

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C12N 9/54

(11) 공개번호 특2001-0023453
(43) 공개일자 2001년03월26일

(21) 출원번호 10-2000-7002096
(22) 출원일자 2000년02월28일
 번역문제출일자 2000년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/DK1998/00359 (87) 국제공개번호 W0 1999/11768
(86) 국제출원출원일자 1998년08월19일 (87) 국제공개일자 1999년03월11일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드
 우간다 짐바브웨
EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐
 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스
 페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모
 나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카
 메룬 가봉 기네 기네비소 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고
국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바
 이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스
 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀
 란드 영국 그루지야 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이
 스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄
 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라
 트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨
 이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르
 르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터
 어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남
 유고슬라비아 짐바브웨

(30) 우선권주장 0986/97 1997년08월29일 덴마크(DK)
(71) 출원인 노보 노르디스크 에이/에스 한센 핀 베네드, 안네 제헤르, 웨이콕 마리
 안느
(72) 발명자 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레
 한젠 페테르 캄프
 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보 노르디스 크 에이/에스
 내
 바우디츠 페테르
 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보 노르디스 크 에이/에스
 내
 미켈젠 프랑크
 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보 노르디스 크 에이/에스
 내
 안데르젠 킴 빌보우르
(74) 대리인 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보 노르디스 크 에이/에스
 내
 장용식

심사청구 : 없음

(54) 프로테아제 변이체 및 조성물

요약

많은 서브틸라아제를 위한 유전자를 돌연변이시키고 적당한 숙주내에서 돌연변이 유전자를 발현하여 생
성된 효소가 소개된다. 효소는 그 야생형 어버이 효소에 비해 모든 세제에서 개선된 세탁 성능을 나타낸
다.

색인어

프로테아제, 서브틸라아제, 세제조성물

명세서

기술분야

본 발명은 세제 조성물의 제조에 유용하고 세제에서 개선된 세탁 성능을 나타내는 신규한 돌연변이 프로테아제 효소 또는 효소 변이체; 상기 효소를 함유하는 세탁용 및 세제 조성물; 적당한 숙주 세포 또는 미생물내로 삽입될 때 상기 효소의 발현을 위한 돌연변이 유전자 코딩; 및 그와 함께 변형되고 상기 효소 변이체를 발현할 수 있는 숙주 세포에 관한 것이다.

배경기술

세제 산업에서 효소는 30 년 이상 동안 세탁용 제형에 사용되어 왔다. 그러한 제형에 사용된 효소는 프로테아제, 리파아제, 아밀라아제, 셀룰라아제뿐만 아니라 다른 효소, 또는 그 혼합물을 포함한다. 상업적으로 가장 중요한 효소는 프로테아제이다.

증가한 많은 상업적으로 사용되는 프로테아제는 자연 발생 야생형 프로테아제의 단백질 처리된 변이체, 예컨대 DURAZYM[®] (Novo Nordisk A/S), RELEASE[®] (Novo Nordisk A/S), MAXAPEM[®] (Gist-Brocades N.V.), PURAFECT[®] (Genencor International, Inc.)이다.

또한 EP 130756 (GENENTECH)(미국 발행 특허 제 34,606 호(GENENCOR)에 대응하는); EP 214435 (HENKEL); WO 87/04461 (AMGEN); WO 87/05050(GENEX); EP 260105(GENENCOR); Thomas, Russell, and Fersht (1985) Nature 318 375-376; Thomas, Russell, and Fersht (1987) J. Mol. Biol. 193 803-813; Russel and Fersht Nature 328 496-500 (1987); WO 88/08028 (Genex); WO 88/08033 (Amgen); WO 95/27049 (SOLVAY S.A.); WO 95/30011 (PROCTER & GAMBLE COMPANY); WO 95/30010 (PROCTER & GAMBLE COMPANY); WO 95/29979 (PROCTER & GAMBLE COMPANY); US 5.543.302 (SOLVAY S.A.); EP 251 446 (GENENCOR); WO 89/06279 (NOVO NORDISK A/S); WO 91/00345 (NOVO NORDISK A/S); EP 525 610 A1 (SOLVAY); WO 94/02618 (GIST-BROCADES N.V.); 및 WO 96/34946 (NOVO NORDISK A/S) 등의 많은 프로테아제 변이체가 당해 분야에 기술된다.

그러나, 많은 유용한 프로테아제 변이체가 기술되지만, 많은 산업적 사용을 위한 신규의 개선된 프로테아제 변이체에 대한 요구가 여전히 존재한다.

따라서, 본 발명의 목적은 특히 세제 산업에서 사용을 위한 개선된 단백질 처리된 프로테아제 변이체를 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 개요

본 발명의 발명자는 SAVINASE[®]의 N252, T255 및 S259 잔기의 많은 가능한 조합들을 집중적으로 연구하여, 세탁 성능이 개선되고 증가한 많은 변이체를 확인하였다.

더 자세한 사항에 대해 여기의 실시예를 참고하라(아래를 보라).

따라서, 본 발명은 제 1 측면으로 252, 255 및/또는 259 번 위치에서 변형을 포함하는, 세제에서 세척 성능이 개선된 서브틸라아제 프로테아제에 관한 것이다.

본 발명에 따른 서브틸라아제 변이체는 바람직하게 252 및 255 번 위치에서 변형을 포함하고, 더욱 바람직하게는 252, 255, 및 259 번의 모두 세 위치에서의 변형을 포함한다.

제 2 측면에서 본 발명은 세제에서 세탁 성능이 개선된,

252L+255I

252V+255A

252M+255C+259H

252S+255E+259C

252K+255S+259C

를 포함하는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하는 서브틸라아제 효소 변이체; 또는 상기 변이체 중 어느 하나에서 하나 이상의 보존적 변형을 포함하는 변이체(예컨대 252L(소수성 아미노산)+255I 변이체의 보존적 변형은 252I(소수성 아미노산)+255I, 및 252V(소수성 아미노산)+255I 등의 변이체를 포함함)에 관한 것이다.

제 3 측면에서 본 발명은 본 발명의 서브틸라아제 변이체를 암호화하는 분리된 DNA 서열에 관한 것이다.

제 4 측면에서 본 발명은 본 발명의 서브틸라아제 변이체를 암호화하는 분리된 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.

제 5 측면에서 본 발명은 제 4 측면에 따른 발현 벡터로 형질변환된 미생물 숙주 세포에 관한 것이다.

다른 측면에서 본 발명은 적당한 미생물 숙주내로 제 4 측면에 따른 발현 벡터를 삽입하고, 숙주를 배양하여 원하는 서브틸라아제 효소를 발현하고, 효소 생성물을 회수하는 본 발명의 서브틸리신 효소의 생산에 관한 것이다.

또한 본 발명은 본 발명의 서브틸라아제 변이체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

끝으로 본 발명은 많은 산업적으로 적절한 사용을 위한 돌연변이 효소, 특히 세탁용 조성물 및 돌연변이 효소를 포함하는 세탁용 조성물, 구체적으로 돌연변이 서브틸리신 효소를 포함하는 세제 조성물에서의 사용을 위한 돌연변이 효소의 사용법에 관한 것이다.

정의

본 발명의 더욱 상세한 검토에 앞서, 다음의 용어가 먼저 정의될 것이다.

아미노산의 명명

- A = Ala = 알라닌(Alanine)
- V = Val = 발린(Valine)
- L = Leu = 류신(Leucine)
- I = Ile = 이소류신(Isoleucine)
- P = Pro = 프롤린(Proline)
- F = Phe = 페닐알라닌(Phenylalanine)
- W = Trp = 트립토판(Tryptophan)
- M = Met = 메티오닌(Methionine)
- G = Gly = 글리신(Glycine)
- S = Ser = 세린(Serine)
- T = Thr = 트레오닌(Threonine)
- C = Cys = 시스테인(Cysteine)
- Y = Tyr = 티로신(Tyrosine)
- N = Asn = 아스파라긴(Asparagine)
- Q = Gln = 글루타민(Glutamine)
- D = Asp = 아스파르트산(Asparatic Acid)
- E = Glu = 글루탐산(Glutamic Acid)
- K = Lys = 리신(Lysine)
- R = Arg = 아르기닌(Arginine)
- H = His = 히스티딘(Histidine)
- X = Xaa = 임의의 아미노산(Any amino acid)

핵산의 명명

- A = 아데닌(Adenine)
- G = 구아닌(Guanine)
- C = 시토신(Cytosine)
- T = 티민(Thymine)(DNA에서만)
- U = 우라실(Uracil)(RNA에서만)

변이체의 명명

본 발명에 따라 제조되거나 계획된 여러 효소 변이체를 기술함에 있어, 다음 명명법이 용이한 참고를 위해 채택되었다.

원 아미노산/위치/치환 아미노산

이에 따라 195번 위치에서의 글리신의 글루탐산으로의 치환은:

Gly 195 Glu 또는 G195E

동일 위치에서 글리신의 결실은:

Gly 195 * 또는 G 195 *

그리고 리신 등의 부가적인 아미노산 잔기의 삽입은:

Gly 195 GlyLys 또는 G195GK

과 같이 표시되고

번호를 위해 사용된 서열과 비교하여 결실이 표시되는 경우에, 그러한 위치에서 삽입은 36 번 위치에서 아스파르트산의 삽입의 경우

* 36 Asp 또는 * 36 D

와 같이 표시된다

다중 돌연변이는 플러스 기호에 의해 분리되어

즉, Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu 또는 R170Y+G195E

는 170번 및 195번 위치에서 아르기닌 및 글리신을 각각 티로신 및 글루탐산으로 치환한 돌연변이를 나타낸다.

프로테아제

단백질 기질에서의 아미드 결합을 분열시키는 효소는 프로테아제, 또는 (대체적인) 펩티다아제이다(참조: Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Chapter 3).

아미노산 위치/잔기의 번호링

다른 언급이 없으면 여기에 사용된 아미노산 번호링은 서브틸라아제 BPN'(BASBPN) 서열과 대응한다. BPN' 서열의 다른 기술에 대하여 Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 및 도 1을 참조하라.

세린 프로테아제

세린 프로테아제는 펩티드 결합의 가수분해에 촉매 작용을 하고, 활성 부위에 필수인 세린 잔기가 있는 효소이다(White, Handler and Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271-272).

박테리아 세린 프로테아제는 20,000 내지 45,000 달톤 범위의 분자량을 갖는다. 그들은 디소프로필플루오로포스페이트에 의해 억제된다. 그들은 단일 중결 에스테르를 가수분해하고 활동에 있어 진핵세포의 키모트립신, 또한 세린 프로테아제와 유사하다. 더욱 한정된 용어, 하위 군을 포함하는 알칼리성 프로테아제는, 어떤 세린 프로테아제의 pH 9.0 내지 11.0의 높은 pH 최적조건을 반영한다(검토를 위한 참조: Priest (1977) Bacteriological Rev. 41 711-753).

서브틸라아제

시험적으로 서브틸라아제를 표시하는 세린 프로테아제의 하위 군이 Siezen et al.,(Protein Engng. 4 (1991) 719-737)에 의해 제안되어 왔다. 이것은 이전에 서브틸리신류 프로테아제로서 언급된 세린 프로테아제의 40 아미노산 이상의 서열의 상동관계 분석에 의해 정의된다. 서브틸리신은 이전에 그램양성 박테리아 또는 균류에 의해 생성된 세린 프로테아제로서 정의되고, Siezen et al., 에 따라 현재는 서브틸라아제의 하위군이다. 광범한 여러 서브틸라아제가 확인되었고, 많은 서브틸라아제의 아미노산 서열이 결정되었다. 그러한 서브틸라아제 및 그 아미노산 서열의 더욱 상세한 설명을 위해 Siezen et al., 및 그 안의 도 1을 참고하라.

서브틸라아제의 한 하위군, I-S1은 서브틸리신 168, 서브틸리신 BPN', 서브틸리신 칼스버그(ALCALASE[®], NOVO NORDISK A/S) 및 서브틸리신 DY 등의 "전형적" 서브틸리신을 포함한다.

서브틸라아제 I-S2의 다른 하위 군이 Siezen et al. (위와 같음)에 의해 인식된다. 하위 군 I-S2 프로테아제는 고알칼리성 서브틸리신으로 기술되고 서브틸리신 PB92 (MAXACAL[®], Gist-Brocades NV), 서브틸리신 309 (SAVINASE[®], NOVO NORDISK A/S), 서브틸리신 147 (ESPERASE[®], NOVO NORDISK A/S), 및 알칼리성 에라스타아제 YaB 등의 효소를 포함한다.

"SAVINASE[®]"

SAVINASE[®]는 NOVO NORDISK A/S에 의해 시판된다.

그것은 B. Lentus로부터의 서브틸리신 309이고 N87S를 갖는 점에서만 BABP92와 다르다(본 명세서의 도 1을 참조).

어버이 서브틸라아제

용어 "어버이 서브틸라아제"는 Siezen et al.(Protein Engineering 4:719-737 (1991))에 따라 정의되는 서브틸라아제이다. 더욱 상세한 것은 바로 위의 "서브틸라아제"의 설명을 참조하라. 어버이 서브틸라아제는 또한 자연 공급원으로부터 분리된 서브틸라아제일 수 있으며, 여기에 서브틸라아제의 특성을 보유하면서 후속의 변형이 가해졌다.

다르게는 용어 "어버이 서브틸라아제"는 "야생형 서브틸라아제"로 부를 수 있다.

서브틸라아제 변이체의 변형

여기서 검토되는 서브틸라아제 변이체의 변형과 관련하여 사용되는 용어 "변형"은 화학적 변형뿐만 아니라 유전적 조작을 포함하도록 정의된다. 변형은 관심의 아미노산 내 또는 에서의 치환, 결실 및/또는 삽입에 의할 수 있다.

서브틸라아제 변이체

본 발명의 배경에서, 용어 서브틸라아제 변이체 또는 돌연변이 서브틸라아제는 원래의 또는 어버이 유전자를 소유하고 대응하는 어버이 효소를 생성하는 어버이 미생물로부터 유도되는 돌연변이 유전자를 발현하는 생물에 의해 생성되는 서브틸라아제를 의미하며, 어버이 유전자는 돌연변이되어 적당한 숙주내에서 발현될 때 상기 돌연변이 서브틸라아제 프로테아제가 생성되는 돌연변이 유전자를 생성한다.

상동의 서브틸라아제 서열

SAVINASE[®] 서브틸라아제의 특유의 아미노산 잔기가 본 발명의 서브틸라아제 변이체를 얻는 여기의 변형을 위해 확인되었다.

하지만, 본 발명은 이 특정 서브틸라아제의 변형에 제한되지 않고, SAVINASE[®]와 상동의 주요 구조를 갖는 다른 어버이(야생형) 서브틸라아제까지 확장된다.

본 발명의 영역내의 다른 상동의 서브틸라아제를 확인하기 위하여, 이전에 배열된 서브틸라아제의 군에 대한 상기 서브틸라아제의 배열이 이전의 배열을 유지하면서 실행되었다. 서브틸라아제에서 18개의 고도로 보존된 잔기에 대한 비교를 실시하였다. 18개의 고도로 보존된 잔기를 표 1에 나타낸다(상기 보존적 잔기와 관련한 보다 상세한 것은 Siezen et al.을 참조하라).

[표 1]

서브틸라아제 중 18 개의 고도로 보존된 잔기

위치	보존 잔기
23	G
32	D
34	G
39	H
64	H
65	G
66	T
70	G
83	G
125	S
127	G
146	G
154	G
155	N
219	G
220	T
221	S
225	P

배열을 유지하기 위해 필요한 삽입 및 결실을 위한 배열을 한 후 적당한 상동의 잔기가 확인되었다. 상기 상동의 잔기는 그 다음 본 발명에 따라 변형될 수 있다.

10.0의 GAP 개방 페널티와 0.1의 GAP 확장 페널티와 함께, CLUSTALW (버전 1.5, April 1995) 컴퓨터 배열 프로그램 (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680)을 사용하여, BLOSUM30 단백질 중량 매트릭스를 사용하여, 미리 배열된 서브틸라아제의 군에 대해 주어진 서브틸라아제의 배열은 본 프로그램의 Profile alignments 옵션을 사용하여 이루어졌다. 주어진 서브틸라아제가 본 발명의 영역내이도록 하기 위해, 바람직하게는 18개의 고도로 보존된 잔기의 100%가 보존되어야 한다. 그러나, 18개의 잔기 중 17개 이상의 배열, 또는 16개만큼 작은 상기 보존적 잔기 또한 상동의 잔기를 확인하는 데 적당하다. 서브틸라아제 중에, 촉매성 트리아드 Asp32/His64/Ser221의 보존이 유지되어야 한다.

미리 정의된 배열이 도 1에 도시되며, 18개의 고도로보존된 잔기에 대한 본 배열에서 개별 서브틸라아제의 동정 백분율이 또한 도시된다.

본 기재에 기초하여, 당업자가 본 발명에 따라 변형될 수 있는, 적당한 상동의 서브틸라아제 및 대응하는 상동의 잔기를 확인하는 것은 일상적인 것이다. 이를 예증하기 위해 이하의 표 2는 본 발명에 따라 변형되는 상동의 서브틸라아제 및 대응하는 적당한 잔기의 제한된 목록을 도시한다.

[표 2]

본 발명에 따라 변형되기에 적당한, 상동의 서브틸라아제 및 대응하는 상동의 잔기

위치 \ 효소	BASBPN	BYSYAB	BLS309	BLS147	TVTHER
252+255	N252L+T255I	N252L+T255I	N252L+T255I	Q252L+T255I	N252L+D255I
252+255	N252V+T255A	N252V+T255A	N252V+T255A	Q252V+T255A	N252V+D255A
252+255+259	N252M+T255C+D259H	N252M+T255C+N259H	N252M+T255C+S259H	Q252M+T255C+S259H	N252M+D255C+G259H

다른 상동의 서브틸라아제를 포함하는 유사한 또는 보다 큰 표가 용이하게 당업자에 의해 작성될 수 있음은 명백하다.

세탁 성능

예컨대 세탁중에 청소될 목적물에 존재하는 여러 자연 발생 기질의 분해를 촉매하는 효소의 능력은 종종 세탁 능력, 세탁 가능성, 세척성 또는 세탁성능으로 불린다.

본 출원에 걸쳐 용어 세탁 성능은 이 특성을 망라하여 사용될 것이다.

분리된 DNA 서열

용어 "분리된"은, DNA 서열 분자에 적용될 때, DNA 서열이 그 자연적 유전 환경으로부터 제거되므로써 다른 관계없는 또는 원하지 않는 코딩 서열이 없으며, 유전공학적 단백질 생산 방식에 사용에 적당한 형태에 있는 것을 의미한다. 그러한 분리된 분자는 그 자연환경으로부터 분리되고, DNA 및 게놈 클론을 포함하는 것이다. 본 발명의 분리된 DNA 분자는 대개 관련된 다른 유전자가 없으나, 프로모터 및 종결암호 등의 자연적으로 발생하는 5' 및 3' 미번역 영역을 포함할 수 있다. 관련 영역의 확인은 당업자 중 어느 누구에도 명백해질 것이다(예컨대 참조, Dynan and Tijan, Nature 316:774-78, 1985). 용어 " 분리된 DNA 서열"은 다르게는 "클론 DNA 서열"로 불릴 수 있다.

분리된 단백질

단백질에 적용될 때, 용어 "분리된"은 단백질이 그 자연환경과는 다른 상태에서 발견됨을 나타낸다. 바람직한 형태에서, 분리된 단백질은 본질적으로 다른 단백질, 특히 다른 상동의 단백질(즉, "상동의 불순물"(이하 참조))이 없다. SDS-PAGE에 의해 결정되는, 고도로 정제된 형태의, 즉 40%이상으로 순수한, 60%이상으로 순수한, 80%이상으로 순수한, 더욱 바람직하게는 95%이상으로 순수한, 그리고 훨씬 더욱 바람직하게는 99%이상으로 순수한 단백질을 제공함이 바람직하다. 용어 "분리된 단백질"은 다르게는 "정제된 단백질"로 불릴 수 있다.

상동의 불순물

용어 "상동의 불순물"은 본 발명의 폴리펩티드가 원래 얻어진 상동의 세포로부터 비롯된 모든 불순물(예컨대 본 발명의 폴리펩티드 이외의 다른 폴리펩티드)를 의미한다.

로부터 얻어진

특정 미생물 공급원과 관련하여 여기에 사용된 용어 "로부터 얻어진"은 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드가 특정 공급원, 또는 공급원으로부터 유전자가 삽입된 세포에 의해 생성된 것을 의미한다.

기질

프로테아제용 기질과 관련하여 사용되는 용어 "기질"은 서브틸리신 프로테아제에 의한 가수분해에 민감한 적어도 하나의 펩티드 결합을 함유하는 화합물을 포함하는 가장 광범한 형태로 해석되어야 한다.

생성물

프로테아제 효소 반응으로부터 유도되는 생성물과 관련하여 사용되는 용어 "생성물"은 본 발명의 배경에서 서브틸라아제 프로테아제를 포함한 가수분해 반응의 생성물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 생성물을 후속의 가수분해 반응에서의 기질일 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 서브틸라아제내의 18개의 고도로 보존된 잔기에 대해 배열되는 많은 상동의 서브틸라아제의 배열을 도시한다. 18개의 고도로 보존된 잔기는 볼드체로 강조된다. JP170을 제외한, 모든 도시된 서브틸라아제는 상기 보존 잔기에서 100% 동정된다. JP170은 보존 잔기 G146에서 "G" 대신에 "N"을 가진다.

본 발명의 상세한 설명

개선된 세탁 성능을 갖는 서브틸라아제 변이체:

본 발명자는 BLS309(SAVINASE[®])에서 개선된 세탁 성능의 변이체를 확인하였다.

따라서, 본 발명의 구체예는 변형이

N252L+T255I

N252V+T255A
 N252M+T255C+S259H
 N252S+T255E+S259C
 N252K+T255S+S259C

을 포함하는 군으로부터 선택되는 서브틸라아제 효소 변이체 또는

상기 변이체중 어느 하나에서 하나 이상의 보존적 변형을 포함하는 변이체 (예컨대, N252L(소수성 아미노산)+T255I 변이체의 보존적 변형은 N252I(소수성 아미노산)+T255I, 및 N252V(소수성 아미노산)+T255I 등의 변이체를 포함함)에 관한 것이다.

본 발명의 많은 서브틸라아제 변이체가 여기에서 시험되며 세제에 있어 개선된 세탁 성능을 보인다(본 명세서의 구체예를 참조(이하 참조)).

유사한 보존적 아미노산에 대한 하나의 아미노산의 치환은 단지 효소의 특성에 있어 작은 변화를 가져올 뿐이라는 것이 당해 분야에 잘 알려진다.

이하의 표 3은 보존적 아미노산의 군을 수록한다.

[표 3]

보존적 아미노산 치환

염기성	아르기닌 리신 히스티딘
산성	글루탐산 아스파르트산
극성	글루타민 아스파라긴
소수성	류신 이소류신 발린
방향성	페닐알라닌 트립토판 티로신
소분자	글리신 알라닌 세린 트레오닌 메티오닌

따라서, 252L+255I, 252I+255I 및 252V+255I 등의 서브틸라아제 변이체는 유사하게 세탁 성능이 개선될 것이다. 또한, N252L+T255I, N252I+T255I 및 N252V+T255I 등의 서브틸라아제 변이체 역시 유사하게 세탁 성능이 개선될 것이다.

여기서 개시되는 서브틸라아제 변이체에 기초하여, 당업자가 개선된 세탁성능을 갖는 서브틸라아제 변이체를 얻기 위한 적당한 보존적 치환을 더 확인하는 것은 일상적인 작업이다.

본 발명의 구체예에서, 관심의 서브틸라아제는 I-S1 및 I-S2의 하위군에 속하는 것들이다.

하위군 I-S1과 관련하여 바람직한 어버이 서브틸라아제는 ABSS168, BASBPN, BSSDY, 및 BLSCAR 또는 하위군 I-S1의 특성을 보유하는 그것의 기능적 변이체를 포함하는 군으로부터 선택된다.

하위군 I-S2과 관련하여 바람직한 어버이 서브틸라아제는 BLS147, BLS309, BAPB92, 및 TVTHER 및 BYSYAB 또는 하위군 I-S2의 특성을 보유하는 그것의 기능적 변이체를 포함하는 군으로부터 선택된다.

본 발명은 또한 어버이 효소의 아미노산 서열에 대한 다른 어떤 변형과 조합하여 상기 위치에서 어떤 하나 이상의 변형을 포함한다. 특히 효소에 개선된 특성을 제공하는 당해분야에 알려진 다른 변형과의 조합이 고찰된다. 당해 기술은 다른 개선된 특성을 갖는 많은 서브틸라아제 변이체를 기술하며 많은 것들이 여기의 "본 발명의 배경"에서 언급된다(상기 참조). 그러한 참고가 여기에 서브틸라아제 변이체를 동정하기 위한 기준으로서 개시되어, 본 발명의 서브틸라아제 변이체와 유리하게 조합될 수 있다.

그러한 조합은 위치:222(산화 안정성을 개선), 218(열적 안정성을 개선), 효소를 안정화하는 Ca-결합 부위, 예컨대 위치 76에서의 치환 및 종래 기술로부터 명백한 많은 다른 것들을 포함한다.

다른 구체예에서 본 발명의 서브틸라아제 변이체는 위치:

27, 36, 57, 76, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 206, 218, 222, 224, 235 및 274 중 어느 하나에서 하나 이상의 변형과 조합될 수 있다.

구체적으로 다음의 BLS309 및 BAPB92 변이체는 조합:

K27R, *36D, S57P, N76D, G97N, S101G, V104A, V104N, V104Y, H120D, N123S, Y167A, Y167I, R170S, R170L, R170N, Q206E, N218S, M222S, M222A, T224S, K235L 및 T274A에 적당한 것으로 여겨진다.

또한 변이체 V104N+S101G, K27R+V104Y+N123S+T274A, 또는 N76D+V104A 또는 이들 돌연변이체(V104N, S101G, K27R, V104Y, N123S, T274A, N76D, V104A)의 다른 조합 중 어느 하나를 포함하는 변이체는, 상기 변형의 어느 하나 이상과 조합하여, 개선된 특성을 나타낸다.

또 다른 본 발명의 주요 측면의 서브틸라아제 변이체는 바람직하게 129, 131, 133 및 194번 위치 중 어느 하나에서 하나 이상의 변형과, 바람직하게는 129K, 131H, 133P, 133D 및 194P 변형으로서, 그리고 가장 바람직하게는 P129K, P131H, A133P, A133D 및 A194P 변형으로서 조합된다. 그 변형 중 어느 하나는

본 발명의 서브틸라아제 변이체의 더 높은 발현 수준을 부여할 수 있다.

서브틸라아제 유전자에서의 돌연변이 유발

본 발명의 서브틸라아제를 클로닝하고 유전자(예컨대, 서브틸라아제 유전자)내로 돌연변이체를 도입하는 많은 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

일반적으로 유전자의 클로닝 및 상기 유전자내로 돌연변이체를 도입(무작위 및/또는 부위 지정)하는 표준 방법이 본 발명의 서브틸라아제 변이체를 얻기 위해 사용될 수 있다. 적당한 기술에 대한 다른 기재에 대해 실시예 및 Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY; Ausbel, F. M. et al. (eds) "*Current protocols in Molecular Biology*". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) "*Molecular Biological Methods for Bacillus*". John Wiley and Sons, 1990); and WO 96/34946을 참고하라.

발현 벡터

본 발명의 효소를 암호화한 DNA 구조물을 포함하는 재조합 발현 벡터는 재조합 DNA 방법에 편리하게 적용될 수 있고, 벡터의 선택은 종종 도입되는 숙주 세포에 의존할 것이다. 따라서, 벡터는 자발적 복제 벡터, 즉 벡터가 염색체외 물체로서 존재하고 벡터로, 복제가 염색체 복제와 독립적인, 예컨대 플라스미드일 수 있다. 다르게는, 숙주 세포내로 도입될 때, 벡터는 일부분 또는 완전히 숙주 세포 게놈내로 통합되고 통합된 염색체와 함께 복제되는 것일 수 있다.

벡터는 바람직하게는 본 발명의 효소를 암호화한 DNA 서열이 DNA의 전사에 필요한 추가적인 세그먼트에 사용할 수 있게 연결된 발현 벡터이다. 일반적으로, 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 두 요소를 모두 포함할 수 있다. 용어, "사용할 수 있게 연결된"은 세그먼트가 배치되어 그 의도된 목적을 위해 일제히 기능하는 것, 예컨대 전사가 효소에 대한 DNA 서열 코딩을 통해 프로모터에서 개시되고 진행되는 것을 의미한다.

프로모터는 선택된 숙주세포내에서 전사 활동을 보이는 어떤 DNA 서열일 수 있고 숙주세포에 대해 상동의 또는 비상동의 단백질을 암호화한 유전자로부터 유도될 수 있다.

박테리아 숙주세포에서의 사용을 위한 적당한 프로모터의 예는 *Bacillus stearothermophilus* 말토게닉 아밀라아제 유전자, *Bacillus licheniformis* 알파-아밀라아제 유전자, *Bacillus amyloliquefaciens* 알파-아밀라아제 유전자, *Bacillus subtilis* 알칼리성 프로테아제 유전자, 또는 *Bacillus pumilus* 크실로시다아제 유전자의 프로모터, 파아지 람다 P_R 또는 P_L 프로모터 또는 *E. coli* lac, trp 또는 tac 프로모터를 포함한다.

본 발명의 효소를 암호화한 DNA 서열은 또한, 필요하다면, 적당한 종료암호에 사용할 수 있게 연결될 수 있다.

본 발명의 재조합 벡터는 벡터가 당해 숙주세포내에서 복제될 수 있게 하는 DNA 서열을 더 포함할 수 있다.

또한 벡터는 선택성 마아커, 예컨대 숙주세포내의 결점을 보완하는 생성물의 유전자, 또는 예컨대 카나마이신, 클로람페니콜, 에리트로마이신, 테트라시클린, 스펙티노마이신 등의 항생제에 대한 저항성, 또는 중금속 또는 제초제에 대한 저항성을 암호화한 유전자를 포함할 수 있다.

본 발명의 효소를 숙주세포, 분비신호서열(리더 서열, 프레프로 서열, 또는 프레 서열로도 알려진)의 분비 경로내로 지시하는 것이 재조합 벡터에서 제공될 수 있다. 분비신호서열은 정확한 해독틀내에 있는 효소를 암호화한 DNA 서열과 결합된다. 분비신호서열은 효소를 암호화한 DNA 서열에 대해 5'에 위치한다. 분비신호서열은 보통 효소와 관련된 것일 수도 있고 또는 다른 분비 단백질을 암호화하는 유전자의 것일 수도 있다.

각각, 본 효소, 프로모터 및 선택적으로 종료암호 및/또는 분비신호서열에 대해 암호화한 DNA 서열을 연결하기 위해, 또는 적당한 PCR 증폭기구에 의해 이 서열을 결합하기 위해, 그리고 복제 또는 통합을 위해 필요한 정보를 함유하는 적당한 벡터내로 그것들을 삽입하는 데 사용되는 데 사용된 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다(예컨대 Sambrook et al., op.cit.를 참조).

숙주 세포

숙주세포내로 도입되는 본 효소를 암호화한 DNA 서열은 당해 숙주에 상동이거나 비상동일 수 있다. 숙주 세포에 대해 상동이면, 즉 사실상 숙주세포에 의해 생산되었다면, 전형적으로 그 자연적 환경보다는 다른 프로모터 서열 또는, 이용가능하다면, 다른 분비신호서열 및/또는 종료암호서열에 사용할 수 있게 연결될 것이다. 용어 "상동의"는 당해 숙주 생물 고유의 효소를 암호화한 DNA 서열을 포함하는 것을 의미한다. 용어 "비상동의"는 사실상 숙주세포에 의해 발현되지 않는 DNA 서열을 포함하는 것을 의미한다. 따라서, DNA 서열은 다른 생물로부터 비롯되거나, 합성 서열일 수 있다.

본 발명의 DNA 구조물 또는 재조합 벡터가 도입되는 숙주세포는 본 효소를 생산할 수 있고 박테리아, 효모, 균류 및 고등 진핵세포를 포함하는 임의의 세포일 수 있다.

배양시, 본 발명의 효소를 생산할 수 있는 박테리아 숙주 세포의 예는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. megatherium* 또는 *B. thuringiensis* 균주 등의 *Bacillus* 균주, 또는 *S. lividans* 또는 *S. murinus* 등의 *Streptomyces* 균주 등의 그람양성 박테리아, 또는 *Echerichia coli* 등의 그람음성 박테리아이다. 박테리아의 형질전환은 원형질체 형질전환, 에렉트로포레이션, 접합에 의해, 또는 원래 알려진 방식에서 적합한 세포를 사용하여 달성될 수 있다(전기의 Sambrook et al.,을 참조).

E. coli 등의 박테리아내에서 효소를 발현할 때, 효소는 세포질에서, 통상 불용성 입자(함유물로도 알려진)로서 보유될 수 있거나, 박테리아 분비 서열에 의해 원형질주변의 공간으로 지시될 수 있다. 전자의 경우에, 세포는 용해되고 입자는 회수되며 효소가 변성제를 희석시켜 다시 접혀진 후 변성된다. 후자의 경우에, 효소는, 예컨대 초음파분해 또는 삼투압 쇼크에 의해, 세포를 파열시켜 원형질주변 공간의 함유물을 방출하고 효소를 회수함으로써 원형질주변 공간으로부터 회수될 수 있다.

바실러스 또는 스트렙토마이세스 균주 등의 그람양성 박테리아내에서 효소를 발현할 때, 효소는 세포질 내에 보유되거나 박테리아 분비 서열에 의해 세포외 배지로 지시될 수 있다. 후자의 경우에, 효소는 이하 기술된 대로 배지로부터 회수될 수 있다.

서브틸라아제 제조 방법

본 발명은 본 발명에 따른 분리된 효소의 제조 방법을 제공하며, 여기서 효소를 암호화한 DNA 서열로 형질전환된 적당한 숙주세포는 효소의 생산을 허용하는 조건하에서 배양되고, 결과의 효소는 배양물로부터 회수된다.

효소를 암호화한 DNA 서열을 포함하는 발현벡터가 비상동의 숙주세포내로 형질전환될 때, 본 발명의 효소를 비상동 재조합 생산하게 하는 것이 가능하다.

따라서 상동의 불순물이 없는 것을 특징으로 하는, 고도로 정제된 서브틸라아제 조성물을 제조하는 것이 가능하다.

이러한 배경에서, 상동의 불순물은 본 발명의 효소가 원래 얻어지는 상동의 세포로부터 비롯된 모든 불순물(예컨대 본 발명의 효소와 다른 폴리펩티드)을 의미한다.

형질전환된 숙주세포의 배양에 사용된 배지는 당해 숙주세포의 성장에 적당한 임의의 통상적인 배지일 수 있다. 발현된 서브틸라아제는 편리하게 배양배지내에서 분리될 수 있고 원심분리 또는 여과에 의해 배지로부터 세포를 분리하는 단계, 황산암모늄 등의 염에 의해 배지의 단백질 성분을 침전시키는 단계, 이어서 이온교환 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피 등의 크로마토그래피 방법을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 회수될 수 있다.

본 발명의 서브틸라아제 변이체의 사용법

본 발명의 서브틸라아제 프로테아제 변이체는 많은 산업적 이용, 특히 세제 산업에서 사용될 수 있다.

또한 본 발명은 본 발명의 서브틸라아제 변이체를 포함하는 효소 조성물에 관한 것이다.

바람직한 산업적 이용 및 대응하는 바람직한 효소 조성물의 개요는 이하에서 기술된다.

본 개요는 본 발명의 서브틸라아제 변이체의 적당한 이용의 완전한 목록으로 의도된 것은 결코 아니다. 본 발명의 서브틸라아제 변이체는 프로테아제, 특히 서브틸라아제의 사용을 포함하는 당해분야에 알려진 다른 산업적 이용에서 사용될 수 있다.

돌연변이 효소를 포함하는 세제 조성물

본 발명은 세탁용 및 세제 조성물에서 본 발명의 돌연변이 효소의 사용법 및 돌연변이 서브틸라아제 효소를 포함하는 그러한 조성물을 포함한다. 그러한 세탁용 및 세제 조성물은 당해 분야에 잘 기술되며 적당한 세탁용 및 세제 조성물의 다른 기술에 대해서는 WO 96/34946, WO 97/07202, 및 WO 95/30011을 참조하라.

본 발명의 많은 서브틸라아제 변이체를 위한 세탁성능의 개선을 보여주는 다른 참고가 여기의 구체예로 작성되었다.

세제 개시 및 예

계면활성제 시스템

본 발명에 따른 세제 조성물은 계면활성제 시스템을 포함하며, 여기서 계면활성제는 비이온성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 양쪽성 및/또는 쯔비터이온 및/또는 반극성 계면활성제 중에서 선택될 수 있다.

계면활성제는 전형적으로 0.1 중량% 내지 60 중량%의 수준으로 존재한다.

계면활성제는 조성물에 존재하는 효소 성분과 상용성하도록 제조됨이 바람직하다. 액체 또는 겔 조성물에서 계면활성제는 이들 조성물에서 모든 효소의 안정성을 증진시키거나, 적어도 감소시키지 않는 방식으로 제조됨이 가장 바람직하다.

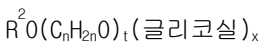
본 발명에 따라 사용되는 바람직한 시스템은 계면활성제로서 여기서 기술된 비이온성 및/또는 음이온성 계면활성제 중의 하나 이상을 포함한다.

폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 및 알킬 페놀의 폴리부틸렌 옥사이드 축합물이 본 발명의 계면활성제 방식의 비이온성 계면활성제로서 사용에 적당하고, 폴리에틸렌 옥사이드 축합물이 바람직하다. 이들 화합물은 직쇄나 측쇄 형태로, 알킬렌 옥사이드와 약 6 내지 약 14개의 탄소원자, 바람직하게는 약 8 내지 약 14개의 탄소원자를 함유하는 알킬기를 갖는 알킬페놀의 축합생성물을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 에틸렌 옥사이드는 알킬페놀 1 몰당 에틸렌옥사이드 약 2 내지 약 25 몰, 더욱 바람직하게는 3 내지 약 15 몰과 같은 양으로 존재한다. 이러한 형태의 상업적으로 이용가능한 비이온성 계면활성제는 GAF 사에 의해 시판되는 Igepal™ CO-630; 및 Rohm & Haas Company에 의해 모두 시판되는 Triton™ X-45, X-114, X-100 및 X-102를 포함한다. 이들 계면활성제는 일반적으로 알킬페놀알콕실레이트로 불린다(예컨대 알킬페놀 에톡시레이트).

에틸렌 옥사이드 약 1 내지 약 25 몰을 갖는 1차 및 2차 지방성 알코올의 축합 생성물이 본 발명의 비이온성 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용에 적당하다. 지방성 알코올의 알킬 사슬은 직선이거나 분지된, 1차이거나 2차일 수 있고, 일반적으로 약 8 내지 약 22 탄소원자를 함유할 수 있다. 알코올 1 몰당 약 2 내지 약 10 몰의 에틸렌옥사이드와 함께, 약 8 내지 약 20 탄소원자, 더욱 바람직하게는 약 10 내지 약 18 탄소원자를 함유하는 알킬기를 갖는 알코올의 축합생성물이 바람직하다. 알코올 1 몰당 약 2 내지 약 7 몰의 에틸렌옥사이드 및 가장 바람직하게는 2 내지 5 몰의 에틸렌옥사이드가 상기 축합생성물에 존재한다. 이 형태의 상업적으로 이용가능한 비이온성 계면활성제의 예는 Union Carbide Coporation에 의해 시판되는 Tergitol™ 15-S-9 (9몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₁-C₁₅ 선형 알코올의 축합생성물), Tergitol™ 24-L-6 NMW (좁은 분자량 분포를 갖는 6몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₂-C₁₄ 1차 알코올의 축합생성물); Shell Chemical Company에 의해 시판되는 Neodol™ 45-9 (9몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₄-C₁₅ 선형 알코올의 축합생성물), Neodol™ 23-3 (3.0몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₂-C₁₃ 선형 알코올의 축합생성물), Neodol™ 45-7 (7몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₄-C₁₅ 선형 알코올의 축합생성물), Neodol™ 45-5 (5몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₄-C₁₅ 선형 알코올의 축합생성물), Procter & Gamble에 의해 시판되는 Kyro™ EOB (9몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₃-C₁₅ 알코올의 축합생성물), 및 Hoechst에 의해 시판되는 Genapol LA 050 (5몰의 에틸렌옥사이드와 C₁₂-C₁₄ 알코올의 축합생성물)을 포함한다. 이들 생성물의 바람직한 HLB 범위는 8-11 그리고 가장 바람직하게는 8-10이다.

본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 또한 유용한 것은 약 6 내지 약 30 탄소원자, 바람직하게는 약 10 내지 약 16 탄소원자를 함유하는 소수성기 및 다당류, 예컨대 약 1.3 내지 약 10, 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3, 가장 바람직하게는 약 1.3 내지 약 2.7 당 단위를 함유하는 친수성기인 폴리글리코시드를 갖는 US 4,565,647에 개시된 알킬다당류이다. 5 또는 6 탄소원자를 함유하는 모든 환원당이 사용될 수 있고, 예컨대 포도당, 갈락토오스 및 갈락토오스 부분이 글루코오스 부분에 치환될 수 있다(선택적으로 소수성기가 2-, 3-, 4- 등의 위치에 부착되어 대항하는 포도당 또는 갈락토오스를 글루코시드 또는 갈락토시드로 만든다). 당사이의 결합, 예컨대 부가적인 당 단위의 한 위치와 우선하는 당 단위상의 2-, 3-, 4-, 및/또는 6- 위치사이의 결합이 존재할 수 있다.

바람직한 알킬다당류는 화학식



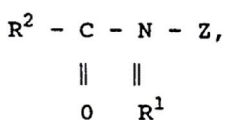
을 가지며, 여기서 R₂는 알킬, 알킬페닐, 히드록시알킬, 히드록시알킬페닐, 및 그 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되고 알킬기는 약 10 내지 약 18, 바람직하게는 약 12 내지 약 14의 탄소원자를 함유하고; n은 2 또는 3, 바람직하게는 2이고; t는 0 내지 약 10, 바람직하게는 0이고; x는 약 1.3 내지 약 10, 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3, 가장 바람직하게는 약 1.3 내지 약 2.7이다. 글리코실은 포도당으로부터 바람직하게 유도된다. 이들 화합물을 제조하기 위해, 알코올 또는 알킬폴리에톡시 알코올이 먼저 제조되고 그 다음 포도당, 또는 포도당 원과 반응하여 글루코시드(1번 위치에 부착됨)를 형성한다. 부가적인 글리코실 단위는 그 다음 그 1번 위치와 우선하는 글리코실 단위의 2번, 3번, 4번, 및/또는 6번 위치, 바람직하게는 주로 2번 위치사이에 부착될 수 있다.

프로필렌 글리콜과 프로필렌 옥사이드의 축합에 의해 형성된 소수성염기와 에틸렌옥사이드의 축합생성물 또한 본 발명의 부가적인 비이온성 계면활성제 시스템으로서 사용에 적당하다. 이들 화합물의 소수성부분은 바람직하게 약 1500 내지 약 1800의 분자량을 가질 것이고 불수용성을 나타낼 것이다. 이 소수성부분에 대한 폴리옥시에틸렌 부분의 첨가는 전체로서 분자의 수용성을 증가시키는 경향이 있고, 생성물의 액체 특성은 폴리옥시에틸렌함량이, 에틸렌 옥사이드의 약 40 몰까지와의 축합에 상당하는, 축합생성물 총 중량의 약 50%인 점까지 보유된다. 이러한 유형의 화합물의 예는 BASF에 의해 시판되는 상업적으로 이용가능한 Pluronic™ 계면활성제 몇몇을 포함한다.

또한 본 발명의 비이온성 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용에 적당한 것은 프로필렌 옥사이드 및 에틸렌디아민의 반응으로부터 비롯된 생성물과 에틸렌옥사이드의 축합생성물이다. 이들 생성물의 소수성 부분은 에틸렌디아민과 과잉의 프로필렌 옥사이드의 반응생성물로 구성되고, 일반적으로 약 2500 내지 약 3000의 분자량을 갖는다. 이 소수성 부분은 축합생성물이 폴리옥시에틸렌 약 40 중량% 내지 약 80 중량%를 함유하고 약 5,000 내지 약 11,000의 분자량을 갖는 정도까지 에틸렌옥사이드로 축합된다. 이러한 유형의 비이온성 계면활성제의 예는 BASF에 의해 시판되는, 상업적으로 이용가능한 Tetric™ 화합물 중 몇몇을 포함한다.

본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용에 바람직한 것은 에틸렌옥사이드, 알킬다당류, 및 그 혼합물의 약 1 내지 약 25 몰과 1차 및 2차 지방성 알코올의 축합 생성물인, 알킬페놀의 폴리옥시에틸렌 옥사이드 축합물이다. 가장 바람직하게는 3 내지 15 에톡시기를 갖는 C₈-C₁₄ 알킬 페놀 에톡실레이트 및 2 내지 10 에톡시기를 갖는 C₈-C₁₈ 알코올 에톡실레이트 (바람직하게는 평균 C₁₀), 및 그 혼합물이다.

매우 바람직한 비이온성 계면활성제는 화학식



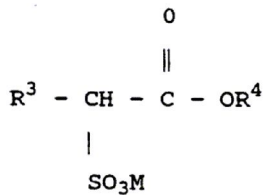
의 폴리히드록시 지방산 아마이드 계면활성제이며, 여기서 R¹은 H이거나, 또는 R¹은 C₁₋₄ 히드로카빌기, 2-

히드록시에틸기, 2-히드록시프로필기 또는 그 혼합물이고, R²는 C₅₋₃₁ 히드록카빌기이고, Z는 사슬에 직접 결합된 적어도 3 개의 히드록실기를 갖는 선형 히드록카빌기 사슬을 갖는 폴리히드록시히드록카빌기이거나, 또는 그것의 알콕시화 유도체이다. 바람직하게는, R¹은 메틸기이고, R²는 코코넛 알킬기 또는 그 혼합물 등의 직선 C₁₁₋₁₅ 알킬기 또는 C₁₆₋₁₈ 알킬 또는 알케닐 사슬이며, Z는 환원성 아미노화 반응에서 포도당, 과당, 말토스 또는 락토스 등의 환원당으로부터 유도된다.

매우 바람직한 음이온성 계면활성제는 알킬 알콕시화 설페이트 계면활성제를 포함한다. 이것의 예는 화학식 RO(A)_mSO₃M의 수용성 염 또는 산이며, 여기서 R은 비치환 C₁₀-C₂₄ 알킬 또는 C₁₀-C₂₄ 알킬 성분, 바람직하게는 C₁₂-C₂₀ 알킬 또는 히드록시알킬, 더욱 바람직하게는 C₁₂-C₁₈ 알킬 또는 히드록시알킬을 갖는 히드록시알킬기이고, A는 에톡시 또는 프로프옥시 단위이고, m은 0보다 크며, 전형적으로 약 0.5와 약 6 사이, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 약 3 사이이고, M은 H이거나 또는 예컨대 금속양이온(예컨대 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘 등), 암모늄 또는 치환암모늄 양이온일 수 있는 양이온이다. 알킬 에톡시화 설페이트뿐만 아니라 알킬 프로프옥시화 설페이트가 여기서 검토된다. 치환 암모늄 양이온의 특정 예는 테트라메틸 암모늄 및 디메틸 피페르디늄 양이온 등의 메틸-, 디메틸-, 트리메틸 암모늄 양이온 및 4차 암모늄 양이온 및 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 그 혼합물 등의 알킬아민으로부터 유도된 것들을 포함한다. 전형적인 계면활성제는 C₁₂-C₁₈ 알킬 폴리에톡실레이트 (1.0) 설페이트 (C₁₂-C₁₈E(1.0)M), C₁₂-C₁₈ 알킬 폴리에톡실레이트 (2.25) 설페이트 (C₁₂-C₁₈E(2.25)M), C₁₂-C₁₈ 알킬 폴리에톡실레이트 (3.0) 설페이트 (C₁₂-C₁₈E(3.0)M), 및 C₁₂-C₁₈ 알킬 폴리에톡실레이트 (4.0) 설페이트 (C₁₂-C₁₈E(4.0)M)이고, 여기서 M은 편리하게 나트륨 및 칼륨으로부터 선택된다.

사용되는 적당한 음이온성 계면활성제는 "The Journal of the American Oil Chemists Society"(52 (1975), pp. 323-329)에 따라 가스성 SO₃으로 술폰화된 C₈-C₂₀ 카르복실산의 선형 에스테르(즉, 지방산)를 포함하는 알킬 에스테르 설포네이트 계면활성제이다. 적당한 개시 물질은 우지, 야자유 등으로부터 유도되는 천연 지방 물질을 포함할 것이다.

특히 세탁에 이용을 위한, 바람직한 알킬 에스테르 설포네이트 계면활성제는 화학식:



의 알킬 에스테르 설포네이트 계면활성제를 포함하며, 여기서 R³는 C₈-C₂₀ 히드록카빌기, 바람직하게는 알킬기, 또는 그 조합이며, R⁴는 C₁-C₆ 히드록카빌기, 바람직하게는 알킬기, 또는 그 조합이고, M은 알킬 에스테르 설포네이트와 수용성 염을 형성하는 양이온이다. 적당한 염-형성 양이온은 나트륨, 칼륨, 및 리튬 등의 금속 원소, 및 모노에탄올아민, 디에탄올아민, 및 트리에탄올아민 등의 치환 또는 비치환 암모늄 양이온을 포함한다. 바람직하게는, R³는 C₁₀-C₁₆ 알킬이고, R⁴는 메틸, 에틸 또는 이소프로필이다. 특히 R³가 C₁₀-C₁₆ 알킬인 메틸 에스테르 설포네이트가 바람직하다.

다른 적당한 음이온성 계면활성제는 화학식 ROSO₃M의 수용성 염 또는 산인 알킬 설페이트 계면활성제를 포함하며, 여기서 R은 바람직하게 C₁₀-C₂₄ 히드록카빌기, 바람직하게는 C₁₀-C₂₀ 알킬 성분을 갖는 알킬기 또는 히드록시알킬기, 더욱 바람직하게는 C₁₂-C₁₈ 알킬기 또는 히드록시알킬기이고, M은 H이거나 예컨대 알칼리 금속 양이온(예컨대 나트륨, 칼륨, 리튬), 또는 암모늄 또는 치환 암모늄(예컨대 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 및 그 혼합물 등의 알킬아민으로부터 유도된 테트라메틸-암모늄 및 디메틸 피페르디늄 양이온, 4차 암모늄 양이온 등의 메틸-, 디메틸-, 및 트리메틸 암모늄 및 4차 암모늄 양이온)이다. 전형적으로, C₁₂-C₁₆의 알킬 사슬은 보다 낮은 세탁 온도(예컨대 약 50°C이하)에 대해 바람직하고 C₁₆-C₁₈ 알킬 사슬은 보다 높은 세척 온도(예컨대 약 50°C이상)에 대해 바람직하다.

세제 목적에 유용한 다른 음이온성 계면활성제는 또한 본 발명의 세탁용 세제 조성물에 포함될 수 있다. 이들은 비누의 염(예컨대 모노-, 디-, 및 트리에탄올아민염 등의 나트륨, 칼륨, 암모늄, 및 치환 암모늄 염을 포함함), C₈-C₂₂ 1차 또는 2차 알칸설포네이트, C₈-C₂₄ 올레핀설포네이트, 예컨대 영국 특허 명세서 제 1,082,179에 기술된 대로 알칼리토 금속 시트르산염의 열분해 생성물의 술폰화에 의해 제조된 술폰화 폴리카르복실산, C₈-C₂₄ 알킬폴리글리콜에테르설페이트 (최대 10몰의 에틸렌 옥사이드를 함유하는); 알킬 글리세롤 설포네이트, 지방산 글리세롤 설포네이트, 지방산 올레일 글리세롤 설페이트, 알킬 페놀 에틸렌 옥사이드 에테르 설페이트, 파라핀 설포네이트, 알킬 포스페이트, 아실 이세티오네이트 등의 이세티오네이트, N-아실 타우레이트, 알킬 숙시나메이트 및 설포숙시네이트, 설포숙시네이트의 모노에스테르 (특히 포화 및 불포화 C₁₂-C₁₈ 모노에스테르) 및 설포숙시네이트의 디에스테르 (특히 포화 및 불포화 C₆-C₁₂ 디에스테르), 아실 사르코시네이트, 알킬폴리글루코시드의 황산염 등의 알킬다당류의 황산염(이하에서 기술되는 비이온성 비황산화 화합물), 분지된 1차 알킬 설페이트, 및 화학식 RO(CH₂CH₂O)_k-CH₂COO-M의 것 등의 알킬 폴리에톡시 카르복실레이트(여기서 R은 C₈-C₂₂ 알킬기이고, k는 1 내지 10의 정수이고, M은 양이온을 형성하는 가용성염이다)를 포함한다. 수지산 및 수소화수지산, 그리고 로진 및 수소화로진이 적

당하며, 수지산 및 수소화수지산은 톨유로 존재하거나 톨유로부터 유도된다.

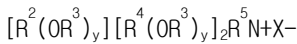
알킬벤젠 설포네이트는 매우 바람직하다. 특히 바람직한 것은 알킬기가 10 내지 18 개의 탄소원자를 바람직하게 함유하는 선형 (직쇄) 알킬 벤젠 설포네이트 (LAS)이다.

또 다른 예가 "Surface Active Agents and Detergents" (Vol. I 및 II, Schwartz, Perry and Berch)에 기술된다. 많은 그러한 계면활성제는 또한 US 3,929,678 (여기에 참고로 포함된 23 컬럼, 58 라인으로부터 29 컬럼, 23 라인)에 일반적으로 개시된다.

그 안에 포함될 때, 본 발명의 세탁용 세제 조성물은 전형적으로 그러한 음이온 계면활성제의 약 1 중량% 내지 약 40 중량%, 바람직하게는 약 3 중량% 내지 약 20 중량%를 포함한다.

본 발명의 세탁용 세제 조성물은 또한 양이온, 양쪽성, 썬비터이온, 및 반극성 계면활성제뿐만 아니라 여기에 이미 기술된 것 이외의 비이온성 및/또는 음이온 계면활성제를 함유할 수 있다.

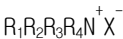
본 발명의 세탁용 세제 조성물에서 사용에 적당한 양이온 세제 계면활성제는 하나의 장쇄 히드로카빌기를 갖는 것이다. 그러한 양이온 계면활성제의 예는 알킬트리메틸암모늄 할로게나이드 등의 암모늄 계면활성제 및 화학식:



을 갖는 계면활성제를 포함하며, 여기서 R²는 알킬사슬내에 약 8 내지 약 18개의 탄소원자를 갖는 알킬 또는 알킬 벤질기이고, 각각의 R³는 -CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)-, -CH₂CH(CH₂OH)-, -CH₂CH₂CH₂-, 및 그 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되고; 각각의 R⁴는 C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 히드록실알킬, 2개의 R⁴기를 연결시켜 형성된 벤질 고리 구조, -CH₂CHOHCHOHCOR⁶CHOHCH₂OH로 구성되는 군으로부터 선택되고, 여기서 R⁶는 약 1000 미만의 분자량을 갖는 임의의 헥소스 또는 헥소스 중합체이고, y가 0이 아닐 때 수소이며; R⁵는 R⁴와 동일하거나 알킬사슬이고, 탄소원자의 총수 또는 R²와 R⁵의 합은 약 18을 넘지 않고; 각각의 y는 0 내지 약 10이고, y값의 합은 0 내지 약 15이고; X는 임의의 상용성 음이온이다.

매우 바람직한 양이온 계면활성제는 화학식 1:

화학식 1



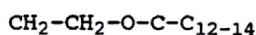
을 갖는 본 조성물에 유용한 수용성 4차 암모늄 화합물이며, 여기서 R₁은 C₈-C₁₆ 알킬이고, 각각의 R₂, R₃ 및 R₄는 독립적으로 C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 히드록시 알킬, 벤질, 및 -(C₂H₄)_xH(여기서 x는 2 내지 5의 값을 가짐)이고, X는 음이온이다. 많아야 하나의 R₂, R₃ 또는 R₄가 벤질이어야 한다.

R₁의 바람직한 알킬 사슬 길이는 특히 알킬기가 코코넛 또는 팜 인 지방으로부터 유도된 사슬 길이의 혼합물이거나 올레핀 비축 또는 옥소 알코올 합성에 의해 합성적으로 유도된 C₁₂-C₁₅이다.

R₂R₃ 및 R₄의 바람직한 기는 메틸 및 히드록시에틸기이고 음이온 X는 할로겐화물, 메토설페이트, 아세테이트 및 포스페이트 이온으로부터 선택될 수 있다.

여기에 사용을 위한 화학식 1의 적당한 4차 암모늄 화합물의 예는:

- 염화 또는 브롬화 코코넛 트리메틸 암모늄;
- 염화 또는 브롬화 코코넛 메틸 디히드록시에틸 암모늄;
- 염화 데실 트리에틸 암모늄;
- 염화 또는 브롬화 데실 디메틸 히드록시에틸 암모늄;
- 염화 또는 브롬화 C₁₂₋₁₅ 디메틸 히드록시에틸 암모늄;
- 염화 또는 브롬화 코코넛 디메틸 히드록시에틸 암모늄;
- 미리스틸 트리메틸 암모늄 메틸 설페이트;
- 염화 또는 브롬화 라우릴 디메틸 벤질 암모늄;
- 염화 또는 브롬화 라우릴 디메틸 (에텐옥시)₄ 암모늄;
- 콜린 에스테르 (R₁이



알킬이고 R₂R₃R₄는 메틸인 화학식 1의 화합물);

디알킬 이미다졸린[화학식 1의 화합물]이다.

여기에 유용한 다른 양이온 계면활성제는 또한 US 4,228,044 및 EP 000 224에 기술된다.

거기에 포함될 때, 본 발명의 세탁용 세제 조성물은 그러한 양이온 계면활성제의 0.2 중량% 내지 약 25 중량%, 바람직하게는 약 1 중량% 내지 약 8 중량%를 포함한다.

양쪽성 계면활성제 또한 본 발명의 세탁용 세제 조성물에서의 사용에 적당하다. 이들 계면활성제는 2차 또는 3차 아민의 지방성 유도체, 또는 지방성 라디칼이 직선 또는 분지된 사슬일 수 있는 헤테로고리 2차 및 3차 아민의 지방성 유도체로 널리 기술될 수 있다. 지방성 치환기의 하나는 적어도 약 8개의 탄소원자, 전형적으로 약 8 내지 약 18개의 탄소원자를 함유하고, 적어도 하나는 음이온 수용화 기, 예컨대, 카르복시기, 술폰산염기, 황산염기를 함유한다. 양쪽성 계면활성제의 예에 대해선 US 3,929,678 (19 컬럼, 18-35 라인)을 참조하라.

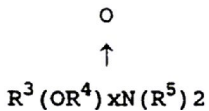
거기에 포함될 때, 본 발명의 세탁용 세제 조성물은 전형적으로 그러한 양쪽성 계면활성제의 0.2 중량% 내지 약 15 중량%, 바람직하게는 약 1 중량% 내지 약 10 중량%를 포함한다.

쯔비테리온 계면활성제가 또한 세탁용 세제 조성물에서의 사용에 적당하다. 이들 계면활성제는 2차 및 3차 아민의 유도체, 헤테로고리 2차 및 3차 아민의 유도체, 또는 4차 암모늄, 4차 포스포늄 또는 3차 술폰화 화합물의 유도체로 널리 기술될 수 있다. 쯔비테리온 계면활성제의 예에 대해선 US 3,929,678 (19 컬럼, 38 라인부터 22 컬럼, 48 라인)을 참조하라.

거기에 포함될 때, 본 발명의 세탁용 세제 조성물은 전형적으로 그러한 쯔비테리온 계면활성제의 0.2 중량% 내지 약 15 중량%, 바람직하게는 약 1 중량% 내지 약 10 중량%를 포함한다.

반극성 비이온성 계면활성제는 약 10 내지 약 18개의 탄소원자의 하나의 알킬 부분과 약 1 내지 약 3개의 탄소원자를 함유하는 알킬기와 히드록시알킬기로 구성되는 군으로부터 선택된 2 부분을 함유하는 수용성 아민 옥사이드; 약 10 내지 약 18 개의 탄소원자의 하나의 알킬 부분과 약 1 내지 약 3개의 탄소원자를 함유하는 알킬기 및 히드록시알킬기로 구성되는 군으로부터 선택된 2 부분을 함유하는 수용성 포스핀 옥사이드; 약 10 내지 약 18개의 탄소원자의 하나의 알킬 부분과 약 1 내지 약 3개의 탄소원자의 알킬 및 히드록시알킬 부분으로 구성되는 군으로부터 선택된 부분을 함유하는 수용성 술폰시드를 포함하는 비이온성 계면활성제의 특수한 카테고리이다.

반극성 비이온성 세제 계면활성제는 화학식:



을 갖는 아민 옥사이드 계면활성제를 포함하며, 여기서 R³는 약 8 내지 약 22개의 탄소원자를 함유하는 알킬, 히드록시알킬, 또는 알킬 페닐기 또는 그 혼합물이고; R⁴는 약 2 내지 약 3개의 탄소원자를 함유하는 알킬렌 또는 히드록시알킬렌기 또는 그 혼합물이고; x는 0 내지 약 3 이고; 각각의 R⁵는 약 1 내지 약 3개의 탄소원자를 함유하는 알킬 또는 히드록시알킬기 또는 약 1 내지 약 3개의 에틸렌 옥사이드 기를 함유하는 폴리메틸렌 옥사이드이다. R⁵기는 예컨대 산소 또는 질소원자를 통해 서로 부착되어 고리 구조를 형성할 수 있다.

이들 아민 옥사이드 계면활성제는 특히 C₁₀-C₁₈ 알킬 디메틸 아민 옥사이드 및 C₈-C₁₂ 알콕시 에틸 디히드록시 에틸 아민 옥사이드를 포함한다.

거기에 포함될 때, 본 발명의 세탁용 세제 조성물은 전형적으로 그러한 반극성 비이온성 계면활성제의 0.2 중량% 내지 약 15 중량%, 바람직하게는 약 1 중량% 내지 약 10 중량%를 포함한다.

빌더 계

본 발명에 따른 조성물은 빌더 시스템을 더 포함할 수도 있다. 알루미늄규산염 물질, 규산염, 폴리카르복실산염 및 지방산, 에틸렌디아민 테트라아세테이트 등의 물질, 아미노폴리포스폰산염 등의 금속 이온 봉쇄제, 특히 에틸렌디아민 테트라메틸렌 포스폰산 및 디에틸렌 트리아민 펜타메틸렌포스폰산을 포함하는 임의의 통상적 빌더 시스템이 여기에서의 사용에 적당하다. 명백한 환경적 이유때문에 덜 바람직하지만, 인산염 빌더 또한 여기에 사용될 수 있다.

적당한 빌더는 무기 교환 물질, 통상적으로 무기 수화 알루미늄실리케이트 재료, 더욱 특히 수산화 제올라이트 A, X, B, HS 또는 MAP 등의 수산화 합성 제올라이트 일 수 있다.

다른 적당한 무기 빌더 재료는 층상 실리케이트, 예컨대 SKS-6 (Hoechst)이다. SKS-6은 규산나트륨 (Na₂Si₂O₅)으로 구성되는 결정질 층상 규산염이다.

하나의 카르복시기를 함유하는 적당한 폴리카르복실산염은 벨기에 특허 제 831,368 호, 제 821,369 호 및 제 821,370 호에 개시된 락트산, 글리콜산 및 그것의 에테르 유도체를 포함한다. 2개의 카르복시기를 함유하는 폴리카르복실산염은 숙신산, 말론산, (에틸렌디아민) 디아세트산, 말레산, 디글리콜린산, 타르타르산, 타르트론산 및 푸마르산의 수용성 염뿐만 아니라, 독일 공보 제 2,446,686 호 및 제 2,446,487 호, 미국 특허 제 3,935,257호에 기술된 에테르 카르복실산염 및 벨기에 특허 제 840,623 호에 기술된 술폰 카르복실산염을 포함한다. 3개의 카르복시기를 함유하는 폴리카르복실산염은 특히 수용성 시트르산염, 아코니트레이트 및 시트라코네이트뿐만 아니라 영국 특허 제 1,379,241 호에 기술된 카르복시메틸옥시숙신산염 등의 숙신산염 유도체, 네덜란드 출원 제 7205873 호에 기술된 락트옥시숙신산염, 및 영국

특허 제 1,387,447 호에 기술된 2-옥사-1,1,3-프로판 트리카르복실산염 등의 옥시폴리카르복실산염 물질을 포함한다.

4개의 카르복시기를 함유하는 폴리카르복실산염은 영국 특허 제 1,261,829 호에 개시된 옥시디숙신산염을 포함하고, 술폰 치환기를 함유하는 테트라카르복실산 1,1,2,2-에탄, 테트라카르복실산 1,1,3,3-프로판은 영국 특허 제 1,398,421 호 및 제 1,398,422 호 및 미국 특허 제 3,936,448 호에 개시된 술폰숙신산염 유도체, 및 영국 특허 제 1,082,179 호에 기술된 술폰화 열분해 시트르산염을 포함하고 포스포네 치환기를 함유하는 폴리카르복실산염은 영국 특허 제 1,439,000 호에 개시된다.

지방족고리 및 헤테로고리 폴리카르복실산염은 시클로펜탄-시스, 시스,-시스-테트라카르복실산염, 시클로펜타디엔이드 펜타카르복실레이트, 2,3,4,5-테트라히드로푸란-시스, 시스, 시스-테트라카르복실산염, 2,5-테트라히드로푸란-시스, 디스카르복실산염, 2,2,5,5- 테트라히드로푸란- 테트라카르복실산염, 1,2,3,4,5,6 -헥산-헥사카르복실산염 및 소르비톨, 마니톨 및 크실리톨 등의 다가 알코올의 카르복시메틸 유도체를 포함한다. 방향족 폴리카르복실산염은 영국 특허 제 1,425,343 호에 개시된 멜리틴산, 피로멜리틴산 및 프탈산 유도체를 포함한다.

상기 중에서, 바람직한 폴리카르복실산염은 분자 당 3개까지의 카르복시기, 더욱 특히 시트르산염을 함유하는 히드록시카르복실산염이다.

본 조성물에 사용을 위해 바람직한 빌더 시스템은 제올라이트 A 등의 불수용성 알루미늄규산염 빌더 또는 층상 규산염 (SKS-6)의 혼합물, 및 시트르산 등의 수용성 카르복실산염 킬레이트 시약을 포함한다.

본 발명에 따라 세제 조성물에 포함되기 위한 적당한 킬레이트화제는 에틸렌디아민-N,N'-디숙신산 (EDDS) 또는 알칼리 금속원소, 알칼리토 금속원소, 암모늄, 또는 그것의 치환 암모늄염, 또는 그 혼합물이다. 바람직한 EDDS 화합물은 유리산 형태 및 그것의 나트륨염 또는 마그네슘염이다. 그러한 바람직한 나트륨염의 EDDS의 예는 Na₂EDDS 및 Na₄EDDS를 포함한다. 그러한 바람직한 마그네슘염의 EDDS의 예는 MgEDDS 및 Mg₂EDDS를 포함한다. 마그네슘염은 본 발명에 따른 조성물에 포함되기에 가장 바람직하다.

바람직한 빌더 시스템은 제올라이트 A 등의 불수용성 알루미늄규산염 빌더와 시트르산 등의 수용성 카르복실산염 킬레이트시약의 혼합물을 포함한다.

입상 조성물에 사용을 위한 빌더 시스템의 일부를 형성할 수 있는 다른 빌더 물질은 알칼리 금속 탄산염, 중탄산염, 규산염 등의 무기 물질, 및 유기인산염, 아미노 폴리알킬렌 포스포네이트 및 아미노 폴리카르복실레이트 등의 유기물질을 포함한다.

다른 적당한 수용성 유기염은 동- 또는 공중합체 산 또는 그 염이며, 폴리카르복실산은 많아야 2개의 탄소원자에 의해 서로 분리된 적어도 2개의 카르복시 라디칼을 포함한다.

이러한 유형의 중합체는 GB-A-1,596,756에 개시된다. 그러한 염의 예는 MW 2000-5000의 폴리아크릴산염 및 20,000 내지 70,000, 특히 약 40,000의 분자량을 갖는 공중합체같은 말레산 무수물과 그것의 공중합체이다.

세제 빌더 염은 보통은 조성물의 5 중량% 내지 80 중량%의 양으로 포함된다. 액체 세제를 위한 빌더의 바람직한 수준은 5 중량% 내지 30 중량%이다.

효소

본 발명의 효소 제조 외에 바람직한 세제 조성물은 세탁 성능 및/또는 직물 보호 이점을 제공하는 다른 효소를 포함한다.

그러한 효소는 다른 프로테아제, 리파아제, 쿠티나아제, 아밀라아제, 셀룰라아제, 퍼옥시다아제, 옥시다아제 (예컨대 락카아제)를 포함한다.

프로테아제 : 알칼리성 용액에서 사용에 적당한 다른 모든 프로테아제가 사용될 수 있다. 적당한 프로테아제는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것을 포함한다. 미생물 기원이 바람직하다. 화학적 또는 유전적 변형 돌연변이체가 포함된다. 프로테아제는 세린 프로테아제, 바람직하게는 알칼리성 미생물 프로테아제 또는 트립신류 프로테아제일 수 있다. 알칼리성 프로테아제의 예는 서브틸리신, 특히 Bacillus로부터 유도된 것들, 예컨대 서브틸리신 Novo, 서브틸리신 Carlsberg, 서브틸리신 309, 서브틸리신 147 및 서브틸리신 168 (WO 89/06279에 기술된)이다. 트립신류 프로테아제의 예는 트립신(예컨대 돼지나 소의) 및 WO 89/06270에 기술된 Fusarium 프로테아제이다.

바람직한 상업적으로 이용가능한 프로테아제 효소는 Novo Nordisk A/S (덴마크)사에 의해 Alcalase, Savinase, Primase, Durazym, 및 Esperase의 상표로 시판되는 것들, Genencor International에 의해 Maxatase, Maxacal, Maxapem, Properase, Purafect 및 Purafect OXP의 상표로 시판되는 것들, 및 Solvay Enzyme에 의해 Opticlean 및 Optimase의 상표로 시판되는 것들을 포함한다. 프로테아제 효소는 조성물의 0.0001 중량% 내지 2 중량% 효소 단백질 수준으로, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량% 효소 단백질 수준으로, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량% 효소 단백질 수준으로, 훨씬 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량% 효소 단백질 수준으로 본 발명에 따른 조성물에 포함될 수 있다.

리파아제: 알칼리성 용액에서 사용에 적당한 모든 리파아제가 사용될 수 있다. 적당한 리파아제는 박테리아 또는 균류 기원의 것들을 포함한다. 화학적 또는 유전적 변형 돌연변이체가 포함된다.

유용한 리파아제의 예는 예컨대 EP 258 068 및 EP 305 216에 기술된 Humicola lanuginosa 리파아제, 예컨대 EP 238 023에 기술된 Rhizomucor miehei 리파아제, C. antarctica 리파아제, 예컨대 EP 214 761에 기술된 C. antarctica 리파아제 A 또는 B 등의 Candida 리파아제, 예컨대 EP 218 272에 기술된 P. alcaligenes 및 P. pseudoalcaligenes 등의 Pseudomonas 리파아제, 예컨대 EP 331 376에 기술된 P.

cepacia 리파아제, 예컨대 GB 1,372,034에 개시된 P. stutzeri 리파아제, P. fluorescens 리파아제, Bacillus 리파아제, 예컨대 B. subtilis 리파아제 (Dartois et al., (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260), B. stearothermophilus 리파아제 (JP 64/744992) 및 B. pumilus 리파아제 (WO 91/16422)를 포함한다.

또한, Yamaguchi et al., ((1991), Gene 103, 61-67)에 의해 기술된 Penicillium camembertii 리파아제, Geotricum candidum 리파아제 (Schimada, Y, et al., (1989), J. Biochem., 106, 383-388), 및 R. delemar 리파아제 등의 여러 Rhizopus 리파아제 (Haas, M.J et al., (1991), Gene 109, 117-113), R. niveus 리파아제 (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719) 및 R. oryzae 리파아제를 포함하는 많은 클로닝된 리파아제가 유용할 수 있다.

쿠티나아제, 예컨대 WO 88/09367에 기술된 Pseudomonas mendocina로부터 유도된 쿠티나아제, 또는 Fusarium solani pisi (예컨대 WO 90/09446에 기술된)로부터 유도된 쿠티나아제 등의 지방분해 효소의 다른 유형이 또한 유용할 수 있다.

특히 적당한 리파아제는 M1 Lipase™, Luma fast™ 및 Lipomax™ (Genencor), Lipolase™ 및 Lipolase Ultra™(Novo Nordisk A/S), 및 Lipase P "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.) 등의 리파아제이다.

리파아제는 조성물의 0.00001 중량% 내지 2 중량% 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량% 효소 단백질의 수준에서, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량% 효소 단백질의 수준에서, 훨씬 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량% 효소 단백질의 수준에서 통상 세제 조성물에 혼합된다.

아밀라아제: 알칼리성 용액에서 사용에 적당한 모든 아밀라아제 (α 및/또는 β)가 사용될 수 있다. 적당한 아밀라아제는 박테리아 또는 균류 기원의 것을 포함한다. 화학적 또는 유전적으로 변형된 돌연변이체가 포함된다. 예컨대 아밀라아제는 GB 1,296,839에 더욱 상세히 기술되는 B. licheniformis의 특정 균주로부터 얻어지는 α -아밀라아제를 포함한다. 상업적으로 이용가능한 아밀라아제는 Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ 및 BAN™ (Novo Nordisk A/S로부터 이용가능함) 및 Rapidase™ 및 Maxamyl p™ (Genencor로부터 이용가능함)이다.

아밀라아제는 통상 조성물의 0.00001 중량% 내지 2 중량% 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량% 효소 단백질의 수준에서, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량% 효소 단백질의 수준에서, 훨씬 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량% 효소 단백질의 수준에서 통상 세제 조성물에 혼합된다.

셀룰라아제: 알칼리성 용액에서 사용에 적당한 모든 셀룰라아제가 사용될 수 있다. 적당한 셀룰라아제는 박테리아 또는 균류 기원의 것을 포함한다. 화학적 또는 유전적 변형 돌연변이체를 포함한다. 적당한 셀룰라아제는 Humicola insolens로부터 생성된 균류 셀룰라아제를 개시하는 US 4,435,307에 개시된다. 특히 적당한 셀룰라아제는 색채 배려 이점을 갖는 셀룰라아제이다. 그러한 셀룰라아제의 예는 유럽 특허 출원 제 0 495 257에 개시된 셀룰라아제이다.

상업적으로 이용가능한 셀룰라아제는 Humicola insolens의 균주에 의해 생성된 Celluzyme™(Novo Nordisk A/S), 및 KAC-500(B)™ (Kao Corporation)을 포함한다.

셀룰라아제는 통상 조성물의 0.00001 중량% 내지 2 중량% 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량% 효소 단백질의 수준에서, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량% 효소 단백질의 수준에서, 훨씬 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량% 효소 단백질의 수준에서 세제 조성물에 혼합된다.

퍼옥시다아제/옥시다아제: 퍼옥시다아제 효소가 과산화수소 또는 그 공급원(예컨대 과탄산염, 과불산염 또는 과황산염)과 조합하여 사용된다. 옥시다아제 효소는 산소와 조합하여 사용된다. 효소의 양 유형 모두가 "용액 표백법"에, 즉 직물을 세척액에서 함께, 바람직하게는 WO 94/12621 및 WO 95/01426에 기술된 향상제와 함께 세척하였을 때 상기 염색 조직에서 다른 조직으로의 조직 염료의 전이를 방지하기 위해 사용된다. 적당한 퍼옥시다아제/옥시다아제는 식물, 박테리아 또는 균류 기원의 것들을 포함한다. 화학적 또는 유전적으로 변형된 돌연변이체가 포함된다.

퍼옥시다아제 및/또는 옥시다아제 효소는 통상 조성물의 0.00001 중량% 내지 2 중량% 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량% 효소 단백질의 수준에서, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량% 효소 단백질의 수준에서, 훨씬 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량% 효소 단백질의 수준에서 세제 조성물에 혼합된다.

상기 효소의 혼합물 특히 프로테아제, 아밀라아제, 리파아제 및/또는 셀룰라아제의 혼합물이 여기에 포함된다.

본 발명의 효소, 또는 세제 조성물에 포함된 다른 모든 효소는 통상 조성물의 0.00001 중량% 내지 2 중량% 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량% 효소 단백질의 수준에서, 더욱 바람직하게는 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량% 효소 단백질의 수준에서, 훨씬 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량% 효소 단백질의 수준에서 통상 세제 조성물에 혼합된다.

표백제: 본 발명의 세제 조성물에 포함될 수 있는 부가적인 선택적 세제 성분은 400-800 마이크론의 입자 직경을 갖는 PB1, PB4 및 과탄산염 등의 표백제를 포함한다. 이들 표백제 성분은 선택된 표백제에 의존하여, 하나 이상의 산소 표백제 및 하나 이상의 표백 활성제를 포함할 수 있다. 존재할 때 산소표백제 화합물은 전형적으로 약 1% 내지 약 25%의 수준에서 존재한다. 일반적으로, 표백제 화합물은 비액체 제형, 예컨대 입상 세제내에 임의로 첨가된 화합물이다.

여기에 사용을 위한 표백제 성분은 산소 표백제를 포함하는 세제 조성물에 유용한 임의의 표백제뿐만 아

나라 당해 분야의 다른 공지의 표백제일 수 있다.

본 발명에 적당한 표백제는 활성화 또는 비활성화 표백제일 수 있다.

사용될 수 있는 산소 표백제의 한 종류는 과카르복실산 표백제 및 그 염을 포함한다. 이러한 종류의 작용제의 적당한 예는 마그네슘 모노퍼옥시프탈레이트 핵사수화물, 메타-클로로 과벤조산의 마그네슘염, 4-노닐아미노-4-옥소퍼옥시부티르산 및 디퍼옥시도데칸디온산을 포함한다. 그러한 표백제는 US 4,483,781, US 740,446, EP 0 133 354 및 US 4,112,934에 개시된다. 매우 바람직한 표백제는 또한 US 4,634,551에 기술된 6-노닐아미노-6-옥소퍼옥시카프론산을 포함한다.

사용될 수 있는 다른 종류의 표백제는 할로겐 표백제를 포함한다. 하이포할라이트 표백제의 예는, 예컨대 트리클로로 이소시아누르산 그리고 디클로로이소시아누르산나트륨 및 칼륨 그리고 N-클로로 및 N-브로모 알칸 술폰아미드를 포함한다. 그러한 물질은 통상 최종제품의 0.5-10 중량%, 바람직하게는 1-5 중량%으로 가해진다.

과산화수소 방출제가, 과가수분해되어 활성 표백종으로서 과산을 형성하여 개선된 표백 효과를 이끄는 테트라아세틸렌디아민 (TAED), 노나노일옥시벤젠술폰산염 (NOBS, US 4,412,934에 기술됨), 3,5-트리메틸-핵사놀옥시벤젠술폰산염 (ISONOBS, EP 120 591에 기술됨) 또는 펜타아세틸글루코오스 (PAG) 등의 표백제와 조합하여 사용될 수 있다. 게다가, 표백 활성제 C8(6-옥탄아미도-카프로일) 옥시벤젠-술폰산염, C9(6-노난아미도 카프로일) 옥시벤젠술폰산염 및 C10(6-데칸아미도 카프로일) 옥시벤젠술폰산염 또는 그 혼합물이 매우 적당하다. 또한 적당한 활성제는 유럽 특허 출원 제 91870207.7호에 개시된 것과 같은 아실화 시트레이트 에스테르이다.

본 발명에 따라 세척 조성물에 사용을 위한 퍼옥시산을 포함하는 유용한 표백제, 및 표백 활성제 및 과산화수소 표백제 화합물을 포함하는 표백제 시스템이 출원 USSN 08/136,626에 기술된다.

과산화수소는 초기에 또는 세척 및/또는 행궁 과정에서 과산화수소를 발생시킬 수 있는 효소시스템(즉, 효소 및 그것을 위한 기질)을 가하여 존재할 수도 있다. 그러한 효소시스템은 유럽 특허 출원 EP 0 537 381에 개시된다.

산소 표백제외의 표백제가 또한 당해 분야에 알려지고 여기에 이용될 수 있다. 특별한 관심의 비산소 표백제의 한 유형은 술폰화 아연 및/또는 알루미늄 프탈로시아닌 등의 광활성 표백제를 포함한다. 이들 물질은 세척 과정 중에 기질에 침적될 수 있다. 일광에서 건조하기 위해 옷을 바깥에 너는 것과 같이 산소의 존재하에 빛을 조사시, 술폰화 아연 프탈로시아닌은 활성화되고, 결국, 기질은 표백된다. 바람직한 아연 프탈로시아닌 및 광활성 표백 과정은 US 4,033,718에 기술된다. 전형적으로, 세척 조성물은 술폰화 아연 프탈로시아닌의 약 0.025 중량% 내지 약 1.25 중량%를 포함할 것이다.

표백제는 또한 망간 촉매를 포함할 수 있다. 망간 촉매, 예컨대 "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching" (Nature 369, 1994, pp. 637-639)에 기술된 화합물 중 하나일 수 있다.

담금 억제제: 다른 선택적 성분은 담금 억제제, 예컨대 실리콘 및 실리카-실리콘 혼합물이다. 실리콘은 일반적으로 알킬화 폴리실록산 물질로 대표될 수 있으며, 실리카는 통상 실리카 에어로겔 및 크세로겔 및 여러 유형의 소수성 실리카로 예시되는 미세하게 분할된 형태로 사용된다. 이러한 물질은 미립자로 혼합될 수 있으며, 담금 억제제는 수용성 또는 수분산성, 본질적으로 비표면활성 세제 불투과성 담체내에 유리하게 방출가능하게 포함된다. 다르게는 담금 억제제는 액체 담체내에서 용해 또는 분산될 수 있으며 하나 이상의 다른 성분상에 분무에 의해 적용될 수 있다.

바람직한 실리콘 담금 조절제는 US 3,933,672에 개시된다. 다른 특히 유용한 담금 억제제는 독일 특허 출원 DTOS 2,646,126에 기술된 자기 유화형 실리콘 담금 억제제이다. 그러한 화합물의 예는 DC-544로서, DOW Corning으로부터 상업적으로 이용가능한, 실록산-글리콜 공중합체이다. 특히 바람직한 담금 조절제는 실리콘 오일 및 2-알킬-알카놀의 혼합물을 포함하는 담금 억제제 시스템이다. 적당한 2-알킬-알카놀은 상표 Isofol 12 R로 상업적으로 이용가능한 2-부틸-옥타놀이다.

그러한 담금 억제제 시스템은 유럽 특허 출원 EP 0 593 841에 기술된다.

특히 바람직한 실리콘 담금 조절제는 유럽 특허 출원 제 92201649.8호에 기술된다. 상기 조성물은 Aerosil[®] 등의 폼드 비다공성 실리카와 조합하여 실리콘/실리카 혼합물을 포함할 수 있다.

상기의 담금 억제제는 통상 조성물의 0.001 중량% 내지 2 중량%, 바람직하게는 0.01 중량% 내지 1 중량%의 수준으로 사용된다.

다른 성분: 세척 조성물에 사용되는 다른 성분으로 때-현탁화제, 때-방출제, 광학적 증백제, 연마제, 살균제, 변색 억제제, 착색제, 및/또는 캡슐형 또는 비캡슐형 향료 등이 사용될 수 있다.

특히 적당한 캡슐형 물질은 수용성 캡슐로서, GB 1,464,616에 기술된 것과 같은 다당류 및 폴리히드록시 화합물로 구성된 수용성 캡슐이다.

다른 적당한 수용성 캡슐형 물질은 US 3,455,838에 기술된 것과 같은 치환 디카르복실산의 비젤라틴화 전분산 에스테르로부터 유도된 맥스트린을 포함한다. 이들 산-에스테르 맥스트린은, 바람직하게, 왁스 옥수수, 왁스 수수, 사고, 타피오카 및 감자 등의 전분으로부터 제조된다. 상기 캡슐형 물질의 적당한 예는 National Starch에 의해 제조된 N-LOK을 포함한다. N-Lok 캡슐형 재료는 변형된 옥수수 전분 및 포도당으로 구성된다. 전분은 옥테닐 숙신산 무수물 등의 단일작용 치환기를 가하여 변형된다.

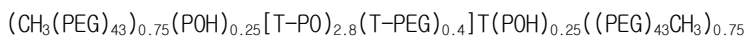
여기에 적당한 재침적억제 및 도양 현탁화제는 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 및 히드록시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스 유도체, 및 동- 또는 공중합체 폴리카르복실산 또는 그 염을 포함한다. 이러한 유형의 중합체는 빌더로서 전술한 폴리아크릴산염 및 말레산 무수물-아크릴산 공중합체뿐만 아니라 에틸렌, 메틸비닐 에테르 또는 메타크릴산과 말레산 무수물의 공중합체를 포함하며, 말레산 무수물은

공중합체의 적어도 20 몰 퍼센트를 구성한다. 이들 물질은 통상 조성물의 0.5 중량% 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.75 중량% 내지 8 중량%, 가장 바람직하게는 1 중량% 내지 6 중량%의 수준으로 사용된다.

바람직한 광학적 증백제는 음이온성을 특징으로 하고, 그 예는 디소디움 4,4'-비스-(2-디에탄올아미노-4-아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2:2'-디술포네이트, 디소디움 4,-4'-비스-(2-모폴리노-4-아닐리노-s-트리아진-6-일아미노-스틸벤-2:2'-디술포네이트, 디소디움 4, 4'-비스-(2,4-디아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2:2'-디술포네이트, 모노소디움 4', 4"-비스-(2,4-디아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2-술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(2-아닐리노-4-(N-메틸-N-2-히드록시에틸아미노)-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2,2'-디술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(4-페닐-2,1,3-트리아졸-2-일)-스틸벤-2,2'-디술포네이트, 디소디움 4,4'-비스(2-아닐리노-4-(1-메틸-2-히드록시에틸아미노)-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2,2'-디술포네이트, 소디움 2 (스틸빌-4"-(나프토-1', 2':4,5)-1,2,3,-트리아졸-2"-술포네이트 및 4,4'-비스(2-술포스티릴)비페닐이다.

다른 유용한 중합체 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 특히 1000-10000의, 더욱 특히 2000 내지 8000의 그리고 가장 바람직하게는 약 4000의 분자량의 것이다. 이들은 0.20 중량% 내지 5 중량%, 더욱 바람직하게는 0.25 중량% 내지 2.5 중량%의 수준으로 사용된다. 이들 중합체 및 전술한 동- 또는 공중합체 폴리카복실산염이 전이금속 불순물의 존재하에 진흙의, 단백질성 및 산화성 때에 대한 순백 유지, 직물 재 침적, 및 세탁 성능을 개선하는 데 유용하다.

본 발명의 조성물에 사용되는 때 방출제는 통상 다양한 배열의 에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 글리콜 단위와 테레프탈산의 공중합체 또는 삼합체이다. 그러한 중합체의 예는 US 4,116,885 및 4,711,730 및 EP 0 272 033에 개시된다. EP 0 272 033에 따라 특히 바람직한 중합체는 화학식:



을 가지며, 여기서 PEG는 $-(OC_2H_4)_n-$ 이고, PO는 (OC_3H_6O) 이고 T는 $(POOC_6H_4CO)$ 이다.

또한 디메틸 테레프탈레이트, 디메틸 술포이소프탈레이트, 에틸렌 글리콜 및 1,2-프로판디올의 랜덤 공중합체로서 변형된 폴리에스테르가 매우 유용하며, 말단기는 주로 술포벤조산염 그리고 2차적으로 에틸렌 글리콜 및/또는 1,2-프로판디올의 모노에스테르로 구성된다. 목표는 상기 중합체의 대부분이 술포벤조산염 기에 의해 말단캡핑될 현 상황에서 "주로" 술포벤조산염 기에 의해 양 말단에 캡핑된 중합체를 얻는 것이다. 하지만, 상당한 공중합체는 완전한 캡핑되지는 않으며, 따라서 그 말단기는 그러한 중으로 "2차적으로" 구성되는, 에틸렌 글리콜 및/또는 1,2-프로판디올의 모노에스테르를 포함할 수 있다.

여기에 선택된 폴리에스테르는 디메틸 테레프탈산의 약 46 중량%, 1,2-프로판디올의 약 16 중량%, 에틸렌 글리콜의 약 10 중량%, 디메틸 술포벤조산의 약 13 중량% 및 술포이소프탈산의 약 15 중량%를 포함하며, 약 3,000의 분자량을 갖는다. 폴리에스테르 및 그 제조방법은 EP 311 342에 상세히 기술된다.

연화제: 직물 연화제가 또한 본 발명에 따른 세탁용 세제 조성물에 포함될 수 있다. 이들 약제는 무기 또는 유기 형태일 수 있다. 무기 연화제는 GB-A-1 400898 및 US 5,019,292에 개시되는 스택타이트 진흙을 예로 한다. 유기 직물 연화제는 GB-A1 514 276 및 EP 0 011 340에 개시되는 불수용성 삼합체 아민 및 EP-B-0 026 528에 개시되는 모노 C₁₂-C₁₄ 4차 암모늄 염과의 조합 및 EP 0 242 919에 개시되는 이-장쇄 아미드를 포함한다. 직물 연화제의 다른 유용한 유기 성분은 EP 0 299 575 및 0 313 146에 개시되는 고분자량 폴리에틸렌 옥사이드 물질을 포함한다.

스택타이트 진흙의 수준은 제형의 나머지에 건조 혼합 성분으로서 가해지는 재료로써 통상적으로 5 중량% 내지 15 중량%, 더욱 바람직하게는 8 중량% 내지 12 중량%의 범위에 있다. 불수용성 3차 아민 또는 이-장쇄 아미드 물질 등의 유기 직물 연화제는 0.5 중량% 내지 5 중량%, 통상적으로 1 중량% 내지 3 중량%의 수준으로 포함되며, 고분자량 폴리에틸렌 옥사이드 물질 및 수용성 양이온 물질은 0.1 중량% 내지 2 중량%, 통상적으로 0.15 중량% 내지 1.5 중량%의 수준으로 가해진다. 이들 물질은, 어떤 경우에는, 조성물의 다른 고형 성분상에 건조혼합 미립자로서 가해지거나, 또는 용해액으로서 분무되는 것이 더욱 편리할 수도 있지만, 통상적으로 조성물의 분무 건조 부분에 가해진다.

중합체 염료-전이 억제제: 본 발명에 따른 세제 조성물은 또한 중합체 염료-전이 억제제의 0.001 중량% 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.01 중량% 내지 2 중량%, 더욱 바람직하게는 0.05 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다. 상기 중합체 염료-전이 억제제는 통상적으로 세제 조성물에 포함되어 착색 직물로부터 함께 세탁되는 직물상으로의 염료의 전이를 억제한다. 이들 중합체는 염색 직물로부터 씻겨져 분리된 염료를 그 염료가 세탁 중의 다른 물품에 부착될 기회를 갖기 전에 착체형성 또는 흡착하는 능력을 가진다.

특히 적당한 중합체 염료-전이 억제제는 폴리아민 N-옥시드 중합체, N-비닐-피롤리돈 및 N-비닐이미다졸의 공중합체, 폴리비닐피롤리돈 중합체, 폴리비닐옥사졸리돈 및 폴리비닐이미다졸 또는 그 혼합물이다.

그러한 중합체의 부가는 또한 본 발명에 따른 효소의 성능을 향상시킨다.

본 발명에 따른 세제 조성물은 액체, 페이스트, 겔, 막대기모양 또는 입자형일 수 있다.

비더스팅 입자가 예컨대 US 4,106,991 및 4,661,452 (모두 Novo Industri A/S의 소유)에 개시된 대로 제조될 수 있고, 선택적으로 당해 분야에 알려진 방법에 의해 코팅될 수 있다. 왁스 코팅 물질의 예는 1000 내지 20000의 평균분자량을 갖는 폴리(에틸렌 옥사이드) 생성물 (폴리에틸렌글리콜, PEG); 16 내지 50 에틸렌 옥사이드 단위를 갖는 에톡실화 노닐페놀; 알코올이 12 내지 20 탄소 원자를 포함하고 15 내지 80 에틸렌 옥사이드 단위가 존재하는 에톡실화 지방 알코올; 지방산; 그리고 지방산의 모노- 및 디- 및 - 트리글리세리드이다. 유체 베드 기술에 의한 적용에 적당한 막형성 코팅 물질의 예는 GB 1483591에 주어진다.

본 발명에 따른 입상 조성물은 또한 "콤팩트 형태"로 존재할 수 있어, 즉 통상적인 입상 세제보다 비교적 고밀도를 가져, 즉 550 내지 950 g/l을 형성할 수 있고; 그러한 경우에, 본 발명에 따른 입상 세제 조성물은 통상적인 입상 세제와 비교되는, 더 작은 양의 "무기 충전재 염"을 포함할 것이고; 전형적인 충전재 염은 황산염 및 염산염의 알칼리도 금속염, 전형적으로 황산나트륨이고; "콤팩트한" 세제는 전형적으로 최대 10%의 충전재 염을 포함한다. 본 발명에 따른 액체 조성물은 또한 "농축된 형태"로 존재할 수 있고, 그러한 경우에, 본 발명에 따른 액체 세제 조성물은 통상적인 액체 세제와 비교되는, 더 작은 양의 물을 포함할 것이다. 전형적으로 농축 액체 세제의 수분 함량은 세제 조성물의 30 중량%이하, 더욱 바람직하게는 20 중량%이하, 가장 바람직하게는 10 중량%이하이다.

본 발명의 조성물은 예컨대 세탁물 첨가 조성물 및 얼룩진 직물의 예비처리에의 사용에 적당한 조성물을 포함하는 손 및 기계 세탁 세제 조성물, 행궁 첨가용 직물 연화제 조성물, 및 일반 가구의 단단한 바닥 청소 작업 및 설거기 작업에의 사용을 위한 조성물로 제조될 수 있다.

다음의 예는 본 발명의 조성물을 예시하는 것이지만, 본 발명의 영역을 반드시 제한하거나 정의하는 것으로 반드시 의도된 것은 아니다.

세제 조성물에서, 축약된 성분 표시는 다음 의미를 갖는다:

LAS : 술폰산 선형 C₁₂ 알킬 벤젠 나트륨 (Sodium linear C₁₂ alkyl benzene sulphonate)

TAS: 황산 우지 알킬 나트륨 (Sodium tallow alkyl sulphate)

XYAS: 황산 C_{1X}-C_{1Y} 나트륨 (Sodium C_{1X}-C_{1Y} alkyl sulfate)

SS: 화학식 2-부틸 옥타논산의 2차 비누 계면활성제 (Secondary soap surfactant)

25EY: 평균 Y 몰의 에틸렌 옥사이드로 농축된 C₁₂-C₁₅ 우세 선형 1차 알코올

45EY: 평균 Y 몰의 에틸렌 옥사이드로 농축된 C₁₄-C₁₅ 우세 선형 1차 알코올

XYEZS: 몰 당 평균 Z 몰의 에틸렌 옥사이드로 농축된 C_{1X}-C_{1Y} 황산 알킬 나트륨

비이온성: BASF Gmbh에 의해 상표 Plurafax LF404로 시판되는 3.8의 평균 에톡실화도 및 4.5의 평균 프로폭실화도를 갖는 C₁₃-C₁₅ 혼합 에톡실화/프로폭실화 지방 알코올

CFAA: C₁₂-C₁₄ 알킬 N-메틸 글루카미드

TFAA: C₁₆-C₁₈ 알킬 N-메틸 글루카미드

규산염: 비정형질 규산나트륨 (SiO₂:Na₂O 비 = 2.0)

NaKS-6: 화학식 δ-Na₂Si₂O₅의 결정질 층상 규산염

탄산염: 무수 탄산 나트륨

인산염: 트리폴리인산 나트륨

MA/AA: 약 80,000의 평균 분자량의 1:4 말레산/아크릴산의 공중합체

폴리아크릴산염: BASF Gmbh에 의해 상표 PA30로 시판되는 8,000의 평균 분자량을 갖는 폴리아크릴산염 동중합체

제올라이트 A: 1 내지 10 마이크로미터의 주입자 크기를 갖는 화학식 Na₁₂(AlO₂SiO₂)₁₂.27H₂O의 수화 알루미늄규산 나트륨

시트르산염: 이수화 시트르산 트리-나트륨

Citric: 시트르산

과붕산염: 실험식 NaBO₂.H₂O₂의 무수 모노수화 과붕산 나트륨 표백제

과탄산염: 실험식 2Na₂CO₃.3H₂O₂의 무수 과탄산 나트륨 표백제

PB₄ : 무수 테트라수소화 과붕산 나트륨

TAED: 테트라아세틸 에틸렌 디아민 (Tetraacetyl ethylene diamine)

CMC: 셀룰로오스 카복시메틸 나트륨 (Sodium carboxymethyl cellulose)

DETPMP: 상표 Dequest 2060하에 Monsanto에 의해 시판되는 디에틸렌 트리아민 펜타 (메틸렌 포스폰산)

PVP: 폴리비닐피롤리돈 중합체 (Polyvinylpyrrolidone polymer)

EDDS: 나트륨염 형태의 에틸렌디아민-N,N'-디숙신산, [S,S] 이성질체

담금억제제: 25% 파라핀 왁스, 융점 50°C, 17% 소수성 실리카, 58% 억제제: 파라핀 오일

입상 담금억제제: 12% 실리콘/실리카, 18% 스테아릴 알코올, 70% 억제제: 입상 전분

황산염: 무수 황산나트륨

HMWPE0: 고분자량 폴리에틸렌 옥사이드(High molecular weight polyethylene oxide)

TAE 25: 우지 알코올 에톡실산염 (25) (Tallow alcohol ethoxylate)

세제 예 I

본 발명에 따라 입상의 직물 세탁 조성물은 다음에 따라 제조될 수 있다:

술폰산 벤젠 선형 C ₁₂ 알킬 나트륨	6.5
황산 나트륨	15.0
제올라이트 A	26.0
니트릴로트리아세트산 나트륨	5.0
본 발명의 효소	0.1
PVP	0.5
TAED	3.0
붕산	4.0
과붕산	18.0
술폰산 페놀	0.1
기타	100%까지

세제 예 II

본 발명에 따라 콤팩트한 입상의 직물 세탁 조성물 (밀도 800 g/l)은 다음과 같이 제조될 수 있다:

45AS	8.0
25E3S	2.0
25E5	3.0
25E3	3.0
TFAA	2.5
제올라이트 A	17.0
NaSKS-6	12.0
시트르산	3.0
탄산염	7.0
MA/AA	5.0
CMC	0.4
본 발명의 효소	0.1
TAED	6.0
과탄산염	22.0
EDDS	0.3
입상 담금 억제제	3.5
물/기타	100%까지

세제 예 III

특히 착색 직물의 세탁에 유용한 본 발명에 따른 입상의 직물 세탁 조성물은 다음과 같다:

	I	II
LAS	10.7	-
TAS	2.4	-
TFAA	-	4.0
45AS	3.1	10.0
45E7	4.0	-
25E3S	-	3.0
68E11	1.8	-

25E5	-	8.0
시트르산염	15.0	7.0
탄산염	-	10
시트르산	2.5	3.0
제올라이트 A	32.1	25.0
Na-SKS-6	-	9.0
MA/AA	5.0	5.0
DETPMP	0.2	0.8
본 발명의 효소	0.10	0.05
규산염	2.5	-
황산염	5.2	3.0
PVP	0.5	-
비닐이미다졸 및 비닐피롤리돈의 폴리 (4- 비닐피리딘)-N-옥사이드/공중합체	-	0.2
과붕산염	1.0	-
술폰산 페놀	0.2	-
물/미량	100%를 채우는 양	

세제 예 IV

"세탁을 통한 연화" 특성을 제공하는 본 발명에 따른 입상의 직물 세탁 조성물은 다음과 같이 제조될 수 있다:

	I	II
45AS	-	10.0
LAS	7.6	-
68AS	1.3	-
45E7	4.0	-
25E3	-	5.0
연화 코코-알킬-	1.4	1.0
디메틸 히드록시-		
에틸 암모늄		
시트르산염	5.0	3.0
Na-SKS-6	-	11.0
제올라이트 A	15.0	15.0
MA/AA	4.0	4.0
DETPMP	0.4	0.4
과붕산염	15.0	-
과탄산염	-	15.0
TAED	5.0	5.0
스멕타이트 진흙	10.0	10.0
HMWPEO	-	0.1
본 발명의 효소	0.10	0.05
규산염	3.0	5.0
탄산염	10.0	10.0
입상 담금 억제제	1.0	4.0
CMC	0.2	0.1

물/기타	100%까지	
세제 예 V		
본 발명에 따른 강력한 액체의 직물 세탁 조성물이 다음과 같이 제조될 수 있다:		
	I	II
LAS 산 형태	-	25.0
시트르산	5.0	2.0
25AS 산 형태	8.0	-
25AE2S 산 형태	3.0	-
25AE7	8.0	-
CFAA	5	-
DETPMP	1.0	1.0
지방산	8	-
올레산	-	1.0
에탄올	4.0	6.0
프로판디올	2.0	6.0
본 발명의 효소	0.10	0.05
염화 코코-알킬 디메틸	-	3.0
히드록시 에틸 암모늄		
스멕타이트 진흙	-	5.0
PVP	2.0	-
물/기타	100%까지	

피혁 산업에의 이용

본 발명의 서브틸라아제는 피혁 산업에서, 특히 피혁의 탈모에 사용될 수 있다.

상기 이용에서 본 발명의 서브틸라아제 변이체는 다른 프로테아제를 더 포함하는 효소 조성물에 바람직하게 사용된다.

적당한 다른 프로테아제의 더욱 상세한 설명을 위해선 세제 조성물에서 사용을 위한 적당한 효소에 관한 절(전술한)을 참조하라.

양모 산업에의 이용

본 발명의 서브틸라아제가 양모 산업, 특히 양모를 포함하는 의복의 세탁에서의 사용법을 위해 사용될 수 있다.

상기 이용에서 본 발명의 서브틸라아제 변이체는 다른 프로테아제를 더 포함하는 효소 조성물에 사용됨이 바람직하다.

적당한 다른 프로테아제의 더욱 상세한 설명을 위해선 세제 조성물에서 사용을 위한 적당한 효소에 관한 절(전술한)을 참조하라.

본 발명은 결코 청구한 발명의 영역을 제한하기 위한 것이 아닌 다음의 실시예에서 더욱 상세히 기술된다.

재료와 방법

균주:

B. subtilis DN1885 (Diderichsen et al., 1990).

B. lentus 309 및 147은, NCIB에 기탁되고 승인된 수납 번호 NCIB 10309 및 10147의, 여기에 참고로 포함된 미국 특허 제 3,723,250호에 기술되는, *Bacillus lentus*의 특정 균주이다.

E. coli MC 1000 (M.J. Casadaban and S.N. Cohen (1980); *J. Mol. Biol.* 138 179-207)이 통상적인 방법에 의해 r-, m+로 만들어졌고 미국 특허 출원 일련번호 제 039,298호에 또한 기술된다.

플라스미드:

pJS3: 서브틸라아제 309를 암호화한 합성 유전자를 함유하는 *E. coli* - *B. subtilis* 셔틀 벡터. (Jacob Schiodt et al., *Protein and Peptide letters* 3:39-44 (1996)에 기술됨)

pSX222: *B. subtilis* 발현 벡터 (WO 96/34946에 기술됨).

일반 분자생물학적 방법:

그 밖에 다른 언급이 없는 한 DNA 조작 및 형질전환이 분자생물학의 표준 방법을 사용하여 실행되었다(Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

DNA 조작을 위한 효소가 공급자의 설명서에 따라 사용되었다.

DNA 조작을 위한 효소

그 밖에 다른 언급이 없는 한, 예컨대 제한 엔도뉴클레아제, 리가아제 등의 DNA 조작을 위한 모든 효소가 New England Biolabs, Inc로부터 얻어진다.

단백질분해 활동

본 발명의 배경에서 단백질분해 활동은 킬로 NOVO 프로테아제 단위 (KNPU)로 표현된다. 활동은 표준 효소 (SAVINASE0)에 대해 상대적으로 측정되고, 측정은 표준 상태, 즉 50°C, pH 8.3, 9 분의 반응시간, 3 분의 측정시간에서의 단백질분해 효소에 의한 디메틸 카제인 (DMC)의 소화에 기초한다. 폴더 AF 220/1은 Novo Nordisk A/S, Denmark에 대해 청구하면 이용가능하며, 그 폴더는 여기에 참고로 포함된다.

GU는 단백질분해 효소 활동으로 정의된 글리신 단위로서, 표준상태하에서, 기질로서의 N-아세틸 카제인과 함께 40°C에서 15분의 배양 동안 글리신 1 mmole에 대등한 양의 NH₂기를 생성한다.

효소 활동은 또한 가용성 기질 속신일-알라닌-알라닌-프롤린-페닐-알라닌-파라-니트로페놀과의 반응에 따라, PNA 분석법을 사용하여 측정될 수 있으며, 이는 Journal of American Oil Chemists Society (Rothgeb, T.M., Goodlander, B.D., Garrison, P.H., and Smith, L.A., (1998))에 기술된다.

발효:

서브틸라아제 효소의 발효는 5일 동안 BPX 100 ml를 함유하는 500 ml 배플형 엘렌마이어 플라스크에서 회전 진탕기 (300 r.p.m)상에서 30°C에서 실행되었다.

따라서 예컨대 2 리터의 육즙을 만들기 위해 20개의 엘렌마이어 플라스크가 동시에 발효되었다.

배지:

BPX: 조성물 (1 리터 당)

감자 전분	100g
빨은 보리	50g
대두 분	20g
Na ₂ HPO ₄ X 12 H ₂ O	9g
플루론	0.1g
카제인산 나트륨	10g

배지내의 전분은 α-아밀라아제로 액화되고 그 배지는 45 분 동안 120°C에서 가열하여 살균된다. 살균 후 배지의 pH는 0.1 M까지의 NaHCO₃의 첨가에 의해 9로 조절된다.

실시예

실시예 1

효소 변이체의 제작 및 발현:

부위-지시 돌연변이 유발:

서브틸라아제 309 부위-지시 변이체는 Deng et al., (Anal. Biochem. 200:81-88 (1992)) 및 Markvardsen et al.(BioTechniques 18(3):371-372 (1995))에 의해 각각 기술된 "특이 부위 삭제(USE)" 또는 "우라실-USE" 기술에 의해 만들어졌다.

주형 플라스미드는 pJS3, 또는 서브틸라아제 309의 변이체를 포함하는 이것의 유사체이며, 예컨대 USE 돌연변이 유발은 T251 변이체의 제작을 지시하는 올리고뉴클레오티드와 함께 N252L 변이체를 암호화한 유전자를 포함하는 pJS3 유사체상에서 실행되어 최종적으로 N252L+T251 서브틸라아제 309 변이체의 결과를 낳는다.

pJS3 제작 서브틸라아제 309 변이체는 그 다음 제한효소 KpnI 및 MluI를 사용하여, B.subtilis pSX222 발현 플라스미드내로 부클로닝되었다.

국지화 무작위 돌연변이 유발:

국지화 무작위 돌연변이 유발을 실행하기 위해 사용된 전체 계획은 다음과 같다:

돌연변이될 아미노산 코돈에 대응하는 뉴클레오티드를 제하고는 돌연변이될 DNA 서열의 부분에 대응하는 돌연변이 유발 프라이머(올리고뉴클레오티드)가 합성되었다.

이어서, 결과의 돌연변이 유발 프라이머는 적당한 대향 프라이머와 함께 PCR 반응에서 사용되었다. 결과

의 PCR 단편이 정제되고 요약되어 E.coli-B.subtilis 서를 벡터내로 클로닝되었다.

다르게는 필요하다면, 결과의 PCR 단편은 제 2 차 적당한 대향 프라이머와 함께 프라이머로서 제 2 차 PCR 반응에서 사용되어 돌연변이된 영역의 요약 및 서를 벡터내로의 클로닝을 하게 한다. PCR 반응은 정상조건하에서 실행된다.

다음의 이러한 계획의 국지화 무작위 라이브러리는 V95, G97 및 A98 위치가 완전히 무작위화된 SAVINASE 에서 제작된다.

하나의 올리고뉴클레오티드가 돌연변이되기 원하는 아미노산 코돈의 제 1 번 및 제 2 번 염기에서 각각 25 %의 4개의 염기(N)로 합성되었다. 코돈에서 제 3 차 뉴클레오티드(동요 염기)는 3개의 종결코돈 중 2 개 (TAA, TGA)를 피하기 위해 50% G/50% C로 합성되었다.

돌연변이 유발 프라이머(5'-C TTC TGC GTT AAC AAG TCC GCT TCC ATA CAA GTT CGT SNN TCC TAA ACT SNN TGC CGT SNN CTT TAG ATG ATT-3'(안티센스))가 적당한 대향 프라이머(예컨대 5' GAA CTC GAT CCA GCG ATT TC 3' (센스))와 주형으로서 플라스미드 pJS3와의 PCR 반응에서 사용되었다. 이 결과의 PCR 생성물은 제한효소 XhoI 및 HpaI를 사용하여 pJS3 서를 벡터내로 클로닝되었다.

pJ3 제작 국지화 무작위 라이브러리는 그 다음 제한효소 KpnI 및 MluI를 사용하여, B.subtilis pSX222 발현 플라스미드내로 부클로닝되었다.

제작된 라이브러리는 약 100,000 개별 클론/라이브러리를 포함한다.

10개의 무작위로 선택된 콜로니를 계획한 돌연변이를 확인하기 위해 배열하였다.

본 발명의 서브틸라아제 변이체를 정제하기 위해 본 발명의 변이체를 포함하는 B.subtilis pSX222 발현 플라스미드를 적격의 B. subtilis 균주내로 형질전환시키고 10 µg/ml 클로람페니콜 (CAM)을 함유하는 배지내에서 발효되었다.

실시예 2

효소 변이체의 정제:

본 방법은 서브틸리신 147 효소, 서브틸리신 309 효소 또는 그 돌연변이체의 2 리터 규모의 발효의 정제에 관한 것이다.

발효 고기집 약 1.6 리터를 1 리터 비이커내에서 35 분 동안 5000 rpm에서 원심분리시켰다. 상층액을 10% 아세트산을 사용하여 pH 6.5로 조절하고 Seitz Supra S100 필터 플레이트 상에서 여과시켰다.

여과물을 Amicon S1Y10 UF 카트리지를 갖춘 Amicon CH2A UF 유닛을 사용하여 약 400 ml로 농축시켰다. UF 농축액을 원심분리하고 여과한 후 pH 7에서 바시트라신 친수성 컬럼상에서 실온에서 흡수시켰다. 프로테아제를 pH 7로 조절된 0.01 M 디메틸글루타르산, 0.1 M 붕산 및 0.002 M 염화칼슘의 완충액 중 25% 2-프로판올 및 1 M 염화나트륨을 사용하여 실온에서 바시트라신 컬럼으로부터 용리하였다.

바시트라신 정제 단계로부터의 프로테아제 활동을 갖는 분류가 pH 6.5로 조절된 0.01 M 디메틸글루타르산, 0.2 M 붕산 및 0.002 M 염화칼슘을 함유하는 완충액으로 평형된 750 ml의 Sephadex G25 컬럼 (5 cm 직경)에 조합 적용되었다.

Sephadex G25 컬럼으로부터 단백질분해 활동을 갖는 분류가 pH 6.5로 조절된 0.01 M 디메틸글루타르산, 0.2 M 붕산 및 0.002 M 염화칼슘을 함유하는 완충액으로 평형된 150 ml의 CM Sepharose CL 6B 양이온 교환 컬럼 (5 cm 직경)에 조합 적용되었다.

프로테아제를 동일한 완충액 (서브틸리신 147의 경우에는 0-0.2 M 염화나트륨) 2 리터 중 0-0.1 M 염화나트륨의 선형 구배를 사용하여 용리하였다.

최종 정제 단계에서 CM Sepharose 컬럼으로부터의 분류를 함유하는 프로테아제는 GR81PP 막(Danish Sugar Factories Inc.제)을 갖춘 Amicon 초여과 셀에서 조합 농축되었다.

제작 및 상기 분리 과정을 위한 실시예 1의 기술을 사용하여 다음의 서브틸리신 309 변이체:

N252L+T255I

N252V+T255A

N252M+T255C+S259H

N252S+T255E+S259C; 및

N252K+T255S+S259C

가 생성되고 분리되었다.

실시예 3

효소 변이체를 포함하는 세제 조성물의 세탁 성능

다음의 예는 표시된 조건하에서 실행된 많은 세탁 시험으로부터의 결과를 제공한다.

실험 조건

[표 4]

서브틸리신 309 변이체의 평가를 위한 실험조건

세제	프로테아제 모델 세제 95
세제 투여량	3.0 g/l
pH	10.5
세탁 시간	15 분
온도	15℃
물의 경도	6. dH
효소	이하에 수록된 서브틸리신 309 변이체
효소 농도	10 nM
시험 시스템	150 ml 유리 비이커와 휘젓기용 막대
직물/부피	50 ml 세제 중 5 직물 조각 (Φ2.5cm)
시험 재료	EMPA117, Center for Testmaterials, Holland

사용되는 세제는 단순 모델 제형이다. pH는 분말 세제를 위한 통상의 범위내인 10.5로 조절되었다. 모델 세제 95의 조성물은 다음과 같다:

25% STP (Na₅P₃O₁₀)

25% Na₂SO₄

10% Na₂CO₃

20% LAS (Nansa 80S)

5.0% 비이온성 텐시드 (Dobanol 25-7)

5.0% Na₂Si₂O₅

0.5% 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC)

9.5% 물

물의 경도는 탈이온수에 CaCl₂ 및 MgCl₂ (Ca²⁺:Mg²⁺ = 2:1)을 첨가하여 조절되었다(참조: Surfactants in Consumer Products - Theory, Technology and Application, Springer Verlag 1986). 세제 용액의 pH는 HCl을 첨가하여 pH 10.5까지 조절되었다.

시험 재료상의 반사율 (R) 측정을 Macbeth Coloreye 7000 광도계 (Macbeth, Division of Kollmorgen Instruments Corporation, Germany)를 사용하여 460 nm에서 행하였다. 측정은 제작자의 프로토콜에 따라 이루어졌다.

서브틸리신 309 변이체의 세탁 성능은 성능 인자:

$$P = \frac{R_{\text{변이체}} - R_{\text{효소없는}}}{R_{\text{Savinase}} - R_{\text{효소없는}}}$$

를 산출하여 평가되었다.

P: 성능 인자

R_{변이체}: 변이체로 세탁한 시험 재료의 반사율

R_{Savinase}: Savinase[®]로 세탁한 시험 재료의 반사율

R_{효소없는}: 효소없이 세탁한 시험 재료의 반사율

모든 청구된 서브틸리신 309 변이체가 Savinase[®]와 비교하여 개선된 세탁 성능, 즉 P > 1을 가졌다.

변이체는 대문자로 표시된 개선 등급으로 세분된다.

A 등급: 1 < P ≤ 1.5

B 등급: 1.5 < P ≤ 2

C 등급: P > 2

[표 5]

서브틸리신 309 변이체 및 개선 등급

개선 등급	변이체
A	N252L+T255I N252V+T255AN252M+T255C+S259HN252S+T255E+S259CN252K+T255S+S259C
B	
C	

(57) 청구의 범위

청구항 1

252, 255 및/또는 259 번 위치(BASBPN 넘버링에서)에서의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 세제에서 개선된 세탁 성능을 갖는 서브틸라아제 효소 변이체

청구항 2

252L+255I

252V+255A

252M+255C+259H

252S+255E+259C

252K+255S+259C

(BASBPN 넘버링에서)을 포함하는 군에서 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 세제에서 개선된 세탁 성능을 갖는 것을 서브틸라아제 효소 변이체 또는

상기 변이체중 어느 하나에서 하나 이상의 보존적 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 변이체(예컨대, 252L(소수성 아미노산)+255I 변이체의 보존적 변형은 252I(소수성 아미노산)+255I, 및 252V(소수성 아미노산)+255I 등의 변이체를 포함함).

청구항 3

제 2 항에 있어서, 변형이

N252L+T255I

N252V+T255A

N252M+T255C+S259H

N252S+T255E+S259C

N252K+T255S+S259C

(BASBPN 넘버링에서)을 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 서브틸라아제 효소 변이체 또는

상기 변이체중 어느 하나에서 하나 이상의 보존적 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 변이체(예컨대, N252L(소수성 아미노산)+T255I 변이체의 보존적 변형은 N252I(소수성 아미노산)+T255I, 및 N252V(소수성 아미노산)+T255I 등의 변이체를 포함함).

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 어버이 서브틸라아제가 하위 군 I-S1으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 어버이 서브틸라아제가 ABSS168, BASBPN, BSSDY, 및 BLSCAR 또는 하위군 I-S1의 특성을 보유하는 그 작용 변이체를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 어버이 서브틸라아제가 하위 군 I-S2로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 어버이 서브틸라아제가 BLS147, BLS309, BAPB92, TVTHER 및 BYSYAB 또는 하위군 I-S2의 특성을 보유하는 그 작용 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 8

상기 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 임의의 다른 위치에서의 하나 이상의 변형과 조합되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 변형이 27, 36, 57, 76, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 206, 218, 222, 224, 235 및 274 번 위치 중 하나 이상에서의 변형과 조합되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 서브틸라아제가 I-S2 하위군에 속하고 상기 다른 변형이 K27R, *36D, S57P, N76D, G97N, S101G, V104A, V104N, V104Y, H120D, N123S, Y167A, Y167I, R170S, R170L, R170N, Q206E, N218S, M222S, M222A, T224S, K235L, 및 T274A를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에서 언급된 치환, 결실 및/또는 삽입 중 어느 하나 이상과 조합하여, 변이체 V104+S101G, K27R+V104Y+N123S+T274A, 또는 N76D+V104A, 또는 이들 돌연 변이체(V104N, S101G, K27R, V104Y, N123S, T274A, N76D, V104A)들의 다른 조합 중의 어느 하나를 포함하는 변이체.

청구항 12

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 129, 131, 133 및 194 번 위치 중 하나 이상에서의 변형과 조합하는 것을 특징으로 하는 서브틸라아제 변이체.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 서브틸라아제가 I-S2 하위군에 속하고 상기 다른 변형이 P129K, P131H, A133P, A133D 및 A194P를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변이체.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 서브틸라아제 변이체를 암호화한 것을 특징으로 하는 분리된 DNA 서열.

청구항 15

제 14 항의 분리된 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 16

제 15 항의 발현 벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 미생물 숙주 세포.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 박테리아, 바람직하게 바실러스, 특히 B. lentus인 것을 특징으로 하는 미생물 숙주.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 균류 또는 효모, 바람직하게는 섬유모양의 균류, 특히 아스페르길스인 것을 특징으로 하는 미생물 숙주.

청구항 19

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항의 숙주가 상기 변이체의 발현 및 분비에 대해 전도성 조건하에 배양되고, 그 변이체가 회수되는 것을 특징으로 하는 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 변이체의 제조방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 서브틸라아제 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 부가적으로 셀룰라아제, 리파아제, 쿠티나아제, 옥시도리덕타아제, 다른 프로테아제, 또는 아밀라아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서, 조성물이 세제 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 23

세탁용 및/또는 설거이용 세제에서의 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 서브틸라아제 변이체 또는 제 20 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 효소 조성물의 사용법.

청구항 24

세제에서 개선된 세탁 성능을 나타내는 프로테아제 변이체의 동정방법으로서,
아미노산(BASBPN 넘버링에서):

N252L+T255I

N252V+T255A

N252M+T255C+S259H

N252S+T255E+S259C

N252K+T255S+S259C

(BASBPN 넘버링에서)에 대응하는 하나 이상의 위치에서 서브틸라아제 효소 또는 그 프레 또는 프레프로 효소를 암호화한 DNA에서 돌연변이를 실행하는 단계;

상기 돌연변이 DNA로 바실러스 균주를 형질전환하는 단계;

그러한 프로테아제 변이체를 생성하는 균주를 선택하는 단계;

그러한 균주를 발효/성장시키는 단계;

상기 프로테아제 변이체를 회수하는 단계, 및

세제에서 개선된 세탁 성능을 시험하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로테아제 변이체의 동정 방법.

도면

도면 1a

서브틸라아제의 배열

		1		10		20		23
{BASBPN}	AQ	SVP	YGV	SQIKAPA	LH	SQGYTGS
{BLS147}	Q	TVP	WGISFINTQQ	AH	NRGIFGN
{BYSYAB}	Q	TVP	WGINRVQAPI	AQ	SRGFTGT
{BAPB92}	AQ	SVP	WGISRVOQAPA	AH	NRGLTGS
{BSSDY}	AQ	TVP	YGIPLIKADK	VQ	AQGYKGA
{TVTHER}	YTPNDPYFS	SRQ	YGPQKIQAPQ	AW	DIAE	GS
{BLSAVI}	AQ	SVP	WGISRVOQAPA	AH	NRGLTGS
{BSISP1}	MNGEIRLIPY	VTNEQIMDVN	ELP	EGIKVIKAPK	MW	AKGVK GK	
{BSEPR}	SDGTDSDN	FEQ	WNLEPIQVKQ	AW	KAGLTGK	
{JP170}	LRGLEQIAQY	ATNNDVLYVT	PKPEYEV LND	VARGIVKADV	AQNNFGLY	GQ		
		30		40		50		60
{BASBPN}	NVKVAVIDSG	IDSS	HPDLK	..VAG	GASMPVSETN	...	PFQDNNS
{BLS147}	GARVAVLDTG	IAS	HPDLR	..IAG	GASFISSEP	...	SYHDNNG
{BYSYAB}	GVRVAVLDTG	ISN	HADLR	..IRG	GASFVPGEP	...	NISDNG
{BAPB92}	GVKVAVLDTG	IST	HPDLN	..IRG	GASFVPGEP	...	STQDNG
{BSSDY}	NVKVGIIDTG	IAAS	HTDLK	..VVG	GASFVSGES	...	YNTDNG
{TVTHER}	GAKIAIVDTG	VQSN	HPDLAGKVVG	GWDFVDNDS	...	TPQNG	
{BLSAVI}	GVKVAVLDTG	IST	HPDLN	..IRG	GASFVPGEP	...	STQDNG
{BSISP1}	NIKVAVLDTG	CDTS	HPDLKNQIIG	GKNFSDDDGG	KEDAI	SDYNG	
{BSEPR}	NIKIAVIDSG	ISP	HDDL	..IAG	GYSAVSYTS	...	SYKDDNG
{JP170}	GQIVAVADTG	LDTGRNDSSM	HEAFRGKITA	LYALGR	TNN	...	ANDPNG	
	70	80		90		100		110
{BASBPN}	HGTHVAGTVA	ALNN	SIGVL	GVAPSASLYA	VKVLG	ADGS	GQYSWIING	
{BLS147}	HGTHVAGTIA	ALNN	SIGVL	GVRPSADLYA	LKVL	RNGS	GSLASVAQG	
{BYSYAB}	HGTQVAGTIA	ALNN	SIGVL	GVAPNVDLYG	VKVLG	ASGS	GSISGIAQG	
{BAPB92}	HGTHVAGTIA	ALNN	SIGVL	GVAPNAELYA	VKVLG	ASGS	GSVSSIAQG	
{BSSDY}	HGTHVAGTVA	ALDN	TTGVL	GVAPNVSLYA	IKVLN	SSGS	GTYSIVSG	
{TVTHER}	HGTHCAGIAA	AVTNN	STGIA	GTAPKASILA	VRVLD	NSGS	GTWTAVANG	
{BLSAVI}	HGTHVAGTIA	ALNN	SIGVL	GVAPSAELYA	VKVLG	ASGS	GSVSSIAQG	
{BSISP1}	HGTHVAGTIA	ANDS	NGGIA	GVAPEASLLI	VKVLGG	ENGS	GQYEWIING	
{BSEPR}	HGTHVAGIIG	AKHN	GYGID	GIAPEAQIYA	VKALD	QNGS	GDLQSLIQG	
{JP170}	HGTHVAGSVL	GNAT	..N..K	GMAPQANLVF	QSIMDSGGGL	GGLPANLQTL		
	120	130		140		150		
{BASBPN}	IEWAIANNMD	VINMSLGGPS	G	..SAALKAA	VDKAVASG	V	VVAAAAGNEG	
{BLS147}	IEWAINNMH	IINMSLGSTS	G	..SSTLELA	VNRANNAG	I	LLVGAAGNTG	
{BYSYAB}	LQWAANNMGH	IANMSLGSSA	G	..SATMEQA	VNQTASG	V	LVVAASGNNG	
{BAPB92}	LEWAGNNGMH	VANLSLGSFS	P	..SATLEQA	VNSATSRG	V	LVVAASGNNG	
{BSSDY}	IEWATQNGLD	VINMSLGGPS	G	..STALKQA	VDKAYASG	I	VVAAAAGNEG	
{TVTHER}	ITYAADQGA	VISLSLGGTV	G	..NSGLQQA	VNYAWNKG	S	VVAAAAGNEG	
{BLSAVI}	LEWAGNNGMH	VANLSLGSFS	P	..SATLEQA	VNSATSRG	V	LVVAASGNNG	
{BSISP1}	INYAVEQKVD	IISMSLGGPS	D	..VPELEEA	VKNVAVNG	V	LVVCAAGNEG	
{BSEPR}	IDWSIANRMD	IVNMSLGTTS	D	..SKILHDA	VNKAYEQG	V	LVVAASGNNG	
{JP170}	FSQAYSAGAR	IHTNSWGAPV	NGAYTTDSRN	VDDYVRKNDM	TILFAAGNEG			

도면 1b

```

      160      170      180      190
      |        |        |        |
{BASBPN} TSGS.SSTVG YPGKYPSVIA VGAVD.....SSNQ RASFSSVG..
{BLS147} RQG.....VN YPARYSGVMA VAAVD.....QNGQ RASFSTYG..
{BYSYAB} AGN.....VG FPARYANAMA VGATD.....QNNN RATFSQYG..
{BAPB92} AGS.....IS YPARYANAMA VGATD.....QNNN RASFQYQG..
{BSSDY} SSGS.QNTIG YPAKYDSVIA VGAVD.....SNKN RASFSSVG..
{TVTHER} NTAPE...N. YPAYYSNAIA VASTD.....QNDN KSSFSTYG..
{BLSAVI} AGS.....IS YPARYANAMA VGATD.....QNNN RASFQYQG..
{BSISP1} DGDERTTEELS YPAAYNEVIA VGSVS.....VARE LSEFSNAN..
{BSEPR} NGKP...VN YPAAYSSVVA VSTATN.....EKNQ LASFSTTG..
{JP170} PGSG...TIS APGTAKNAIT VGATENLRPS FGSYADNINH VAQFSSRGPT

      200      210      220
      |        |        |
{BASBPN} ....PELDVM APGVSQSTL PGNK.....YGY NGTSMASPHV
{BLS147} ....PEIEIS APGVNVNSTY TGNR.....YVSL SGTSMATPHV
{BYSYAB} ....AGLDIV APGVGVQSTV PNGN.....YASF NGTSMATPHV
{BAPB92} ....AGLDIV APGVNVQSTY PGST.....YASL NGTSMATPHV
{BSSDY} ....AELEVM APGVSQSTY PSNT.....YTSL NGTSMASPHV
{TVTHER} ....SVVDVA APGSWIYSTY PTST.....YASL SGTSMATPHV
{BLSAVI} ....AGLDIV APGVNVQSTY PGST.....YASL NGTSMATPHV
{BSISP1} ....KEIDLIV APGENILSTL PNKK.....YGKL TGTSMAPPHV
{BSEPR} ....DEVEFS APGTNITSTY LNQY.....YATG SGTQATPHA
{JP170} RDGRIKPDVM APGTIILSAR SSLAPDSSFV ANHDSKYAYM GGTSMATPIV

      230      240      250      260
      |        |        |        |
{BASBPN} AGAAALILSK HP.....NWT NTQVRSSLEN TTKLGDSEF..YYGKGLIN
{BLS147} ACVAALVKSR YP.....SYT NNQIRQRINQ TATYLGSEFS..LYGNGLVH
{BYSYAB} AGVAALVKQK NP.....SWS NVQIRNHLKN TATNLGNTT..QFGSGLVN
{BAPB92} AGAAALVKQK NP.....SWS NVQIRNHLKN TATSLGSTN..LYGSGLVN
{BSSDY} AGAAALILSK YP.....TSL ASQVRNRLSS TATNLGDSEF..YYGKGLIN
{TVTHER} AGVAGLLASQ .....GRS ASNIRAAIEN TADKISGTG..TYWAKGRVN
{BLSAVI} AGAAALVKQK NP.....SWS NVQIRNHLKN TATSLGSTN..LYGSGLVN
{BSISP1} SGALALIKSY EEESFQRKLS ESEVFAQLIR RTLPLDIKT..LAGNGFLY
{BSEPR} AAMFALLKQR DP.....AET NVQLREEMRK NIVDLGTAGR DQQFGYGLIQ
{JP170} AGNVAQLREH FVKNRGVTPK PSLKKAALIA GAADVGLGFP NGNQGWGRVT

      270
      |
{BASBPN} VQAAAQ.
{BLS147} AGRATQ.
{BYSYAB} AEAATR.
{BAPB92} AEAATR.
{BSSDY} VEAQAQ.
{TVTHER} AYKAVQY
{BLSAVI} AEAATR.
{BSISP1} LTAPEL
{BSEPR} YKAQATD
{JP170} LDKSLNV

```