(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
C12N 9/54
A61K 37/02

(45) 공고일자 2001년12월28일
(11) 등록번호 10-0311985
(24) 등록일자 2001년10월04일

(21) 출원번호 10-1994-0703060
(22) 출원일자 1994년09월01일
번역문 제출일자 1994년09월01일
(86) 국제출원번호 PCT/DK1993/00074
(86) 국제출원출원일자 1993년03월03일

(65) 공개번호 특1995-0700406
(43) 공개일자 1995년01월16일

(87) 국제공개번호 1993/18140
(87) 국제공개일자 1993년09월16일

(81) 지정국 국내특허 : 일본, 대한민국, 미국, 중국, 라트비아, 우즈베키스탄,
EP 유럽특허: 핀랜드,

(30) 우선권주장 287/92 1992년03월04일 덴마크(DK)

(73) 특허권자 노보자임스 에이/에스
피아 스타르
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 크록쇼이베이 36

(72) 발명자 헬레아우트트루프
덴마아크디케이-2750발레루프시벤데후스베이46
클라우스담브만
덴마아크디케이-2860쇠보르그7.티.에이치.회예글라드삭세61
도리트아니타아아슬링
덴마아크디케이-4 로스킬데스스보게르슬레이피렌8
포울린데가아르트
덴마아크디케이-2100코펜하겐외.오에스테르쇠가데52

(74) 대리인 박종혁
장두현
장용식

심사관 : 이처영

# (54) 새로운프로테아제

요약

본 발명은 새로운 Bacillus sp. 균주에서 추출되는 세정제 프로테아제의 분야에 속한다. 보다 특이적으로 본발명은 Bacillus sp. PD138 균주에서 추출되는 프로테아제에 대한 것이다. 더욱, 본발명은 프로테아제의 제조방법, 프로테아제의 세정제 효소로서의 이용 및 본발명의 프로테아제를 포함하는 세정제 조성물에 대한 것이다.

## 대표도

도 1

## 명세서

### [발명의 명칭]

새로운 프로테아제

### [도면의 간단한 설명]

본발명은 첨부된 도면에 관하여 추가로 기술된다.

제1 도는 본발명에 따른 효소의 단백질 분해활성과 온도사이의 관계를 나타낸다(실시예1 에 따라 얻어진 효소제제, 기질은 2% 카세인, pH는 9.5; ■ 완충액,□ 완충액 + 0.1% (STPP)).

제2 도는 본발명에 따른 효소의 단백질 분해활성과 pH 사이의 관계를 나타낸다(실시예1 에 따라 얻어진 효소제제, 기질은 1% 카세인, 25℃).

### [발명의 상세한 설명]

#### [기술분야]

본발명은 Bacillus sp. 의 균주로부터 추출되는 세정제 프로테아제의 분야에 속한다. 보다 특이적으로는 본발명은 Bacillus sp. PD138의 균주로부터 추출된 새로운 알칼리 프로테아제에 대한 것이다. 더욱 본발명은 프로테아제의 제조방법, 세정제 효소로서의 프로테아제의 이용, 및 본발명의 프로테아제를 함유하는 세정제 조성물에 관한 것이다.

#### [배경기술]

세정제 효소는 20 년 이상동안 시판되어왔으며 현재는 전세계에 걸쳐 분말 및 액체 세정제의 정상적인 세정제 성분으로서 잘 확립되었다. 보다 더 낮은 온도 세척을 향한 경향과 함께 최근 세정제 효소 소비가 증가하였다. 세정제 제제에 사용되는 효소는 프로테아제, 리파제, 아밀라제, 셀룰라제, 뿐만아니라 기타 효소 또는 그것의 혼합물을 포함한다. 상업적으로 가장 중요한 것은 프로테아제이다.

세정제 프로테아제는 자연계에서 발견된 프로테아제를 분리한후 세정제 제제에서 시험함으로써 개발되었다. 대부분의 세정제 프로테아제는 속 Bacillus 에 속하는 것들로부터 얻어진다. 현재 새로운 유형의 프로테아제가 시판에 들어가서 다양한 특정 조건에서 보다 양호한 비용/ 성능 비율을 나타낼 가능성을 제공한다.

상업적인 프로테아제 생성물의 실례는, ALCALASE™ , ESPERASE™ 및 SAVINASE™ 이며, 모두 덴마아크의 Novo Nordisk A/S 에 의하여 공급된다. 이것들과 다른 상업적인 공급원의 유사한 효소생성물은 세정제 용액에서, 즉 8내지 11 범위의 pH 값에서 그리고 금속이온 봉쇄제, 계면활성제 및 붕산나트륨 따위의 표백제의 존재하에서 활성이 있다.

ALCALASE™ 프로테아제는 종 Bacillus licheniformis 의 균주에 의해 생성된다. ESPERASE ™ 및 SAVINASE™ 프로테아제는 호알칼리성 Bacillus 의 균주를 배양함으로써 얻어진다.

#### [발명의 요약]

본발명의 목적은 높은 pH 및 높은 이온세기에서 개선된 세척성능을 갖는 새로운 세정제 프로테아제를 제공하는 것이다.

따라서 본발명의 첫번째면은 28kD 의 겉보기 분자량을 가지고, pI가 9.5이상이고, pH 11 또는 그 이상에서 최적 pH 를 가지고(25 ℃에서), 45 내지 55 ℃범위에서 최적 온도를 가지고(pH 9.5 에서), 균주 Bacillus sp. PD138, NCIM B 40338 로부터 추출한 프로테아제와 동일하거나 또는 부분적으로 동일한 면역화학적 성질을 갖는 프로테아제를 제공하는 것이다.

본발명의 두번째 면은 균주 Bacillus sp. PD138 에 의해 대표되는 Bacillus sp. 균주의 분리한 생물학적으로 순수한 배양물에 관한 것이다.

보다 특이적으로는 본발명은 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338균주, 또는 그것의 돌연변이체 또는 변체에 관한 것이다.

본발명의 세번째 면은 프로테아제의 제조방법을 제공하는 것인데, 이 방법은 프로테아제를 생성하는 Bacillus sp. PD 138 균주를 탄소 및 질소 공급원 및 무기염류를 포함하는 적당한 영양배지에서 배양한 다음, 원하는 효소를 회수하는 것으로 이루어진다. 보다 특이적으로느 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338, 또는 그것의 돌연변이체 또는 변체, 또는 Bacillus sp. PD138 으로 부터 추출한 프로테아제와 동일하거나 부분적으로 동일한 면역화학적 성질을 갖는 프로테아제를 암호화하는 유전자를 운반하는 다른 숙주 생물체가 배양된다.

네번째 면은 세정제 효소로서의 효소의 이용에 관한 것이다.

보다 특이적으로는 본발명은 프로테아제를 함유하는 세정제 조성물 및 세정제 첨가물을 제공한다.

본발명의 다선번째 면은 프로테아제의 첨가를 포함하는 세척방법을 제공하는 것이다.

[발명의 상세한 개시]

[미생물]

본발명의 효소를 생성할수 있는 본발명의 새로운 미생물은 자메이카 토양의 샘플로부터 분리한 균주에 의해 대표된다.

Bacillus sp. PD138 은 특허절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약에 따라서, 1990년 12월 3일 수탁번호 NCIMB 40338하에 '영국 스코틀랜드 아버딘 에이비2 1알와이 에스티. 마카르 드라이브 23'에 있는 National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIMB)에 기탁되었다.

본발명의 미생물은 속 Bacillus 에 속하는 호기성이고 포자를 형성하는 세균이다. 형태학적으로 그것은 직경 0.7-0.9 미크론, 길이 2-3 미론의 운동성 있는 간균으로서 기술할수 있다. 포자는 원형 내지 타원형이고, 중앙 내지 끝가까이에 포자낭을 팽창시키지 않는다. 생장을 위한 최적온도는 25-37℃범위내이며, 생장을 위한 최적 pH는 7-9 범위내이며, pH 9.7에서는 생장하지 않고 50 ℃에서도 생장하지 않는다. 이 미생물은 영양한천사면에서 원형이고 매끄럽고 황색이감도는 또는 황색의 콜리니를 형성한다. 그리고 한천속으로 색소의 확산이 관찰되지 않는다.

[미생물의 배양]

본발명의 미생물은 다른 필수영양소와 함께 동화가능한 탄소 및 질소를 함유하는 영양배지에서 호기성 조건하에서 배양할 수 있는데, 이 배지는 공지기술의 원리에 따라 구성된다.

적합한 탄소원은 수크로스, 글로코스 및 전분 따위의 탄수화물, 또는 곡물알갱이, 맥아, 쌀 및 수수등의 탄수화물 함유물질들이다. 배지내에 포함되는 탄수화물 농도는 가령 위로는 25%까지 그리고 아래로는 1-5% 까지 크게 다를수 있지만, 대개 8-10% 가 적당할 것이며, 퍼센트는 글루코스의 당량으로서 계산된다.

영양배지내의 질소원은 무기 및/또는 유기질소원일수 있다.

적합한 무기질소원은 질산염 및 암모늄염이다.

유기질소원중에서 많은 것은 세균배양을 포함하는 발효공정에서 정규적으로 사용된다. 예시적인 실례는 콩을 굵게간 가루, 면실박, 땅콩을 굵게간 가루, 카세인, 옥수수, 옥수수 침지액, 효모추출물, 요소 및 알부민이다.

부가적으로 영양배지는 통상의 미량물질을 포함하여야 한다.

본발명의 새로운 Bacillus 종은 약간 호알칼리성이다.

따라서, 배양은 바람직하게는 약알칼리 pH 값에서 수행되는데, 이것은 생장배지의 멸균후에 중탄산나트륨(pH 9.0)등의 적당한 완충액을 첨가함으로써 획득될수 있다.

탱크발효조에서 배양하기 위해서는 인공적인 통기를 이용할 필요가 있다.

통기율은 통상적인 탱크발효에서 이용되는 것과 유사하다.

발효후 액체효소 농축물은 배양즙에서 굵은 물질을 제거함으로써 또는, 원한다면 저온에서의 증발 또는 역삼투에 의해 배양즙을 농축함으로써 생성될 수 있다.

최종적으로 방부제를 농축물에 첨가할수 있다.

고체 효소제제는 $Na_2SO_4$ 등의 염 또는 에탄올이나 아세톤등의 물-혼화성 용매로 침전시킴으로써 정제된 및/ 또는 농축된 배양즙으로부터 제조될수 있다.

또한 스프레이-건조등의 적당한 건조방법에 의해 배양즙내의 물을 제거하는 것이 이용될수 있다.

[단백질 분해 활성의 측정]

카세인을 기질로하여 단백질 분해활성을 결정하였다.

1 카세인 프로테아제 유니트(CPU)는 표준조건, 즉 25 ℃및 pH 9.5 에서 30 분동안 배양하는 조건하에서 분당 1mM 의 일차 아미노기를 방출하는 효소의 양( 세린 표준과의 비교에 의해 결정) 으로서 정의된다. 분석방법을 기술하는 폴더 AF 228 은 덴마아크의 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브에 요청하면 얻을수 있으며, 이 폴더는 여기서 참고문헌에 포함된다.

[효소]

본발명의 효소는 새로운 세정제 프로테아제이다.

그것은 본발명의 미생물, 바람직하게는 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338, 또는 그것의 돌연변이체 또는 변체를 탄소와 질소공급원 및 무기염류를 포함하는 적당한 영양배지에서 배양함으로써 얻을수 있는 알칼리 프로테아제이다.

이 효소는 또한 재조합 DNA 기술에 의하여 얻을수 있다.

본발명의 프로테아제는 하기의 특성에 의해 기술될수 있다.

[물리화학적 성질]

분자량 28 kD는 SDS-PAGE 에 의하여 결정하였다.

9.5 이상의 pI 는 LKB Ampholine ?PAG 플레이트상에서의 등전집속에 의해서 정확하게 결정할수 없다. 프로테아제활성은 PMSF, -1- 안티트립신, 및 터키- 에그- 화이트 단백질 가수분해효소 억제인자에 의하여 억제된다. EDTA 및 콩단백질 억제인자는 프로테아제 활성에 영향을 주지 않는다.

온도 활성관계는 0.1% 소듐 트리폴리포스페이트(STPP, 많은 상업적인 세정제의 공통성분)의 존재하에서( ) 그리고 부재하에서( ) 2% 카세인을 기질로하여 Ph 9.5 에서 결정하였다. 배양온도를 15 내지 70 ℃의 범위에서 변화시켜서 이전에 기술한 단백질 분해활성의 측정을 변경시켜서 이용하였다.

제1 도에 그것의 결과를 나타냈다. 이 효소는 15 ℃이하 내지 70 ℃이상의 온도에서 단백질 분해활성을 나타내며, 45 내지 55 ℃의 범위내에서, 약 50 ℃에서 최적온도를 가진다는 것을 도면으로 부터 알 수 있다.

pH에 대한 활성의 관계는 6내지 11의 pH 범위에서 미리 결정한 pH 값으로 조정한 완충액을 이용하여 동일한 과정에 의하여 결정하였다.

제2 도에 그것을 결과를 나타냈다. 이 효소는 6이하 내지 11 이상의 pH 값에서 단백질 분해활성을 나타내며, pH 10 이상에서 최적 pH 를 가지며, 더 특이적으로는 적어도 pH 11의 최적 pH 를 가진다는 것을 도면으로부터 알수 있다.

더욱이 본발명의 프로테아제는 유럽형 및 미국형 세정제에서 세척조건하에 25 ℃에서 60분동안 안정하다는 것이 발견되었다.

본발명의 프로테아제는 높은 이온세기 및 높은 pH 를 갖는 세정제에서 특별한 가능성을 갖는다. 9 ° dH(German Hardness) 물에서 pH 11에서 세척하는 동안의 세척성능시험으로부터(실시예2 참조) 세척성능은 알칼리 Bacillus 프로테아제 SAVINASE™ (덴마아크의 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브) 에 비하여 훨씬 더 양호한 것으로 나타났다.

[면역화학적 성질]

본발명의 프로테아제는 균주 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338 에서 추출된 프로테아제와 동일한 또는 부분적으로 동일한( 즉, 적어도 부분적으로 동일한 ) 면역화학적 성질을 갖는다.

면역화학적 성질은 교차반응 동일성 검사에 의하여 면역학적으로 결정할수 있다. 동일성 검사는 N. H. Axelsen; Handbook of Immuno-precipitation-in-Gel Techniques; Blackell Scientific Publications (1983), chapters 5 and 14에 따라서 탠덤 교차 면역전기영동에 의하여 또는 잘 알려진 Ouchterlony 이중 면역확산방법에 의하여 수행할 수 있다. 용어 " 항원 동일성" 및 " 부분항원 동일성" 은 동일한 책의 chapter 5, 19및 20 에서 기술된다.

단일 특이적인 항혈청은 본발명의 정제된 프로테아제로 토끼를 면역화함으로써 상기에서 언급한 방법에 따라 생성되었다.

면역원을 프로인트 보제와 혼합하고 2주일마다 토끼에 피하주사하였다.

8 주일의 전체 면역화기간후에 항혈청을 얻었고, 상기의 N,H,Axelsen 에 의해 기술된대로 그것으로 부터 면역글로불린을 제제화하였다.

Ouchterlony 이중 면역확산시험은 본발명의 프로테아제와 공지된 알칼리 세린 프로테아제 ALCALASE ™ , SAVINASE™ , ESPERASE™ , 서브틸리신 Novo ( 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브로부터 구입가능), 및 KAZUSASE ™ (쇼와 덴코 (SHOWA DENKO) 로 부터 구입가능) 사이에서는 어떤 교차반응도 나타내지 않았다.

[세정제 조성물]

본발명에 따르면 프로테아제는 전형적으로 세정제 조성물의 한 성분으로서 첨가할수 있다. 그것은 세정제 첨가물의 형태로 세정제 조성물속에 포함될수 있다. 세정제 첨가물 뿐만 아니라 세정제 조성물은 부가적으로 리파제, 아밀라제, 셀룰라제, 옥시다제 또는 퍼옥시다제등의, 세정제에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 다른 효소들을 포함할수 있다.

본발명의 특이적인 면은 세정제 첨가물을 제공하는 것이다.

이 효소는 하나이상의 효소를 포함하는 별도의 첨가물들을 첨가함으로써, 또는 이들 효소 모두를 포함하는 하나의 조합된 첨가물을 첨가함으로써 세정제 조성물속에 포함될수 있다. 바람직하게는 세정제 첨가물, 즉 별도의 첨가물 또는 조합된 첨가물은 과립, 바람직하게는 비-살포성 과립, 액체, 특히 안정화된 액체, 슬러리의 형태로 또는 보호되는 형태로 제공된다. 분말없는 과립은 예컨대 미국특허 제4,106,991 호 및 제4,661,452 호( 모두 노보 노르디스크 아크티에셀스카브) 에서 개시된 대로 제조될수 있으며 당업계에서 공지된 방법에 의하여 선택적으로 피복될수 있다.

과립화 전 또는 과립화후 세정제효소를 혼합할수 있다.

액체효소제제는 예컨대 프로필렌글리콜 따위의 폴리알코올, 당 또는 당 알코올, 락트산 또는 붕산을 확립된 방법에 따라 첨가함으로써 안정화될 수 있다.

다른 효소 안정화제가 당업계에서 잘 공지되었다.

보호되는 효소는 유럽특허 제238,216A호에서 개시된 방법에 따라 제제화할수 있다.

본발명의 세정제 조성물은 어떤 편리한 형태, 가령 분말, 과립 또는 액체로서 존재할수 있다. 액체 세정제는 전형적으로는 90% 까지의 물과 0-20%의 유기용매를 포함하여 수성일수 있다.

세정제 조성물은 계면활성제를 포함하는데, 이것은 음이온성, 비-이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 이러한 유형들의 혼합물일수 있다.

세정제는 보통 선형 알킬벤젠술포네이트(LAS), 알파-올레핀 술포네이트(AOS), 알킬술페이트(AS), 알코올 에톡시술페이트(AES) 또는 지방산의 알칼리 금속염등과 같은 음이온성 계면활성제를 0-50% 포함할 것이다. 그것은 또한 노닐 페놀 에톡실레이트 또는 알코올 에톡실레이트등과 같은 비-이온성 계면활성제를 0-40% 포함할수 있다. 더욱, 그것은 폴리히드록시 지방산 아미드 계면활성제를 포함할 수 있다( 가력 WO 92/06154에 기재된것).

pH( 세정제 수용액에서 측정) 는 보통 중성 또는 알칼리성, 예컨대 7-11 일 것이다. 세정제는 제올라이트, 인산염, 포스포네이트, 스트르산염, NTA, EDTA 또는 DTPA, 알케닐 숙신산 무수물, 또는 규산염등의 세정제 연마제를 1-40% 포함할수 있으며, 또는 본질적으로 세정제 연마제를 포함하지 않을수 있다.

그것은 또한 다른 통상적인 세정제 성분, 가령 직물 연화제, 거품 부스터, 표백제, 예컨대 과붕산염, 과탄산염, 테트라아세틸에틸렌디아민(TAED), 또는 노나노일옥시벤젠 술포네이트(NOBS), 부식방지제, 얼룩-현탁제, 금속이온 봉쇄제, 얼룩 재침착 방지제, 효소( 들) 의 안정화제, 거품억제제, 염료, 살균제, 광증백제 또는 향료등을 포함할수 있다.

본발명의 범위내의 세정제 조성물의 특별한 형태에는 하기의 것들이 포함된다:

a) 인산염 연마제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 규산염, 사용시 원하는 pH로 조정하기위한 알칼리, 및 중성의 무기염류를 포함하는 세정제 분말로서 제제화된 세정제 조성물.

b) 제올라이트 연마제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 아크릴성 또는 등가의 중합체, 규산염, 사용시 원하는 pH로 조정하기 위한 알칼리, 및 중성의 무기염류를 포함하는 세정제 분말로서 제제화된 세정제 조성물.

c) 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 습윤제, 유기산, 가성 알칼리를 함유하고 사용시 pH가 7과 10.5 사이의 값으로 조정된 수성 세정액으로서 제제화된 세정제 조성물.

d) 본질적으로 선형 알콕실화 일차 알코올로 구성되는 액체 비이온성 계면활성제, 인산염 연마제, 가성 알칼리를 함유하고 사용시 pH가 약 7과 10.5 사이의 값으로 조정된 비수성 세정액으로서 제제화된 세정제 조성물.

e)음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제, 낮은 또는 실질적으로 제로인 중성의 무기염류, 인산염 연마제 및 규산 나트륨을 포함하며, 적어도 600g/ℓ의 부피밀도를 갖는 과립형태의 세정제 분말로서 제제화된 세정제 조성물.

f) 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제, 낮은 또는 실질적으로 제로인 중성의 무기염류, 제올라이트 연마제, 및 규산 나트륨을 포함하며, 적어도 600g/ℓ의 부피밀도를 갖는 과립형태의 세정제 분말로서 제제화된 세정제 조성물.

g) 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 아크릴성 중합체, 지방산의 알칼리금속염, 탄산나트륨, 황산나트륨, 점토입자, 및 규산나트륨을 포함하는 세정제 분말로서 제제화된 세정제 조성물.

h) 5-65중량%의 계면활성제, 0-50중량% 의 연마제 및 0-30 중량% 의 전해질로 이루어지는 액체콤팩트 세정제.

본발명의 세정제 조성물에서 [? 프로테아제] 는 세척액 리터당 효소 [? 0.001-100]㎎에 해당하는 양만큼 첨가할수 있다고 현재 생각된다.

본발명은 하기의 실시예에서 더욱 기술되는데, 이것은 어떤식으로든 본발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[실시예 1]

Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338 을 하기의 조성( 리터당) 을 갖는 배지 100 ㎖ 을 포함하는 500 ㎖ 배플 에를렌마이어 플라스크에서 회전식 진동테이블(300 r.p.m.)상에서 25℃로 배양하였다:

포테이토 전분 100g

가루로 만든 보리 50g

콩가루 20g

Na2HPO4 x 12H2O 9g

Pluronic ? 0.1g

카세인산 나트륨 10g

배지내의 전분을 - 아밀라제로 액화시키고, 배지를 120℃에서 45 분간 가열하여 멸균시켰다.

멸균후에 중찬산나트륨 1M 용액 10㎖ 을 첨가하여 배지의 pH 를 9.0으로 조정하였다. 4 일간의 배양후에 배양물의 단백질분해활성을 상기에서 기술한 방법을 이용하여 결정하였다.

배양후, 배양즙의 효소활성은 20 CPU/ℓ 였다.

고체물질의 분리후에 프로테아제를 통상적인 크로마토그래피 방법에 의하여 정제하였다.

1ℓ의 배양즙으로 부터의 수율은 100 CPU/ ℓ를 갖는 50㎖이었다. 순도는 SDS-PAGE 에 의하여 판단했을때 90% 이상이었다.

본 실시예에 따랄 제조한 제제의 특성은 명세서에서 이전에 언급되었으며, 여기에서 참조된다.

[실시예 2] 세척성능

세척성능시험을 풀얼룩진 면직물상에서 10 분동안 등온적으로 40 ℃에서 수행하였다. 시험은 리터당 효소단백질 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 ㎎ 의 효소농도에서 수행하였다.

상업적인 유럽형 콤팩트 분말세정제 5.0g/ℓ를 이용하였다.

세정제는 대략 9 ° dH(German Hardness) 물에 녹였고, pH는 11 로 조정하였다. 직물/ 세척액 비율은 세척액 리터당 직물 6g 이었다.

세척한 다음 직물을 흐르는 수도물에서 헹구고 공기건조시켰다.

460 nm에서 재방출(remission)(% R)을 결정하였다.

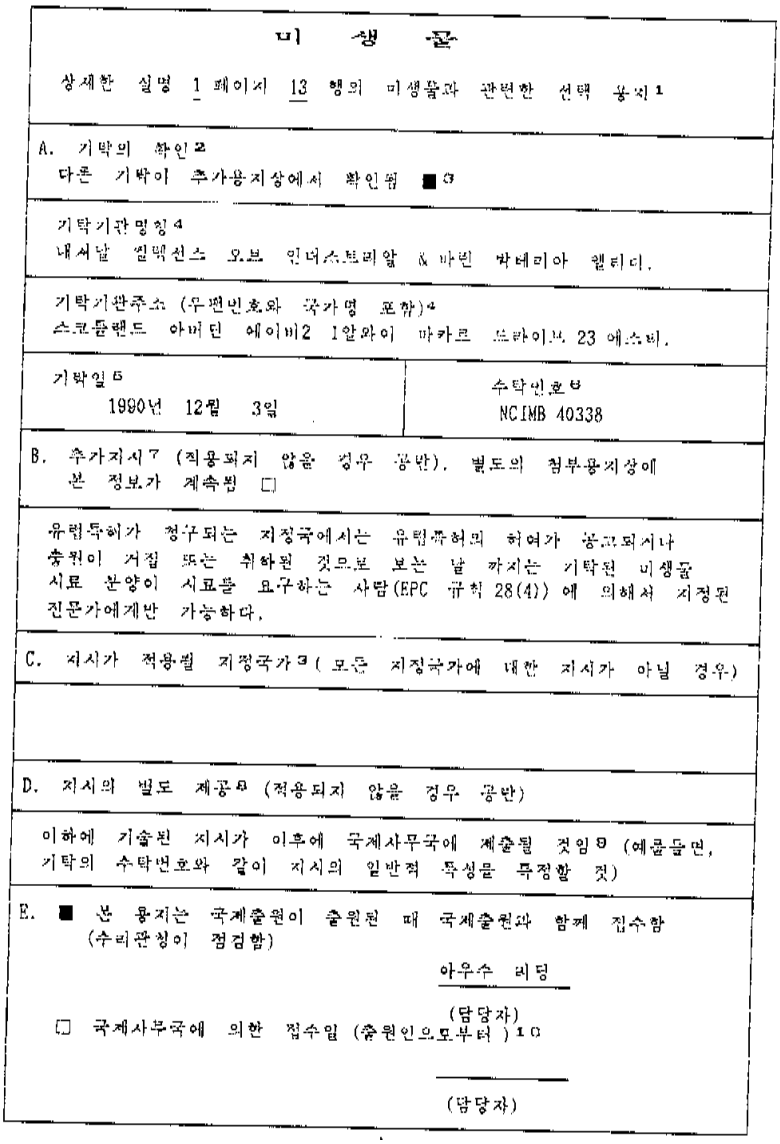
세척성능의 척도로서 차별적 재방출( △R)을 이용하였는데, 이것은 효소 첨가 있는 세척후의 재방출 - 효소첨가없는 세척후의 재방출과 같다.

이 시험의 결과는 하기의 표1 에 나타냈다( 두 시험의 평균).

| 효소농도(㎎ 효소단백질/ 리터) | 델타 R | |
|---|---|---|
| | PD138 | SAVINASE™ |
| 0.01 | 5.7 | 3.2 |
| 0.025 | 13.5 | - |
| 0.05 | 19.4 | 8.1 |
| 0.10 | 22.0 | 14.8 |
| 0.50 | 22.6 | 22.0 |
| 1.0 | - | 22.2 |

( - 측정하지 않음)

차별적 재방출값은 본발명의 프로테아제가 높은 이온세기와 높은 pH 를 갖는 세정제에서 특별한 가능성을 가져서 양호한 세척력을 나타낸다는 것을 보여준다.



미 생 물

상세한 설명 1 페이지 13 행의 미생물과 관련한 선택 용지[1]

A. 기탁의 확인[2]
다른 기탁이 추가용지상에서 확인됨 ■[3]

기탁기관명칭[4]
내셔날 컬렉션스 오브 인더스트리얼 & 마린 박테리아 랠티디.

기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함)[4]
스코틀랜드 아버딘 에이비2 1알와이 마카르 드라이브 23 에스비.

기탁일[5]
1990년 12월 3일

수탁번호[6]
NCIMB 40338

B. 추가지시[7] (적용되지 않을 경우 공란). 별도의 첨부용지상에 본 정보가 계속됨 □

유럽특허가 청구되는 지정국에서는 유럽특허의 허여가 공고되거나 출원이 거절 또는 취하된 것으로 보는 날 까지는 기탁된 미생물 시료 분양이 시료를 요구하는 사람(EPC 규칙 28(4)) 에 의해서 지정된 전문가에게만 가능하다.

C. 지시가 적용될 지정국가[8] (모든 지정국가에 대한 지시가 아닐 경우)

D. 지시의 별도 제공[9] (적용되지 않을 경우 공란)

이하에 기술된 지시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임[9] (예를들면, 기탁의 수탁번호와 같이 지시의 일반적 특성을 특정할 것)

E. ■ 본 용지는 국제출원이 출원된 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)

아우수 리딩
(담당자)

□ 국제사무국에 의한 접수일 (출원인으로부터 )[10]

(담당자)

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1.

균주 Bacillus sp. PD138을 배양하여 얻는, 하기의 성질을 가지는 프로테아제:

(a) 28kD의 겉보기 분자량,

(b) 9.5이상의 pI,

(c) pH 10이상의 최적 pH (25 ℃에서 그리고 기질은 카세인),

(d) 45 내지 55 ℃의 범위에서 최적온도(pH 9.5에서 그리고 기질은 카세인).

### 청구항 2.

제1항에 있어서, 균주는 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338인 것을 특징으로 하는 프로테아제.

청구항 3.

균주 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338.

청구항 4.

제1항에 따른 프로테아제의 제조방법으로서, 상기 방법은 탄소와 질소공급원 및 무기염류를 포함하는 적당한 영양배지에서 균주 Bacillus sp. PD138 을 배양하고, 그 다음 원하는 효소를 회수하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제4항에 있어서, 균주는 Bacillus sp. PD138, NCIMB 40338인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제1항에 따른 프로테아제를 포함하는 세정제 조성물.

청구항 7.

제6항에 있어서, 하나 이상의 다른 효소, 특히 아밀라제, 리파제, 셀룰라제, 퍼옥시다제, 및 옥시다제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 8.

비-살포성 과립, 액체, 특히 안정화된 액체, 슬러리, 또는 보호된 효소의 형태로 제공되는, 제1항에 따른 프로테아제를 포함하는 세정제 첨가물.

청구항 9.

제1항에 따른 프로테아제의 첨가를 포함하는 세척방법.

청구항 10.

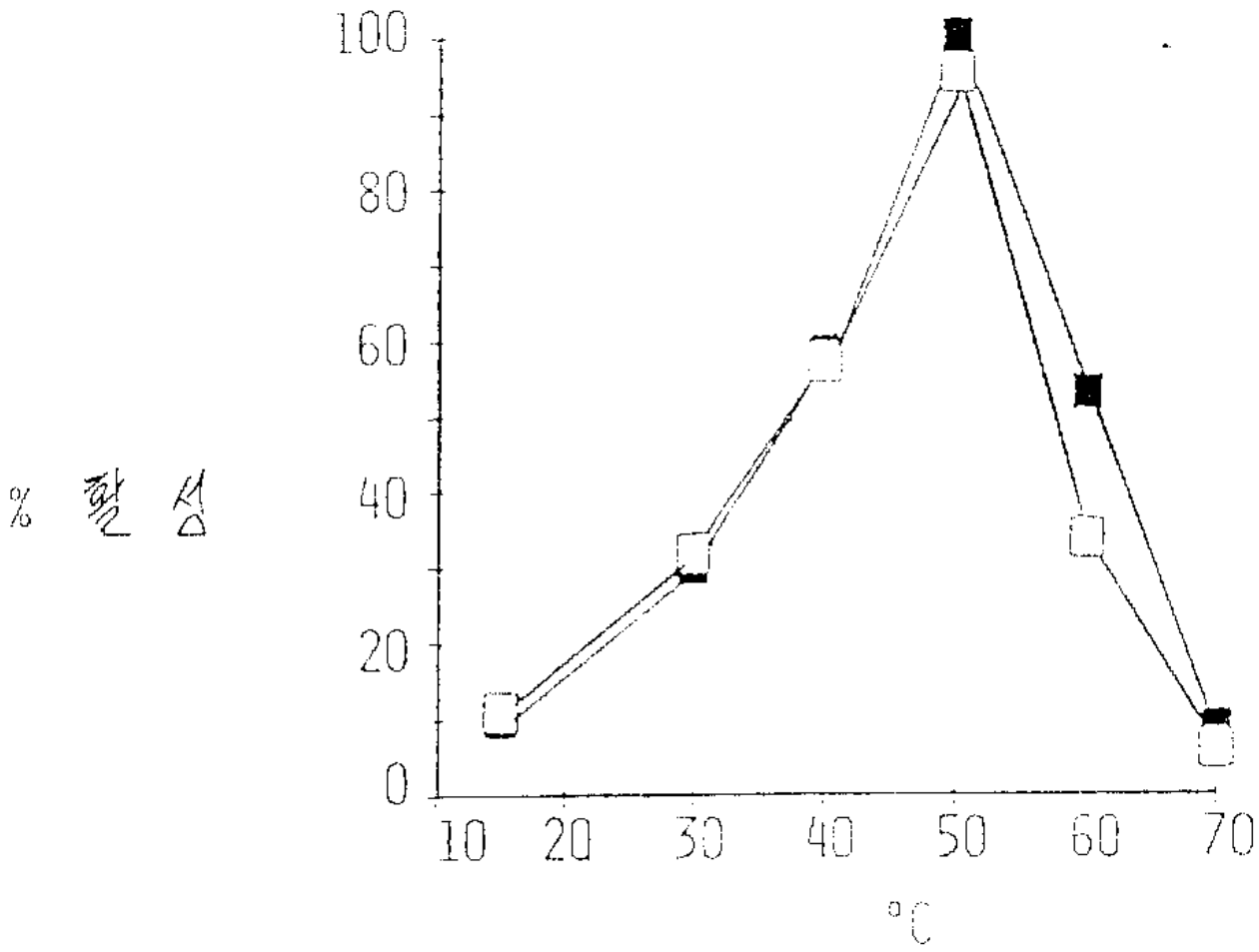
제9항에 있어서, 제6항 또는 제7항에 따른 세정제 조성물의 첨가를 포함하는 세척방법.

청구항 11.

제9항에 있어서, 제8항에 따른 세정제 첨가물의 첨가를 포함하는 세척방법.

## 도면

### 도면 1



도면 2

