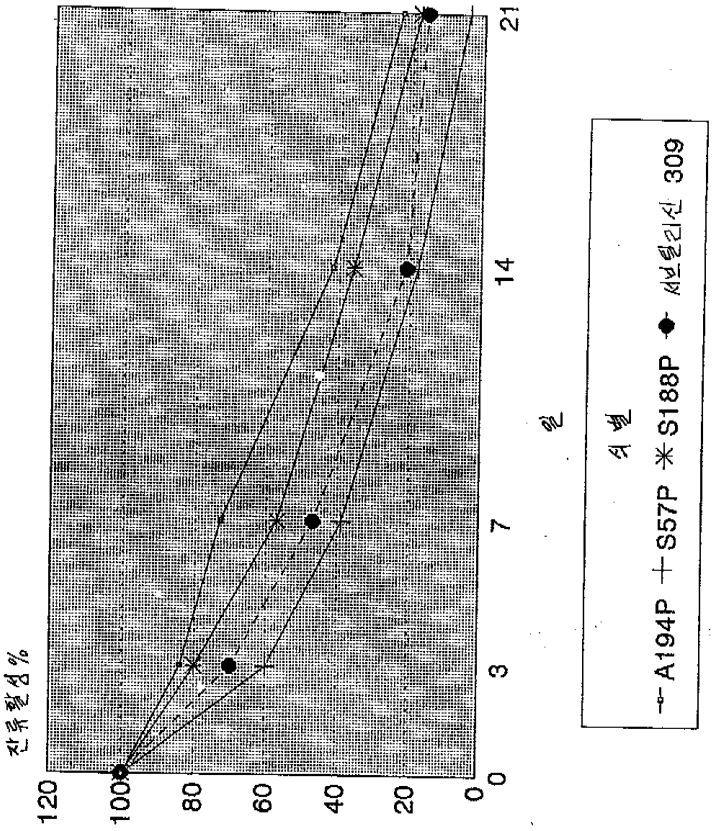
도면1n


A:
KpnI NcoI PvuII BstXI AlwNI EcoRV BglII SspI HindIII
B:
HindIII SalI PvuI BraI Eco47 AvrII PflMI SphI
C:
SphI XmnI XhoI XbaI EcoRI
D:
EcoRI BssHII BclI MheI StuI SmaI HgiAI NdeI ClaI
E:
ClaI BspMI NotI HgiEII NspV SpeI HpaI MluI BamHI

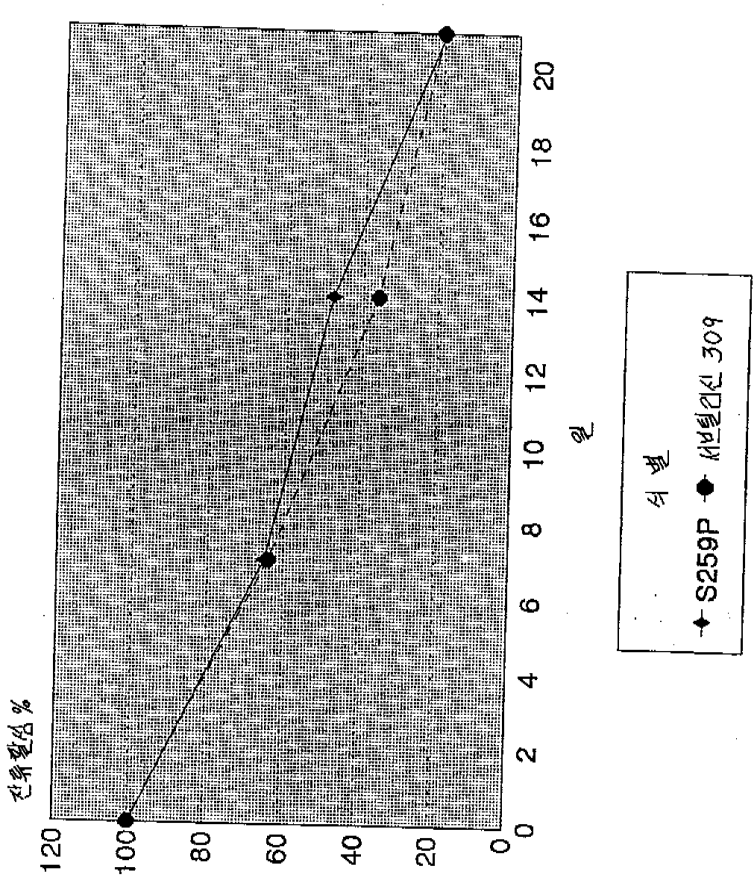
도면1o


KpnI의 도입
NcoI
PSX 172
NcoI
선형화
프라이머와 혼합
100° C → 0° C
KpnI
형질전환
KpnI NcoI
PSX 193
이. 콜라이 (E. coli)는 수선하여
야생형 및 돌연변이 콜라스미드의
혼합물을 만듦.
프라이머 NOR 789:
KpnI NcoI
5'-CAATGGCGCAATCGGTACCATGGGGAATTAGC-3'
(A) (G)

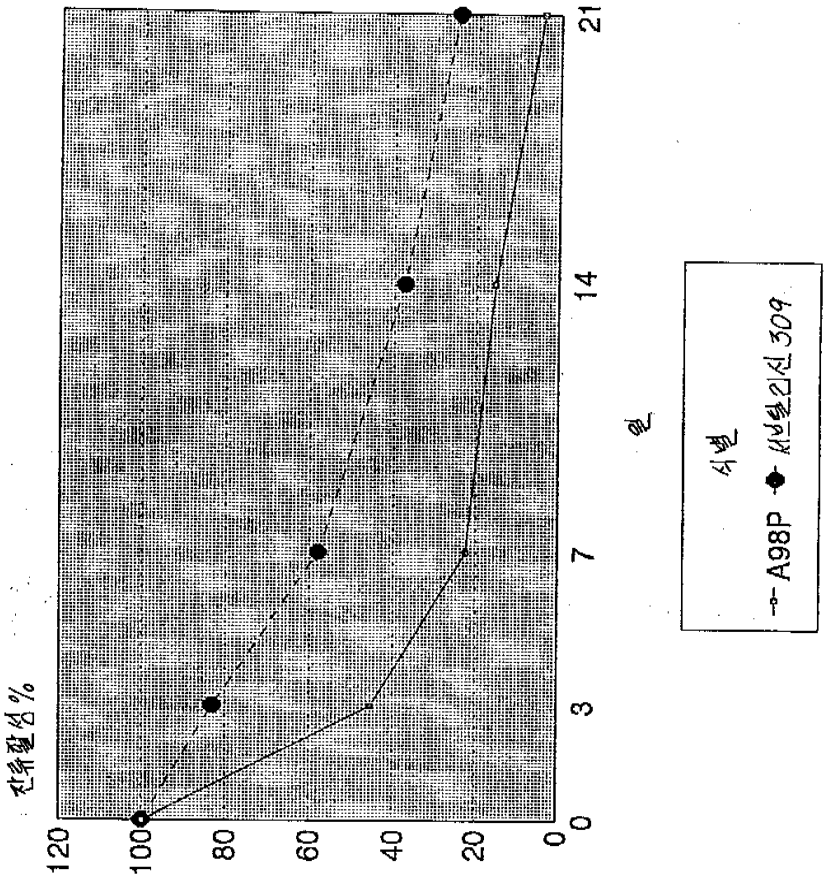
도면2a


잔류활성%
120
100
80
60
40
20
0
0
3
7
14
21
일
시별
A194P
S57P
S188P
서브틸리신 309

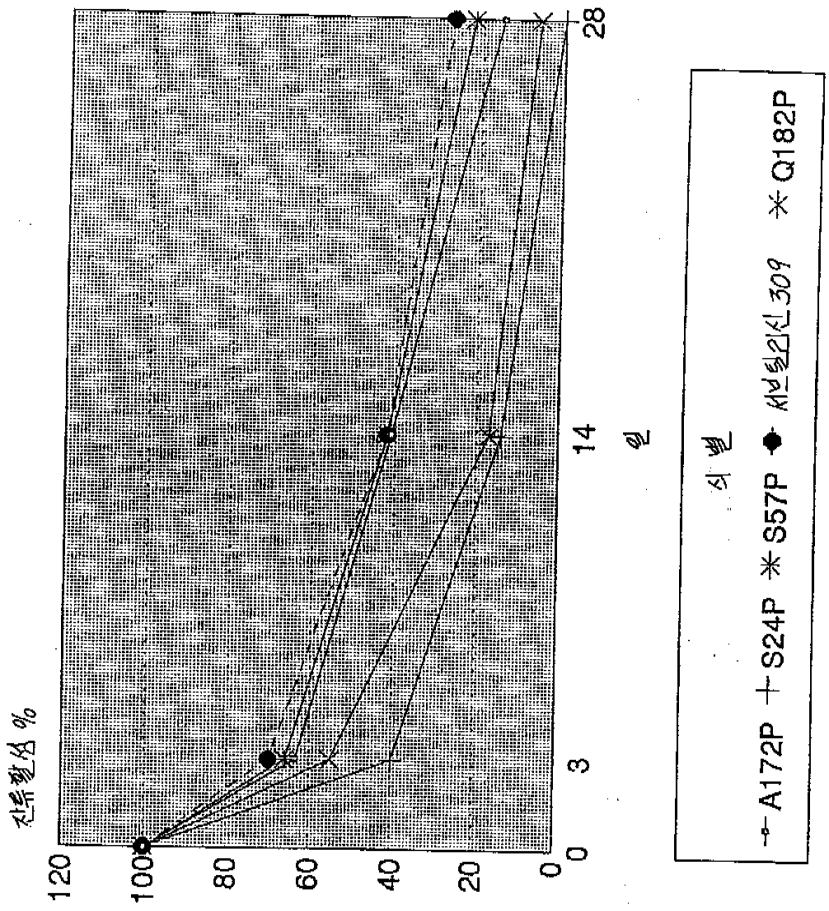
도면2b


전류활성 %
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
일
S259P
세브릴리신 309

도면2c



도면2d


잔류활성 %
120
100
80
60
40
20
0
0
3
14
28
일
A172P
S24P
S57P
세브릴린 309
Q182P