



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0109945
(43) 공개일자 2010년10월11일

(51) Int. Cl.

C12N 9/28 (2006.01) C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/75 (2006.01) C11D 3/386 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7017272

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년02월04일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년08월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/033027

(87) 국제공개번호 WO 2009/100102

국제공개일자 2009년08월13일

(30) 우선권주장

61/026,056 2008년02월04일 미국(US)

61/059,403 2008년06월06일 미국(US)

(71) 출원인

다니스코 유에스 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토
페이지 밀 로드 925

(72) 발명자

카스카오-페레이라 루이스

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

창 클로딘

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

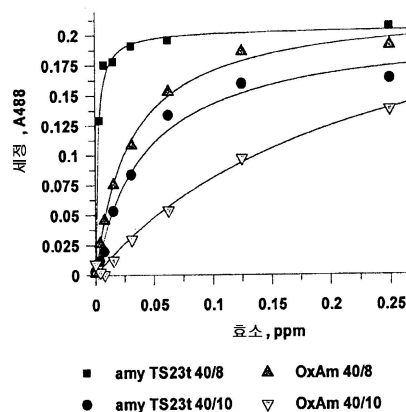
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 변경된 특성을 지닌 T S 23 알파-아밀라아제 변이체

(57) 요약

모체 아밀라아제와 비교시 변경된 특성을 보이고 알파-아밀라아제 활성을 지닌 모체 α-아밀라아제의 변이체 (돌연변이체), 및 이의 사용 방법이 기술된다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

초이 클레멘트

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

이스타브룩 멜로디

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

존스 브라이언 이

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

켈리스 제임스 티 주니어

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

콜크만 마르크

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

레플랑 크리스

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

브뤼멘 카스퍼

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

웨일러 월터

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

특허청구의 범위

청구항 1

모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체로서, 상기 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 80% 상동성을 지니고, 하기 중 적어도 두 가지를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 이때 상기 아미노산 잔기는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지시하는 변이체:

- (a) C-말단의 절단,
- (b) 잔기 201 의 치환, 또는
- (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 변이체는 알파-아밀라아제 활성을 갖는 변이체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 90% 상동성을 지닌 변이체.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 95% 상동성을 지닌 변이체.

청구항 5

모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체로서, 상기 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 85% 상동성을 지니고 C-말단의 절단을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 변이체.

청구항 6

제 5 항에 있어서, SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 갖는 변이체.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 냉수에서 전분 얼룩에 대한 증가된 세정 활성을 갖는 변이체.

청구항 8

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 위치 R180 및 S181 에서 잔기의 결실을 추가로 포함하며, 이때 아미노산 잔기 위치는 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 지시하는 변이체.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 증가된 세제 안정성을 지닌 변이체.

청구항 10

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 위치 201 에서 잔기의 치환을 추가로 포함하며, 이때 아미노산 잔기 위치는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지시하는 변이체.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 증가된 산화 안정성을 지닌 변이체.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서, 치환이 M201L 인 변이체.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 항에 있어서, 모체 알파-아밀라아제는 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 갖는 변이체.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 항에 있어서, 잔기 87, 잔기 225, 잔기 272, 및 잔기 282 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에서 치환을 추가로 포함하는 변이체.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 항의 변이체를 인코딩하는 핵산.

청구항 16

적합한 프로모터 제어 하 제 15 항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 17

제 16 항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 18

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 항의 변이체 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 손절거지 또는 자동 식기세척 조성물: 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 항부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제, 변색 억제제, 및 향료.

청구항 19

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 항의 변이체 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 세탁 세제 첨가제: 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 항부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제, 형광 증백제, 섬유 유연제, 및 향료.

청구항 20

직물을 모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체의 존재 하에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 직물에서 전분을 제거하는 방법으로서, 상기 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 80% 상동성을 지니고 하기 중 적어도 두 가지를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 이때 상기 아미노산 잔기는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지시하며 상기 인큐베이션은 직물에서 전분을 제거하는 방법:

- (a) C-말단의 절단,
- (b) 잔기 201 의 치환, 또는
- (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실.

청구항 21

직물을 모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체의 존재 하에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 전분 가공 방법으로서, 상기 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 80% 상동성을 지니고, 하기 중 적어도 두 가지를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 이때 상기 아미노산 잔기는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지시하고, 상기 인큐베이션은 상기 전분을 가수분해하는 방법:

- (a) C-말단의 절단,
- (b) 잔기 201 의 치환, 또는
- (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실.

청구항 22

직물을 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 항의 변이체의 존재 하에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 직물에서 전분을 제거하는 방법으로서, 상기 인큐베이션은 직물에서 전분을 제거하는 방법.

청구항 23

직물을 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 항의 변이체의 존재 하에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 전분 가공 방법으로서, 상기 인큐베이션은 상기 전분을 가수분해하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

우선권

[0002]

본 출원은 미국 가특허출원 시리즈 제 61/026,056 호 (2008 년 2 월 4 일 제출) 및 제 61/059,403 호 (2008 년 6 월 6 일 제출) 에 대한 우선권을 주장하며, 이 둘은 본원에서 그 전체가 참조로서 인용된다.

[0003]

기술 분야

[0004]

TS-23 알파-아밀라아제 (α -아밀라아제) 의 변이체와 관련한 조성물 및 방법에 대해 기술하고 있으며, 이때 상기 변이체는 모체 아밀라아제에 대해 변경된 생화학 특성을 지니고, 유리한 성능 특징을 갖는다. 변이체는 예를 들어 전분 전환, 에탄올 생산, 세탁 및 식기 세척, 경질 표면 세정, 직물 발호 (desizing), 밧/또는 감미료 생산에 사용되기에 적합하다.

배경 기술

[0005]

배경 기술

[0006]

전분은 아밀로오스 (15-30% w/w) 및 아밀로펙틴 (70-85% w/w) 의 혼합물로 이루어진다. 아밀로오스는 분자량 (MW) 이 약 60,000 내지 약 800,000 인 α -1,4-결합된 글루코오스 단위의 선형 사슬로 이루어진다. 아밀로펙틴은 매 24 ~ 30 글루코오스 단위마다 α -1,6 분지점을 함유하는 분지형 중합체이다. 이의 MW 는 100,000,000 만큼 클 수 있다.

[0007]

농축 텍스트로오스 시럽의 형태인 전분 유래의 당은 하기를 포함하는 효소 촉매작용된 공정으로 현재 제조되고 있다: (1) α -아밀라아제를 이용해 고체 전분을 약 7 ~ 10 의 평균 중합도를 지닌 텍스트린으로의 액화 (또는 묽힘 (thinning)); 및 (2) 아밀로글루코시다아제 (글루코아밀라아제 또는 GA 라고도 지칭됨) 를 이용한 생성 액화 전분 (즉, 전분 가수분해물) 의 당화. 생성된 시럽은 글루코오스 함량이 높다. 상업적으로 제조된 글루코오스 시럽 대부분은 후속해서 효소작용에 의한 이성질체화에 의해 이소시럽 (isosyrup) 으로 공지되어 있는 텍스트로오스/프럭토오스 혼합물로 된다.

[0008]

알파 (α)-아밀라아제 (α -1,4-글루칸-4-글루카노히드롤라아제, EC 3.2.1.1) 는 효소 집단으로, 이들은 내부 α -1,4-글루코시드 결합을 무작위로 분할하여 전분, 글리코젠, 및 관련 다당류를 가수분해한다. 상기 효소 부류는 당 가공의 초기 단계 (액화), 직물 발호, 재활용 종이의 잉크제거, 제지 및 펄프 산업에서의 전분 변형, 습식 옥수수 도정, 알코올 생산, 감미료 (예, 당) 제조, 양조업, 유전, 동물 사료에서 밧 세제 매트릭스 내 세정제로서, 다수의 중요한 상업적 용도를 갖고 있다. 예를 들어, 이러한 효소는 식기세척 및 세탁물 세척 동안에 전분성 얼룩을 제거하는데 사용될 수 있다.

[0009]

α -아밀라아제는 박테리아, 진균, 식물 및 동물성 공급원의 광범위한 종에서 단리된다. 산업적으로는, 다수의 중요한 α -아밀라아제는 *바실러스* (*Bacillus*) 로부터 단리된 것이다. 하나의 특징적인 α -아밀라아제는, 전분 가수분해 활성을 보이는 효소 중 적어도 5 종을 생산하는 호알칼리성 *바실러스* 종 균주 TS-23 의 것이다 (Lin et al, 1998, Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23, Biotechnol Appl Biochem 28 61-68). *바실러스* 종 no. TS-23 의 α -아밀라아제는 광범위한 pH 범위에 걸쳐 (즉, pH 4.7 내지 10.8) 안정적이지만, pH 9 가 최적이다. 효소는 저온, 예를 들어 15 ~ 20°C 서 활성을 가지나, 이의 최적 온도는 45°C 이다.

[0010]

변경된 생화학적 특성을 지니며, 산업적으로 응용시 개선된 성능을 부여하는 변이체 α -아밀라아제에 대한 요구

가 여전히 존재한다.

발명의 내용

개요

전분 가공 (예를 들어, 전분 액화, 당화 등), 식물 (예를 들어, 발효) 및 세제에 대한 첨가제 (예를 들어, 전분 계 얼룩을 세정하기 위함) 과 같은 각종 산업적 공정과 관련해 유리한 변경된 특성을 보이는 TS-23 α-아밀라아제의 변이체 (돌연변이체) 를 기술한다.

상기 변경이란, 특이 활성, 기질 특이성, 기질 결합, 기질 분할 (cleavage) 패턴, 열 안정성, 산화에 대한 안정성, Ca^{2+} 의존성, pH/안정성 프로파일, pH/안정성 프로파일 및 기타 관심 특성에서의 변경을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시가 되는 변경된 pH/안정성 프로파일로는, 저 pH (예를 들어, pH <6 및 나아가 pH <5 에서도) 에서의 증가된 안정성, 및/또는 고 pH (예를 들어, pH>9) 에서의 증가된 안정성이다.

한 측면에서, 모체 α-아밀라아제와, 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 심지어 99% 상동성을 지니고, 하기 중 적어도 2 가지를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 모체 AmyTS23 α-아밀라아제의 변이체가 제공된다: (a) C-말단의 절단 (truncation), (b) 아미노산 201 의 치환, 또는 (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실, 이때 상기 변이체는 α-아밀라아제 활성 (변호 부여를 위해 SEQ ID NO: 1 를 이용함) 을 갖는다. 일부 구현예에서, 모체 α-아밀라아제는 SEQ ID NO: 1 이다. 일부 구현예에서, 모체 α-아밀라아제는 SEQ ID NO: 1 와 명시된 상동성을 갖는다.

또 다른 측면은, 바실러스 중 no TS-23 α-아밀라아제 또는 이의 변이체를 포함하는 손실거지 또는 자동 식기세척 조성물을 고려한다. 조성물은 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제 (foam booster), 비누거품 억제제 (suds suppressor), 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제 (hydrotrope), 변색 억제제 및 향료 (perfume) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 식기세척 조성물은 손실거지용 또는 자동 식기세척용에 사용되는 조성물일 수 있다.

관련 측면은, 바실러스 중 no TS-23 α-아밀라아제 또는 이의 변이체를 포함하는 세탁 세제 첨가제를 고려한다. 상술한 바와 같이 조성물은 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제, 변색 억제제, 및 향료 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 조성물은 또한 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제, 형광 증백제, 섬유 유연제 (fabric conditioner), 및 향료 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

추가 측면은, 상술된 변이체를 인코딩 (encoding) 하는 핵산 및 그러한 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 또한, 그러한 핵산이 예를 들어 벡터, 파지, 또는 바이러스를 통해 삽입되어 있는 세포도 고려된다. 단리된 숙주 세포는 예를 들어, 박테리아 또는 진균과 같은 미생물일 수 있다. 박테리아는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus Subtilis*), B. 리체니포르미스 (*B. licheniformis*), B. 렌투스 (*B. lentus*), B. 브레비스 (*B. brevis*), G. 스테아로테르모필루스 (*G. stearothermophilus* (이전에는 *B. 스테아로테르모필루스* (*B. stearothermophilus*) 로 지칭함), B. 알칼로필루스 (*B. alkalophilus*), B. 아밀로리쿠에파시엔스 (*B. amyloliquefaciens*), B. 코아굴란스 (*B. coagulans*), B. 키르쿨란스 (*B. circulans*), B. 라우투스 (*B. lautus*), B. 투링기엔시스 (*B. thuringiensis*), 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*) 및 S. 무리너스 (*S. murinus*) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 그람 양성 박테리아; 또는 그람 음성 박테리아일 수 있는데, 이때 상기 그람 음성 박테리아는 에스케리키아 콜리 (*Escherichia coli*) 및 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종이다.

다른 측면은, 변이체 폴리펩티드를 제조하는 방법, 및 각종 산업적 공정에서, 예를 들어 전분 액화에서, α-전분가수분해 효소를 비롯한 기타 효소들과 조합된 또는 단독의 변이체 펩티드의 용도에 관한 것이다. 일부 측면은 세탁물 세척 및/또는 식기세척을 위한 변이체 폴리펩티드의 용도를 고려한다. 또한, 식물 및 기타 경질 표면을 변이체 폴리펩티드를 이용하여 세정하는 방법을 고려한다.

또 다른 측면은 본원에 기술된 α-아밀라아제 또는 α-아밀라아제 변이체 중 임의의 것의 식물 발효 조성물에서의 용도를 고려하는데, 예를 들어 이때 상기 조성물은 수성 용액이다. 또한, 상기 조성물을 이용하는 식물 발효 방법이 고려된다.

- [0020] 변이체 폴리펩티드는 임의로는 무(無)-분진 과립, 미세과립 (microgranulate), 안정화된 액체, 또는 보호된 효소의 형태일 수 있다. 또 다른 측면에서는, 세제 첨가제 또는 세제 조성물이 셀룰라아제, 프로테아제, 아실 트랜스퍼라아제, 아미노펩티다아제, 아밀라아제, 카르보히드라아제, 카르복시펩티다아제, 카탈라아제, 키티나아제, 큐티나아제, 시클로렉스트린 글루카노트랜스퍼라아제, 데옥시리보뉴클레아제, 에스테라아제, α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 할로퍼옥시다아제, 인버타아제, 락카아제, 리파아제, 만노시다아제, 옥시다아제, 펙틴 가수분해 효소, 펩티도글루타미나아제, 퍼옥시다아제, 과이타아제, 폴리페놀옥시다아제, 단백질 가수분해 효소, 리보뉴클레아제, 트랜스글루타미나아제, 자일라나아제, 풀룰라나아제, 이소아밀라아제, 카라기나아제, 및 이들의 임의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소를 추가로 포함하는 것이 고려된다. 조성물에 사용할 것으로 고려되는 기타 아밀라아제로는, 둘 이상의 기타 α -아밀라아제, β -아밀라아제, 이소아밀라아제, 또는 글루코아밀라아제가 포함된다.
- [0021] 일부 측면에서는 수성 용액 중 바실러스 중 no TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체를 포함하는 전분 가공용 조성물이 고려된다. 또한 전분을 가공하기 위한 상기 조성물을 이용하는 방법이 고려된다. 당해 방법 및 조성물은 글루코아밀라아제, 이소아밀라아제, 풀룰라나아제, 과이타아제 또는 이의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 또한 또 다른 측면은, 바실러스 중 no TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체를 용액 또는 겔 중에 포함하고, 임의로는 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제, 자일라나아제, 리파아제, 프로테아제, 펙티나아제, 항균제, 또는 이들의 임의 조합을 추가로 포함하는 균막 분해 (예를 들어 가수분해) 조성물을 고려한다. 또한, 상기 조성물을 이용해 균막을 가수분해하는 방법이 고려된다.
- [0022] 또 다른 측면은 용액 중 바실러스 중 no TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체를 포함하는, 전분을 당화하기 위한 조성물이 고려된다. 따라서, 또한 상기 전분을 당화하기에 충분한 기간 동안 본원에서 기술된 아밀라아제를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 전분의 당화 방법이 고려된다.
- [0023] 또 다른 측면은, 용액 중 바실러스 중 no TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체를 포함하는 전분을 액화하는 조성물이 고려된다. 또한 상기 전분을 액화하기에 충분한 기간 동안 당해 조성물을 투여하는 것을 포함하는 전분 액화 방법도 고려된다.
- [0024] 조성물 및 방법의 일부 특정 측면을 하기에 기술한다.
- [0025] 한 측면에서, 모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체가 제공되는데, 이때 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 80% 상동성을 지니고, 하기 중 적어도 두 가지를 포함하는 아미노산 서열을 가지며, 이때 상기 아미노산 잔기는 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 지칭한다:
- [0026] (a) C-말단의 절단,
- [0027] (b) 잔기 201 의 치환, 또는
- [0028] (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실. 일부 구현예에서, 변이체는 알파-아밀라아제 활성을 지닌다.
- [0029] 일부 구현예에서, 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 90% 상동성을 지닌다. 일부 구현예에서, 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 95% 상동성을 지닌다. 특정 구현예에서, 모체 알파-아밀라아제는 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 가진다.
- [0030] 일부 구현예에서, 변이체는 잔기 87, 잔기 225, 잔기 272, 및 잔기 282 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에서 치환을 추가로 포함한다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체가 제공되는데, 이때 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 85% 상동성을 지니고, C-말단의 절단을 포함하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 가진다. 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시, 냉수에서 전분 얼룩에 대해 증가된 세정 활성을 지닐 수 있다.
- [0032] 일부 구현예에서, 변이체는 R180 및 S181 위치에서 잔기의 결실을 추가로 포함하며, 이때 아미노산 잔기 위치는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지칭한다. 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 증가된 세제 안정성을 지닐 수도 있다.
- [0033] 일부 구현예에서, 변이체는 위치 201 에서 잔기의 치환을 추가로 포함하는데, 이때 아미노산 잔기 위치는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 증가된 산화 안정성을 가질 수 있다. 변이체는 치환 M201L 을 가질 수 있다.

- [0034] 변이체 중 임의의 것은 잔기 87, 잔기 225, 잔기 272, 및 잔기 282 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에서 치환을 추가로 포함할 수 있으며, 이때 아미노산 잔기 위치는 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0035] 관련 측면에서, 본원에서 기술된 변이체를 인코딩하는 핵산이 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 핵산을 적합한 프로모터의 제어 하에서 포함하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 구현예에서, 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0036] 관련 측면에서, 본원에서 기술된 변이체 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 손실거지 또는 자동 식기세척 조성물이 제공된다: 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제, 변색 억제제, 및 향료.
- [0037] 관련 측면에서, 본원에 기술된 변이체 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 세탁 세제 첨가제가 제공된다: 계면활성제, 세제 강화제, 착화제, 중합체, 표백 시스템, 안정화제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 재침착방지제, 염료, 살균제, 가용화제, 형광 증백제, 섬유 유연제, 및 향료.
- [0038] 또 다른 측면에서, 직물을 모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체의 존재 하에서 인큐베이션하는 것을 포함하는 직물에서 전분을 제거하는 방법이 제공되는데, 이때 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 80% 상동성을 지니며, 하기 중 적어도 두 가지를 포함하는 아미노산 서열을 갖고:
- [0039] (a) C-말단의 절단,
- [0040] (b) 잔기 201 의 치환, 또는
- [0041] (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실,
- [0042] 이때, 상기 아미노산 잔기란 SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지칭하며, 상기 인큐베이션으로 직물로부터 전분이 제거된다.
- [0043] 관련 측면에서, 모체 AmyTS23 알파-아밀라아제의 변이체의 존재 하에서 직물을 인큐베이션하는 것을 포함하는 전분 가공 방법이 제공되는데, 이때 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 적어도 80% 상동성을 지니고, 하기 중 적어도 2 가지를 포함하는 아미노산 서열을 지니며:
- [0044] (a) C-말단의 절단,
- [0045] (b) 잔기 201 의 치환, 또는
- [0046] (c) 잔기 R180 및 S181 의 결실,
- [0047] 이때, 상기 아미노산 잔기란, SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 지칭하고, 상기 인큐베이션은 상기 전분을 가수분해한다.
- [0048] 본 조성물 및 방법의 이러한 및 기타 측면 및 구현예는 개시 및 도면 측면을 비추어 분명해질 것이다.
- [0049] **도면의 간단한 설명**
- [0050] 도 1 은, 모체 AmyTS23 아밀라아제의 아미노산 서열을 나타낸다 (전장, 성숙; SEQ ID NO: 1).
- [0051] 도 2 는 AmyTS23t 절단된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타낸다 (성숙, SEQ ID NO: 2). 굵고 밑줄그은 문자는 아미노산 잔기 R180, S181 및 M201 을 지시한다.
- [0052] 도 3 은 최적화 amyTS23 유전자의 DNA 서열을 나타낸다 (SEQ ID NO: 3).
- [0053] 도 4 는 최적화 amyTS23t 유전자의 DNA 서열을 나타낸다 (SEQ ID NO: 4).
- [0054] 도 5 는 AmyTS23 및 AmyTS23t 에 대한 발현 카세트를 나타낸다.
- [0055] 도 6 은 전장 AmyTS23 아밀라아제 (AmyTS23f1) 및 OxAm 대조군을 이용하는 조각건본 (swatch) 세정 검정의 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0056] 도 7 은 아밀라아제 AmyTS23f1 및 OxAm 대조군을 이용하는 조각건본 세정 검정 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0057] 도 8 은 아밀라아제 AmyTS23t 및 OxAm 대조군을 이용하는 조각건본 세정 검정의 결과를 나타내는 그래프이다.

- [0058] 도 9 는 AmyTS23t 및 OxAm 대조군을 이용하는 조각전본 세정 검정의 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0059] 도 10 은 두 가지의 상이한 세탁물 세제 제형물 중 AmyTS23t 및 AmyTS23t ΔRS 로 촉진화된 안정성 연구를 나타내는 그래프이다.
- [0060] 도 11 은 AmyTS23t, AmyTS23t ΔRS 및 AmyTS23t (M201L+ΔRS) 의 산화 안정성을 나타내는 그래프이다.
- [0061] 도 12 는 쌀 전분 조각전본 상 액체 세제 중 AmyTS23t ΔRS 의 성능을 나타내는 그래프이다.
- [0062] 도 13 은 전하 변동 함수로서 잔류 활성을 나타내는 그래프이다.
- [0063] 도 14 는 개시에서 언급되는 추가의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- [0064] **상세한 설명**
- [0065] 바실러스 종 no TS-23 α-아밀라아제 및 이의 변이체를 포함하는 조성물 및 방법을 기술한다. TS-23 의 변이체는 변경된 생화학적 특징을 가지며, 예를 들어 세탁 및 식기세척 적용에서 고성능을 보인다. 당해 변이체의 이러한 및 기타 특징뿐 아니라 당해 변이체를 이용하는 적용들을 상세히 기술할 것이다.
- [0066] **1. 약어 및 정의**
- [0067] 하기의 약어 및 정의가 적용된다. 단수 형태에는 문맥상 명백히 다르게 제시되지 않는 경우 복수의 대응물이 포함된다. 그리하여 예를 들어, "효소"에 대한 언급에는 복수의 이러한 효소들이 포함되며, "제형물"에 대한 언급에는 당업자에게 공지된 하나 이상의 제형물 및 이의 등가물 등에 대한 언급이 포함된다.
- [0068] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에게 통상 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. [Singleton, et al, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY 및 MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED, John Wiley and Sons, New York (1994) 및 Hale & Markham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)] 은 당업자에게 본원에서 사용되는 용어 대부분의 일반적인 사전의미를 제공한다.
- [0069] 조성물 및 방법의 일부 측면은 유전자 공학 및 분자 생물학 분야에서 사용되는 통상의 기술 및 방법에 따른다. 하기의 문헌에는 본 조성물 및 방법에 따라 유용한 일반적인 방법에 대한 기술이 포함된다: Sambrook et al, MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL (2nd Ed, 1989); Kreigler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION; A LABORATORY MANUAL (1990) 및 Ausubel et al, Eds CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (1994). 이러한 일반 참고서에는 당업자에게 공지된 정의 및 방법을 제공한다. 그러나, 본 조성물 및 방법이 기술된 임의의 특정 기술, 프로토콜 및 시약에 제한되는 것으로 의도되지 않으며 이들은 다양할 수 있다. 본원에서 기술된 것과 유사하거나 또는 동일한 임의의 방법 및 물질들을 본 조성물 및 방법의 시험 또는 실시에서 사용될 수 있고, 바람직한 방법 및 물질을 기술한다.
- [0070] 단백질 및 이를 인코딩하는 유전자를 기술할 때, 유전자에 대한 명칭은 일반적으로 이탤릭체로 표시하고 대문자로 표시하지 않으며, 단백질에 대한 명칭은 일반적으로 이탤릭체로 표시하지 않으며, 이의 첫번째 문자는 대문자로 표시한다
- [0071] 이러한 특허 및 공보 내에 개시된 모든 서열을 포함해서 모든 특허 및 공보는 본원에서 명백하게 참조 인용되고 있다.
- [0072] **1.1 정의**
- [0073] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "전분"은 식 (C₆H₁₀O₅)_x (이때, "X"는 임의의 수일 수 있음) 을 가지며 아밀로오스 및 아밀로펙틴으로 구성된 식물의 복합 다당류 탄수화물로 이루어진 임의의 물질을 지칭한다. 특히, 상기 용어는 이들에 제한되는 것은 아니나 곡물, 풀, 덩이줄기 및 뿌리 및 더 구체적으로 밀, 보리, 옥수수, 호밀, 쌀, 사탕수수, 밀기울, 카사바, 기장, 감자, 고구마, 및 타피오카를 포함하는 임의의 식물 기반 물질을 지칭한다.
- [0074] 본원에서 사용되는 바, "아밀라아제"는, 전분 분해를 촉매할 수 있는 효소이다. 아밀라아제는 전분 내의 α-D-(1→4) 0-글리코시드 결합을 분할하는 히드롤라아제이다. 일반적으로, α-아밀라아제 (EC 3.2.1.1; α-D-(1→4)-글루칸 글루카노히드롤라아제) 는 전분 분자 내의 α-D-(1→4) 0-글리코시드 결합을 무작위적 방식으로 분할하는 내부-작용 효소로 정의된다. 이와 대조적으로, 외부-작용 전분가수분해 효소, 예컨대 β-아밀라아제 (EC 3.2.1.2; α-D-(1→4)-글루칸 말토히드롤라아제) 및 말토오스 생성 (maltogenic) α-아밀라아제 (EC 3.2.1.133) 와 같은 일부 생성물-특이적 아밀라아제는 기질의 비-환원성 말단으로부터 전분 분자를 분할한

다. β -아밀라아제, α -글루코시다아제 (EC 3.2.1.20; α -D-글루코시드 글루코히드롤라아제), 글루코아밀라아제 (EC 3.2.1.3; α -D-(1 \rightarrow 4)-글루칸 글루코히드롤라아제), 및 생물-특이적 아밀라아제는 전분으로부터 특정 길이의 말토-올리고당을 생성할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 아밀라아제에는, *바실러스* 종, 예를 들어, *B. 리체니포르미스* 및 *B. 서브틸리스*의 것과 같은, 글루코아밀라아제, α -아밀라아제, β -아밀라아제, 및 야생형 알파-아밀라아제를 포함해, 임의의/모든 아밀라아제가 포함된다.

[0075] 본원에서 사용되는 바, "*바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제," 및 유사 구는, *바실러스* 종 균주 TS-23 으로부터 유래된 α -아밀라아제이다. α -아밀라아제를 인코딩하는 유전자는 야생형 유전자 또는 α -아밀라아제를 인코딩하는 코돈 최적화 폴리뉴클레오티드일 수 있다. *바실러스* 종 균주 TS-23 의 성숙 α -아밀라아제는 (아미노에서 카복시 방향) 의 것으로 (SEQ ID NO: 1; 도 1) 에 나타내었다:

```
ntapinetmm qyfewdlpnd gtlwtkvkne aanlsslgit alwlppaykg 50
taqsdvgygv ydlydlgefn qkgirtkyg tktqyiqaiq aakaagmqvy 100
advvfnhkag adgtefvdav evdpsnrnqe tsqtyiqaw tkfdfpgrgn 150
tyssfkwrwy hfdgtwdwes rklrnykfr stgkawdewv dtengnydyl 200
mfadldmdhp evvtelknwg twyvnttnid gfrldavkhi kysffpdwlt 250
yvrnqtgknl favgefwsyd vnklnhyitk tngsmelfda plhnnfytas 300
kssgyfcmry llmntlmkdq pslavtlvdn hdtqpgqslq swvepwfkpl 350
ayafiltrqe gypcvfygdy ygipkymipg lkskidplli arrdyaygtq 400
rdyidhqdi gwtregidtk pnsqglaalit dpgpggakwmy vgkkgagkvf 450
ydltngrsdt vtinadgwe fkvnggsysi wvaktantvf tvnnatttsg 500
qnvyvvanip elgnwntana ikmnpssypt wkatialpgg kaiefkfikk 550
dqagnviwes tsnrtytvpf sstgsytasw nvp 583
```

[0076]

[0077] 본원에서 이용되는 바, "*바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 변이체," 및 유사구는 야생형 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제의 변이체/돌연변이체를 의미하는 것으로, 이에 *바실러스* 종 균주 TS-23 아밀라아제의 모체 (야생형, 참조) 아미노산 서열에 있어서 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실이 포함된다. "변이체" 라는 용어는 "돌연변이체" 라는 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 변이체 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제는 모체 신호 서열에 있어서 신호 서열 내에 돌연변이를 포함할 수 있다. 게다가, 변이체 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제는 *B. 리체니포르미스*(LAT) 등의 이중 α -아밀라아제 신호 서열을 포함하는 융합 단백질의 형태일 수 있다.

[0078] 본원에서 사용되는 바, 구 "모체 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제," "야생형 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제," "참조 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제," 및 유사구는, *바실러스* 종 균주 TS-23 의 폴리펩티드를 지칭한다. 상기 용어는 편의를 위해 "모체 효소," "야생형 효소," "모체 폴리펩티드," 참조 폴리펩티드," 등으로 축약될 수 있다. 모체 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제는 모체 폴리펩티드의 신호 서열에 돌연변이를 포함할 수 있다. 또한, 모체 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제는 *B. 리체니포르미스* (LAT) 와 같은 이중 α -아밀라아제 신호 서열을 포함하는 융합 단백질의 형태일 수 있다.

[0079] "모체 핵산/폴리뉴클레오티드," "야생형 핵산/폴리뉴클레오티드," 또는 "참조 핵산/폴리뉴클레오티드," 는, 모체 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열 및 이에 상보적인 핵산을 지칭한다.

[0080] "변이체 핵산/폴리뉴클레오티드" 는, 변이체 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열 또는 이에 상보적인 핵산, 또는 모체 폴리뉴클레오티드 서열에 있어서 적어도 하나의 염기 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이에 상보적인 핵산을 지칭한다. 명시된 이러한 핵산은, 참조 서열과 명시된 정도로 상동인 것, 또는 참조 서열과, 예를 들어 엄격한 조건 [예를 들어, 50°C 및 0.2X SSC (1X SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₃ 시트레이트, pH 7.0)] 또는 고도로 엄격한 조건 [예를 들어, 65°C 및 0.1X SSC (1X SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₃ 시트레이트, pH 7.0)] 하에서 혼성화할 수 있는 것을 포함할 수 있다. 변이체 핵산은 메탄올자화 (methylophilic) 효모들 (예를 들어, *피치아* (*Pichia*), *한세놀라* (*Hansenula*) 등) 또는 사상 진균 (예를 들어, *트리코더마* (*Trichoderma*) (예를 들어, *T. 리이세이* (*reesei*)), 등) 또는 기타 발현 숙주 (예를 들어, *바실러스 스트렙토마이세스* 등) 등의 명시된 숙주 유기체에 대한 바람직한 코돈 사용을 반영도록 최적화될 수 있다.

[0081] 용어 "재조합"은, 대상의 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때, 상기 대상이, 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래의 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변화되었거나, 또는 상기 세포가 그렇게 변화된 세포에서 유래한 것임을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 본래의 (재조합이 아닌) 형태에 서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 다른 방식으로 비정상적으로 발현, 과소 발현 또는 전혀 발현되

지 않은 본래의 유전자를 발현한다.

- [0082] 용어 "회수된" "단리된" 및 "분리된" 은 자연에서 발견되고 자연적으로 결합된 적어도 하나의 구성성분으로부터 제거된 화합물, 단백질, 세포, 핵산 또는 아미노산을 지칭한다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바, 용어 "정제된"은 비교적 순수한 상태, 예컨대, 적어도 약 90% 순수, 적어도 약 95% 순수, 또는 적어도 약 98% 순수 또는 심지어 적어도 약 99% 순수한 상태인 물질 (예를 들어, 단리된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드) 을 지칭한다.
- [0084] 용어 "열안정" 및 "열안정성" 이란, 승온에 노출된 후 효소의 활성 유지능을 의미한다. 효소, 예컨대 α -아밀라아제 효소의 열안정성은, 효소 활성이 정해진 조건 하에서 반으로 상실되는 동안인, 분, 시간 또는 일로 주어진 그의 반감기 ($t_{1/2}$) 로 측정된다. 반감기 값은 승온에 노출 (즉, 도전) 후 잔여 α -아밀라아제 활성을 측정함으로써 산출된다.
- [0085] "pH 범위"란 효소가 촉매적 활성을 나타내는 pH 값의 범위를 지칭한다.
- [0086] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "pH 안정" 및 "pH 안정성" 이란, 소정 기간의 시간 (예를 들어, 15 분, 30 분, 1 시간 등) 동안 pH 의 광범위한 범위에 걸쳐 활성을 유지하는 효소의 능력을 지칭한다.
- [0087] 본원에서 사용되는 바, 용어 "아미노산 서열"은 용어 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드" 와 동의어이며, 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 아미노산 서열이 활성을 나타내는 경우, 이들은 "효소" 로서 지칭될 수 있다. 아미노산 잔기에 대한 통상적인 1-문자 또는 3-문자 코드가 본원에서 사용된다.
- [0088] 용어 "핵산"은 DNA, RNA, 이질가닥 및 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 합성 분자를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 화학적으로 변형될 수 있다. 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드" 는 상호 교환하여 사용될 수 있다. 유전자 코드가 축퇴성이기 때문에, 하나 초과 코돈이 특정한 아미노산을 인코딩하는데 사용될 수 있으며, 본 발명의 조성물 및 방법은 특정한 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0089] 다르게 지시되지 않는다면, 핵산은 5' 에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 표기하며; 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 표기한다.
- [0090] "상동체" 란, 대상 아미노산 서열 및 대상 뉴클레오티드 서열과 특정 정도의 동일성을 갖는 실체 (entity) 를 의미한다. 상동성 서열은 통상적인 정렬 도구 (예를 들면, Clustal, BLAST 등) 을 이용할 때 대상 서열과 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 심지어 99% 가 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 의미한다. 통상적으로, 상동체는 달리 특별히 언급되지 않는 한, 대상 아미노산 서열과 동일한 활성 부위를 포함할 것이다.
- [0091] 본원에서 사용된 바, "혼성화"는 블롯 혼성화 기법 및 PCR 기법 동안 발생하는 바와 같이, 핵산 염기의 한 가닥이 상보성 가닥과 쌍을 이루는 과정을 지칭한다.
- [0092] 본원에서 사용된 바, "합성" 분자는 유기체에 의하는 것 보다는 시험관 내 화학적 또는 효소적 합성에 의해 제조된다.
- [0093] 본원에서 사용된 것으로서, 세포와 관련하여 사용되는 용어 "형질전환", "안정적으로 형질전환" 및 "유전자 이식(transgenic)"은, 세포가 여러 세대에 걸쳐 유지되는 에피솜 플라스미드로서 운반되거나 또는 게놈 내로 혼입된 비(非)-본래적 (예컨대, 이종) 핵산 서열을 갖는 것을 의미한다.
- [0094] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 맥락에서 용어 "도입"이란, 당업계에 공지된 바와 같은 "트랜스펙션", "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미한다.
- [0095] "숙주 균주" 또는 "숙주 세포"란, 관심 폴리펩티드 (예를 들어, 변이체 α -아밀라아제) 를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한 발현 벡터, 과지, 바이러스 또는 기타 DNA 구축물이 도입되어 있는 유기체를 의미한다. 숙주 균주의 예는 박테리아 세포이다. 용어 "숙주 세포" 는 바실러스 종의 것과 같은 세포로부터 생성된 원형질체를 포함한다.
- [0096] 폴리뉴클레오티드 또는 단백질과 관련하여 용어 "이종"은 숙주 세포에서 천연적으로 발생하지 않는 폴리뉴클레오티드 또는 단백질을 말한다.
- [0097] 폴리뉴클레오티드 또는 단백질과 관련하여 용어 "내생적"은 숙주 세포에서 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티

드 또는 단백질을 지칭한다.

- [0098] 본원에서 사용된, 용어 "발현"은 유전자의 핵산 서열에 기초하여 폴리펩티드가 생성되는 과정을 지칭한다. 상기 과정은 전사 및 번역을 모두 포함한다.
- [0099] "선별 마커" 또는 "선별성 마커"란, 숙주에서 발현가능한 유전자를 지칭하는데, 이는 이 유전자를 갖는 숙주 세포를 선별하는 것을 용이하게 한다. 선별가능 마커의 예로서는, 항균제 (예컨대, 하이그로마이신, 블레오마이신, 또는 클로르암페니콜) 및/또는 숙주 세포에 영양상의 이점 등 대사적 이점을 부여하는 유전자를 들 수 있으나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [0100] "배양"은 액체 또는 고체 배지에서 적당한 조건 하에 미생물 세포 군집을 성장시키는 것을 말한다. 배양이란, (전형적으로는 용기 또는 반응기 내에서) 과립형 전분을 함유한 전분 기질을 최종 생성물로 발효적으로 생물전환함을 지칭한다.
- [0101] "발효"는 유기 물질을 미생물을 이용하여 효소적 및 혐기적으로 분해하여 더욱 단순한 유기 화합물을 생성하는 것이다. 발효가 혐기성 조건하에서 일어나는 것이긴 하나, 발효는 또한 산소의 존재하에서도 일어나므로, 상기 용어를 엄격한 혐기성 조건으로만 한정하는 것으로 의도하지는 않는다.
- [0102] "유전자"란 폴리펩티드의 생성에 연루된 DNA 분절을 말하며, 이에는 코딩 영역, 코딩 영역 전과 후의 영역, 및 개별 코딩 분절 (엑손) 사이의 개재 서열 (인트론) 을 포함된다.
- [0103] "벡터"는 핵산을 하나 이상의 세포 유형 내로 도입하도록 고안된 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 벡터에는 클로닝 벡터, 발현 벡터, 셔틀 (shuttle) 벡터, 플라스미드, 파지 입자, 카세트 등이 포함된다.
- [0104] "발현 벡터"는 적당한 숙주에서 DNA 가 발현되게 할 수 있는 적당한 제어 서열에 작동가능하게 연결된 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 포함한 DNA 구축물을 의미한다. 이러한 제어 서열에는 전사를 가능하게 하는 프로모터, 전사를 제어하는 임의적 작동자 (operator) 서열, mRNA 상의 적당한 리보솜 결합 부위를 인코딩하는 서열, 인핸서 (enhancer) 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열이 포함될 수 있다.
- [0105] "프로모터"는 RNA 중합효소에 결합하여 유전자의 전사를 개시하는데 관여하는 조절 서열이다. 프로모터는 유도성 프로모터일 수도 있거나, 또는 구성적 프로모터일 수도 있다. 예시의 프로모터는, *바실러스 리체니 포르미스* α -아밀라아제 (AmyL) 프로모터이다.
- [0106] 용어 "작동가능하게 연결된"은 명시된 요소들이 의도된 방식으로 기능하도록 관계를 맺는 것 (병치를 포함하나, 이로 제한되지는 않음) 을 의미한다. 예를 들어, 조절 서열은, 코딩 서열의 발현이 상기 조절 서열의 제어 하에 있도록 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0107] "전사 제어 하에서"란 용어는, 폴리뉴클레오티드 서열 (보통은 DNA 서열) 의 전사가 전사의 개시에 기여하거나 또는 전사를 촉진하는 요소에 작동가능하게 연결되어 있는 것에 좌우됨을 나타낸다.
- [0108] 용어 "번역 제어 하에서"란 폴리뉴클레오티드 서열 (보통은 RNA 서열) 의 폴리펩티드로의 번역이, 번역 개시에 기여하거나 또는 번역을 촉진하는 요소에 작동적으로 연결되어 있는 것에 좌우됨을 나타낸다.
- [0109] "신호 서열" 은 단백질의 N-말단 부분에 결합된 아미노산의 서열로서, 상기 단백질을 세포 외부로 용이하게 분비되게 하는 서열이다. 성숙 형태의 세포의 단백질에는 신호 서열이 존재하지 않는데, 이는 분비 과정 동안 분할 제거된다.
- [0110] 본원에서 사용된, "생물학적으로 활성인"이란, 특정 생물학적 활성, 예컨대 효소적 활성을 갖는 서열을 지칭한다. 본 아밀라아제의 경우에서, 활성은 α -아밀라아제 활성이다.
- [0111] "수 경도 (Water hardness)" 는 수중에 존재하는 광물(예를 들어, 칼슘 및 마그네슘) 의 척도이다.
- [0112] "당화"란 전분의 포도당으로의 효소적 전환을 지칭한다.
- [0113] "겔라틴화 (gelatinization)" 란 전분 분자를 익혀서 가용화하여 점성 현탁액을 형성함을 의미한다.
- [0114] "액화"란 겔라틴화된 전분이 가수분해되어 저분자량의 가용성 텍스트린을 생성하는 전분 전환 중의 단계를 지칭한다.
- [0115] 용어 "중합도(DP)" 란 주어진 당류 내 무수글루코피라노스 단위의 수 (n) 를 말한다. DP1 의 예는 포도당 및 과당 등의 단당류이다. DP2 의 예는 맥아당 및 자당 등의 이당류이다. DP>3 은 중합도가 3 초과인

중합체를 나타낸다

- [0116] 전분 전환과 관련해, 용어 "최종 생성물" 또는 "목적하는 최종 생성물"이란 전분 기질로부터 효소 작용에 의해 전환된 특정 탄소원 유래의 분자를 지칭한다.
- [0117] 본원에서 사용되는 용어 "건조 고체 함량 (ds)"은 % 건조 중량으로 나타내는 슬러리 중의 총 고체를 말한다.
- [0118] "슬러리"라는 용어는 불용성 고체가 함유된 수성 혼합물을 지칭한다.
- [0119] "잔류 전분"이라는 용어는 전분 함유 기질의 효소적 가수분해 또는 발효 후 조성물 중에 남아있는 전분 (가용성 또는 불용성) 을 지칭한다.
- [0120] 본원에서 사용되는 바, "재순환 단계"란, 잔류 전분, 효소 및/또는 미생물을 포함할 수 있는 매쉬 (mash) 성분을 재순환하여 전분을 포함한 기질을 발효시키는 것을 말한다.
- [0121] "매쉬"라는 용어는 알코올과 같은 발효 생성물을 제조하기 위해 사용될 수 있는 발효가능 탄소원 (예, 탄수화물) 을 포함하는 수성 혼합물을 지칭한다. "비어(beer)" 및 "매쉬"라는 용어가 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0122] 용어 "증류 폐액(stillage)"은 발효된 매쉬로부터 알코올을 제거한 후 남은 잔류물인 비발효 고체 및 물의 혼합물을 의미한다.
- [0123] "주정박 (distillers dried grain, DDG)" 및 "주정혼합박 (distillers dried grain with solubles, DDGS)"이라는 용어는 곡물 발효의 유용한 부산물을 지칭한다.
- [0124] 본원에서 사용된 "에탄올 생성 미생물"은 당 또는 올리고당을 에탄올로 전환시키는 능력을 가진 미생물을 지칭한다. 에탄올 생성 미생물은, 개별적으로 또는 함께 당을 에탄올로 전환시키는 하나 이상의 효소를 발현하는 능력으로 말미암아 에탄올 생성성을 갖는다.
- [0125] 본원에서 사용된 "에탄올 생성체" 또는 "에탄올 생성 미생물"은 6탄당 또는 5탄당으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 임의의 유기체 또는 세포를 지칭한다. 일반적으로, 에탄올-생성 세포는 알코올 탈수소효소 및 피루브산 탈탄산효소를 함유한다. 에탄올 생성 미생물의 예로서는, 효모와 같은 진균류 미생물을 들 수 있다. 바람직한 효모에는, *사카로마이세스*, 특히 *S. 세레비시아 (cerevisiae)* 의 균주가 포함된다.
- [0126] 아밀라아제 효소 및 이의 기질과 관련하여, 용어 "접촉시키다"란, 효소가 기질을 최종 생성물로 전환시킬 수 있도록 효소를 기질에 충분히 근접하게 위치시키는 것을 말한다. 접촉시키는 것은 혼합하는 것을 포함할 수 있다.
- [0127] "유래하다"라는 용어에는 맥락에 따라 "~로부터 기원하다", " ~ 에 기재하다", "~로부터 수득하다" 또는 "~로부터 수득가능하다" 또는 "~로부터 단리하다"라는 용어들이 포함된다.
- [0128] 용어 "효소 전환" 은 일반적으로 효소 작용 (예를 들어, 아밀라아제) 에 의한 기질 (예를 들어, 전분) 의 변형을 말한다.
- [0129] 본원에서 사용된, "특이 활성"은 특정 조건 하에서 단위 시간당 효소 조제물에 의해 생성물로 전환되는 기질의 몰수를 지칭한다. 특이 활성은 단백질 1 mg 당 단위 (U) 로 표현된다.
- [0130] 용어 "수율"은 예를 들어 출발 물질의 퍼센트, 농도, 부피 또는 양으로 나타낸, 프로세스에 의해 생성되는 최종 생성물의 양을 지칭한다.
- [0131] "ATCC"는 버지니아주 20108 Manassas 에 위치한 American Type Culture Collection (ATCC) 을 지칭한다.
- [0132] "NRRL"은 일리노이주 피오리아의 Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research (및 이전에는 USDA Northern Regional Research Laboratory 로 알려짐) 를 지칭한다.
- [0133] 수치 범위는 범위를 한정하는 숫자를 포함한다.
- [0134] 일반적으로, 제목은 기술적인 것으로, 제한하려 의도하지 않았다.

[0135]	1.2 약어	
[0136]	다르게 지시되지 않는 한 하기 약어들이 적용된다:	
[0137]	AE	알코올 에톡실레이트
[0138]	AEO	알코올 에톡실레이트
[0139]	AEOS	알코올 에톡시술폰레이트
[0140]	AES	알코올 에톡시술폰레이트
[0141]	AFAU	산 진균 α -아밀라아제 단위
[0142]	AGU	글루코아밀라아제 활성 단위
[0143]	AOS	α -올레핀술폰레이트
[0144]	AS	알코올 술폰레이트
[0145]	BAA	<i>바실러스 아밀로리쿠에파시엔스</i> α -아밀라아제
[0146]	BLA	<i>바실러스 리체니포르미스</i> (또는 LAT)
[0147]	BSA	소혈청 알부민
[0148]	cDNA	상보성 DNA
[0149]	CMC	카르복시메틸셀룰로오스
[0150]	DNA	데옥시리보핵산
[0151]	DP3	소단위가 3 개인 중합도
[0152]	DPn	소단위가 n 개인 중합도
[0153]	DTMPA	디에틸트리아민펜타아세트산
[0154]	EC	효소의 분류를 위한 효소 위원회
[0155]	EDTA	에틸렌디아민테트라아세트산
[0156]	EO	에틸렌 옥사이드
[0157]	F&HC	의류 및 가정 관리
[0158]	FAU	진균 아밀라아제 단위
[0159]	GA	글루코아밀라아제
[0160]	gpg	겔런 당 곡식
[0161]	HFCS	고 과당 옥수수 시럽
[0162]	HFSS	고 과당 전분계 시럽
[0163]	IPTG	이소프로필 β -D-티오갈락토시드
[0164]	LAS	선형 알킬벤젠술폰레이트
[0165]	LOM	세탁 견뢰도 시험기 (Launder-O-meter)
[0166]	LU	리퀴폰 (liquiphon) 단위
[0167]	MW	분자량
[0168]	MWU	개질 Wohlgemuth (볼게무트) 단위
[0169]	NOBS	노나노일옥시벤젠술폰레이트
[0170]	NTA	니트릴로트리아세트산

[0171]	PCR	중합효소 연쇄 반응
[0172]	PEG	폴리에틸렌글리콜
[0173]	PVA	폴리(비닐 알코올)
[0174]	PVP	폴리(비닐피롤리돈)
[0175]	RNA	리보핵산
[0176]	SAS	2차 알칸 술포네이트
[0177]	TAED	테트라아세틸에틸렌디아민
[0178]	TCA	트리클로로아세트산
[0179]	TSB	트립틱 소이 액체 배지 (tryptic soy broth)
[0180]	UFC	한외여과 농축물
[0181]	w/v	중량/부피
[0182]	w/w	중량/중량
[0183]	wt	야생형

[0184] **1.3 명명법**

- [0185] 본 상세한 설명 및 특허청구범위에서는, 아미노산 잔기들에 대해 통상적인 1-문자 및 3-문자 코드를 사용한다. 참조의 편의를 위해, 알파-아밀라아제 변이체는 하기 명명법을 이용하여 기술하였다:
- [0186] 본래의 아미노산(들): 위치(들): 치환된 아미노산(들).
- [0187] 상기 명명법에 따라, 예를 들어 242 위치에서의 세린의 알라닌으로의 치환은 하기와 같이 나타낸다:
- [0188] Ser242Ala 또는 S242A.
- [0189] 30 위치에서의 알라닌의 결실은
- [0190] Ala30* 또는 A30* 또는 ΔA30 와 같이 나타내고, 및
- [0191] 리신 등의 부가적인 아미노산 잔기의 삽입은 하기와 같이 나타낸다:
- [0192] Ala30AlaLys 또는 A30AK.
- [0193] 아미노산 잔기 30-33 등의 연속적으로 이어진 부분인 아미노산 잔기의 결실은 하기와 같이 나타낸다: (30-33)* 또는 Δ(A30-N33) 또는 Δ30-33. 아미노산 잔기 R180-S181 등의 2 개의 연속된 아미노산의 결실은 하기와 같이 나타낸다: ΔRS 또는 Δ180-181.
- [0194] 특정 알파-아밀라아제가 다른 알파-아밀라아제와 비교하여 "결실"을 포함하고 그 위치에 삽입이 이루어진 경우에는, 하기와 같이 나타낸다:
- [0195] *36Asp 또는 *36D (36 위치에서의 아스파르트산의 삽입의 경우).
- [0196] 다수의 돌연변이는 + 기호로 분리되는데, 즉 하기와 같다:
- [0197] Ala30Asp+Glu34Ser 또는 A30N+E34S
- [0198] (이는 30 및 34 위치에서 알라닌 및 글루탐산이 각각 아스파라긴 및 세린으로 치환된 돌연변이를 나타낸다).
- [0199] 주어진 위치에 하나 이상의 대안적인 아미노산 잔기가 삽입될 수 있을 때는 하기와 같이 나타낸다:
- [0200] A30N,E; 또는
- [0201] A30N 또는 A30E.

[0202] 나아가, 변경에 적합한 위치가 본원에서 임의의 특정 변경의 제안없이 나타나 있는 경우, 이는 임의의 아미노산 잔기가 상기 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 대체할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 즉, 예를 들어, 30 위치의 알라닌의 변경을 특정하지 않고 언급할 때, 상기 알라닌은 결실될 수도 있거나, 또는 다른 임의의 아미노산, 즉, 하기 중 임의의 것으로 치환될 수도 있음을 이해해야 한다:

[0203] R, N, D, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V.

[0204] 나아가, "A30X"는 하기 치환 중 임의의 하나를 의미한다:

[0205] A30R, A30N, A30D, A30C, A30Q, A30E, A30G, A30H, A30I, A30L, A30K, A30M, A30F, A30P, A30S, A30T, A30W, A30Y, 또는 A30 V.

[0206] 또는 간략히:

[0207] A30R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

[0208] 모체 효소 (번호부여에 사용된 것) 가 상기 위치에 치환용으로 제안된 해당 아미노산 잔기를 이미 갖고 있는 경우에는, 하기 명명법을 이용한다:

[0209] 예를 들어 N 또는 V 중 하나가 야생형으로 존재하고 있는 경우,

[0210] "X30N" 또는 "X30N,V". 즉, 이는 대응하는 다른 모체 효소들이 30 위치에서 "Asn" 또는 "Val"로 치환되어 있는 것을 의미한다.

[0211] 1.4 아미노산 잔기의 특징

[0212] 전하를 띤 아미노산:

[0213] Asp, Glu, Arg, Lys, His

[0214] 음전하를 띤 아미노산 (가장 - 가 큰 잔기를 맨 앞에 놓음):

[0215] Asp, Glu

[0216] 양전하를 띤 아미노산 (가장 + 가 큰 잔기를 맨 앞에 놓음):

[0217] Arg, Lys, His

[0218] 중성 아미노산:

[0219] Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Asn, Gln, Ser, Thr, Pro

[0220] 소수성 아미노산 잔기 (가장 소수성이 큰 잔기를 마지막에 나열함):

[0221] Gly, Ala, Val, Pro, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp,

[0222] 친수성 아미노산 (가장 친수성이 큰 잔기를 마지막에 나열함):

[0223] Thr, Ser, Cys, Gln, Asn

[0224] 1.5 상동성 (동일성)

[0225] 두 서열을 비교할 때, 다른 서열과 일정 비율 (예컨대, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 심지어 99%) 의 서열 동일성을 가진 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는, 정렬시에, 염기 또는 아미노산 잔기의 상기 비율이 동일한 것을 의미한다. 이러한 정렬 및 % 상동성 또는 동일성은 당업계에 공지된 임의의 적절한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌 [CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987, Supplement 30, 7.7.18 절)] 에 기재된 것들을 이용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램에는, Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG Pileup 프로그램, FASTA (Pearson et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 85:2444-2448), 및 BLAST (BLAST Manual, Altschul et al. Nat'l Cent. Biotechnol. Inf., Nat'l Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., 및 Altschul et al., (1997) NAR 25: 3389-3402) 이 포함된다. 또 다른 바람직한 정

렬 프로그램은 ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA) 로서, 바람직하게는 이것은 기본 매개 변수를 이용한다. 사용되는 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) 에서 이용가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

[0226] 상동성은 제 1 의 서열의 제 2 의 서열으로부터의 도출을 나타내는 두 서열들 간의 동일성 정도로서 측정될 수 있다. 상동성은 GCG 프로그램 패키지 (상술함) 에 제공된 GAP 등의 당업계에 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용해 적합하게 결정될 수 있다. 따라서, Gap GCG v8 는 동일성에 대한 기본 점수행렬 및 하기의 기본 매개 변수로 이용할 수 있다: 핵산 서열 비교에 관해서, 각각 5.0 의 격차 (gap) 생성 벌점 및 0.3 의 격차 확대 벌점, 및 단백질 서열 비교에 관해서, 각각 3.0 의 격차 생성 벌점 및 0.1 의 격차 확대 벌점. GAP 는 문헌 [Needleman 및 Wunsch, J Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)] 의 방법을 이용해 배열시키고, 상동성을 산출한다.

[0227] AmyTS23 (SEQ ID NO: 1) 과 예를 들어 또 다른 α -아밀라아제와의 구조적 정렬을 사용하여, AmyTS23 과의 상동성이 예를 들어 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 심지어 99% 의 높은 수준인 기타 알파-아밀라아제 내에서 동일한/상응하는 위치를 동정할 수 있다. 상기 구조적 정렬을 수득하는 한 가지 방법은 격차 벌점의 기본값, 즉 3.0 의 격차 생성 벌점 및 0.1 의 격차 확대 벌점을 이용한 GCG 패키지로부터 Pile Up 프로그램을 이용하는 것이다. 나머지 구조 정렬 방법들은 소수성 무리 분석 (Gaboriaud et al., FEBS Lett. 224: 149-155, 1987) 및 역 엮음 (reverse threading; Huber, T 및 Torda, AE, Protein Science. vol 7, No 1 pp: 142-149 (1998) 을 포함한다.

[0228] 1.6 혼성화

[0229] 상기에, AmyTS23 의 특징에 사용된 올리고뉴클레오타이드 프로브는 당해 α -아밀라아제의 전체 또는 일부 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 기초로 하여 적합하게 제조될 수 있다.

[0230] 혼성화를 시험하기 위한 적합한 조건에는 5X SSC 에서 예비-담금을 실시하고, 및 20% 포름아미드 용액, 5X Denhardt 용액, 50 mM 나트륨 포스페이트, pH 6.8, 및 50 mg 의 변성 음파처리 송아지 흉선 DNA 중 40℃ 에서 1 시간 동안 예비 혼성화한 후, 40℃ 에서 18 시간 동안 100 mM AMP 로 보충된 상기 동일한 용액 중 혼성화 후, 30 분간 40℃에서 (저 엄격성), 바람직하게는 50℃ 에서 (중간 엄격성), 더욱 바람직하게는 65℃ (고 엄격성), 보다 더욱 바람직하게는 75℃ 에서 (초 고 엄격성), 2X SSC, 0.2% SDS 중 필터를 3 회 세척하는 것을 포함한다. 혼성화 방법에 대한 매우 자세한 사항은 문헌 [Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989] 에서 찾아볼 수 있다.

[0231] 본 내용에서, "유래하다" 는 당해 유기체 군주에 의해 생산가능하거나 또는 생산된 알파-아밀라아제를 지칭할 뿐만 아니라, 그러한 군주에서 단리된 DNA 서열 및 상기 DNA 서열로 형질전환된 숙주 유기체에서 생성된 알파-아밀라아제를 지칭하는 것으로 의도된다. 마지막으로, 상기 용어는 합성 및/또는 cDNA 기원의 DNA 서열에 의해 인코딩되고, 당해 알파-아밀라아제의 동정된 특성을 갖는 알파-아밀라아제를 지칭하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 또한 모체 알파-아밀라아제가 천연 발생 알파-아밀라아제의 변이체, 즉 천연 발생 α -아밀라아제의 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형 (삽입, 치환, 결실) 의 결과인 변이체일 수 있음을 나타내는 것으로 사용된다.

[0232] 당업자는 본 조성물 및 방법에서 포함되는 서열이 예시한 amyTS23 서열 (예를 들어, 도 4 에 나타낸 SEQ ID NO: 4) 로 엄격한 혼성화 조건 하에서 혼성화하는 능력으로 정의할 수 있음을 인지할 것이다. 핵산의 단일 가닥 형태가 적절한 온도 및 용액 이온 세기 조건 하에서 다른 핵산과 어닐링할 때, 한 핵산이 다른 핵산 서열과 혼성화가능하다. 혼성화 및 세척 조건은 당업계에 익히 공지되어 있다 {예를 들어, Sambrook (1989) supra, 특히 챕터 9 및 11 참조}. 일부 구현예에서, 엄격한 조건은 65℃ 의 T_m 및 0.1 x SSC, 0.1% SDS 에 해당한다.

[0233] 1.7 모체 α -아밀라아제

[0234] 본 개시에 의하면, 임의의 상기에 정의된 바와 같은 AmyTS23 α -아밀라아제는 모체 (즉, 백본 (backbone)) α -아밀라아제로서 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 모체 α -아밀라아제는 바실러스 종 군주 TS-23, 예를 들어 SEQ ID NO: 1 에 나타낸 아미노산 서열 (도 1 참조) 을 갖는 TS-23 α -아밀라아제 등의 상기에 지시된 것 중 하나로부터 유래된다.

[0235] 1.8 변경된 특성

- [0236] 하기 섹션에, 본원에서 기술된 변이체 아밀라아제에 존재하는 돌연변이들 간의 관계 및 그로부터 야기될 수 있는 (모체 TS-23 α -아밀라아제의 특징들과 비교시) 바람직한 특징들의 변경을 기술하였다. 본 조성물 및 방법에 포함되는 변이체를 본 명세서 전체에 걸쳐 상세히 설명하고, 하기 문단에서는 단지 요약한다.
- [0237] 상술한 바와 같이, 조성물 및 발명의 한 측면은 모체 아밀라아제에 있어서 변경된 특성을 갖는 변이체/돌연변이체를 포함하는, *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제로부터 유래가능한 또는 유래된 α -아밀라아제에 관한 것이다. 모체 아밀라아제는 상술된 모체 TS-23 α -아밀라아제, 및 성숙 폴리펩티드의 아미노산 서열과 같이 적어도 TS-23 α -아밀라아제의 일부를 포함하는 하이브리드 또는 키메라 아밀라아제이다.
- [0238] *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 (SEQ ID NO: 1) 를 변이체 아밀라아제를 논의하기 위해 출발점으로 사용하나, *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제에 대해 상동성이 높은 다른 *바실러스* α -아밀라아제가 조성물 및 방법의 범위를 벗어나지 않으면서 모체 아밀라아제로서 역할할 수 있다. 이는, *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제와 비교시 오로지 소수의 서열만 상이한 서열을 포함하나, 본 개시의 대상인 치환, 결실 또는 삽입은 포함하지 않는 기타 천연-발생 *바실러스* α -아밀라아제에도 특히 해당된다.
- [0239] 본 조성물 및 방법의 제 1 측면에서, 모체 *바실러스* 종 균주 α -아밀라아제의 변이체가 제공되는데, 이때 상기 변이체는 하기 변경들 중 적어도 두 가지를 포함한다:
- [0240] (a) C-말단의 절단,
- [0241] (b) 번호 부여를 위해 SEQ ID NO: 1 을 이용하여, 아미노산 201 의 치환 (즉, M201), 또는
- [0242] (c) R180, S181, T182 및 G183 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2 개의 잔기의 결실. 아미노산 잔기의 번호부여는 SEQ ID NO:1 을 참고로 한다는 점에 유념한다. 일부 구현예에서, 변경은 (a) 및 (b) 를 포함한다. 기타 구현예에서, 변경은 (a) 및 (c) 를 포함한다. 일부 구현예에서, 변이체는 잔기 87, 잔기 225, 잔기 272, 및 잔기 282 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에서 치환을 추가로 포함할 수 있다. 변이체 아밀라아제는 바람직하게도, α -아밀라아제 활성을 갖는다. 명시된 특정 변경을 제외하고, 변이체 아밀라아제의 기타 잔류하는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열과 적어도 85% 아미노산 서열 동일성을 지닐 수 있다.
- [0243] 관련된 측면에서, 모체 AmyTS23 α -아밀라아제의 변이체가 제공되는데, 이때 변이체는 모체 α -아밀라아제와 적어도 85% 동일성을 갖고, C-말단의 절단을 포함하는 아미노산 서열을 가진다. 변이체는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시, 냉수에서 전분 얼룩에 대해 증가된 세정 활성을 가질 수 있다.
- [0244] 일부 구현예에서, C-말단의 절단을 포함하는 변이체는 위치 R180 및 S181 의 결실을 추가로 포함할 수 있다 (SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 기준으로 함). 생성 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 증가된 세제 안정성을 가질 수 있다.
- [0245] 일부 구현예에서, C-말단의 절단을 포함하는 변이체는 위치 201 (또 다시, SEQ ID NO:1 의 아미노산 서열을 참조함) 에서 잔기 치환을 추가로 포함할 수 있다. 생성 변이체는 모체 아밀라아제와 비교시 증가된 산화 안정성을 지닐 수 있다.
- [0246] 일부 구현예에서, 상술된 변이체 중 임의의 것은 잔기 87, 잔기 225, 잔기 272, 및 잔기 282 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에서 치환을 추가로 포함할 수 있다.
- [0247] **1.8.1 안정성**
- [0248] 본원에서 기술된 변이체 문맥에서, 매우 높은 온도 (즉 70 ~ 120°C) 및/또는 극 pH (즉, 저 또는 고 pH, 즉 각각 pH 4 ~ 6 또는 pH 8 ~ 11), 특히 60 ppm 미만의 유리 (즉, 결합되지 않음, 따라서 용액 상) 칼슘 농도에서, 변경된 안정성 (즉 더 높아지거나 또는 더 낮아진), 특히 개선된 안정성을 달성하는 면에 있어서 중요한 돌연변이 (아미노산 치환 및 결실 포함) 에는 "변경된 특성" 섹션에 나열된 돌연변이 중 임의의 것이 포함된다. 안정성은 하기 "방법" 섹션에 기술된 바와 같이 측정할 수 있다.
- [0249] **1.8.2 Ca^{2+} 안정성**
- [0250] 변경된 Ca^{2+} 안정성은, Ca^{2+} 고갈 하에서 효소의 안정성이 개선, 즉 더 높아지거나 또는 더 낮아진 안정성을 갖는 것을 의미한다. 현재 기술된 변이체의 문맥에서, 특히 높은 pH (즉, pH 8 ~ 10.5) 에서, 변경된 Ca^{2+} 안정

성, 특히 개선된 Ca^{2+} 안정성, 즉 더 높거나 또는 더 낮은 안정성을 달성하는 측면에서 중요한 돌연변이 (아미노산 치환 및 결실 포함) 에는 "변경된 특성" 섹션에서 나열된 돌연변이 중 임의의 것이 포함된다.

[0251] 1.8.3 특이 활성화

[0252] 추가 측면에서, 특히 10 ~ 60℃, 바람직하게 20 ~ 50℃, 특히 30 ~ 40 ℃ 의 온도에서 변경된 특이 활성화, 특히 증가 또는 감소된 특이 활성을 보이는 변이체를 수득하는 면에 있어서 중요한 돌연변이 (아미노산 치환 및 결실 포함) 에는, "변경된 특성" 섹션에 나열된 돌연변이 중 임의의 것이 포함된다. 특이 활성화는 하기 "방법" 섹션에 나타난 바와 같이 측정될 수 있다.

[0253] 1.8.4 산화 안정성

[0254] 기술한 변이체는 모체 알파-아밀라아제와 비교할 때, 변경된 산화 안정성, 특히 더 높은 산화 안정성을 가질 수 있다. 증가된 산화 안정성은 예를 들어 세제 조성물에서 유리하며, 감소된 산화 안정성은 전분 액화를 위한 조성물 내에서 유리할 수 있다. 산화 안정성은 하기 "방법" 섹션에 기술된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0255] 1.8.5 변경된 pH 프로파일

[0256] 특히 고 pH (즉, pH 8 내지 10.5) 또는 저 pH (즉, pH 4 내지 6) 에서, 변경된 pH 프로파일, 특히 개선된 활성을 갖는 변이체를 수득하는 면에서 중요한 위치 및 돌연변이에는, 활성화 부위 잔기에 근접하게 위치한 아미노산 잔기의 돌연변이가 포함된다.

[0257] 바람직한 특정 돌연변이/치환은 당해 위치에 대한 섹션 "변경된 특성" 에서 상기에 나열된 것이다. 적합한 검정은 하기 "방법" 섹션에 기술한다.

[0258] 1.8.6 세척 성능

[0259] 특히 고 pH (즉, pH 8.5-11) 에서, 개선된 세척 성능을 지닌 변이체를 수득하는 면에서 중요한 위치 및 돌연변이에는 당해 위치에 대한 섹션 "변경된 특성" 에서 상기 나열한 특정 돌연변이/치환이 포함된다. 세척 성능은 섹션 "방법" 에서 하기에 기술한 바와 같이 시험될 수 있다.

[0260] 2. α-아밀라아제 변이체의 제조 방법

[0261] 따라서, 한 측면은, 기타 이전에 결정된 아미노산 치환, 결실, 변위, 삽입 및 이들의 조합을 포함하는 재조합 형태를 형성하는데, 바실러스 중 균주 TS-23 α-아밀라아제 서열을 제공해, 바실러스 중 균주 TS-23 α-아밀라아제의 변이체를 제조한다. 이들 변이체는 추가의 생산성 증대, 증가된 pH 안정성, 증가된 온도 안정성, Ca^{2+} 에 대한 감소된 요구, 증가된 특이 활성화, 증가된 식기세척 또는 세척 성능, 증가된 용해성, 증가된 저장 안정성 또는 이들의 조합을 지닐 수 있다. 변이체를 재조합하여 생성하는 방법은 제공된 서열 및 벡터를 이용해, 또는 기타 당업계에 공지된 양식을 이용해 수행할 수 있다.

[0262] 유전자로 돌연변이를 도입하기 위한 여러 방법이 공지되어 있다. α-아밀라아제를 인코딩하는 DNA 서열의 클로닝의 간략한 논의 후에, α-아밀라아제-인코딩 서열 내 특정 부위에서 돌연변이를 발생시키는 방법을 논의할 것이다.

[0263] 2.1 α-아밀라아제를 인코딩하는 DNA 서열의 클로닝

[0264] 모체 α-아밀라아제를 인코딩하는 DNA 서열은 당업계에 익히 공지된 각종 방법을 이용하여, 당해 α-아밀라아제를 생산하는 임의의 세포 또는 미생물로부터 단리될 수 있다. 먼저, 게놈 DNA 및/또는 cDNA 라이브러리를, 연구되는 α-아밀라아제를 생산하는 유기체로부터 염색체 DNA 또는 메신저 RNA 를 이용하여 구축해야한다. 그 다음에, α-아밀라아제의 아미노산 서열이 공지되어 있는 경우에, 상동, 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브를 합성해 당해 유기체로부터 제조된 게놈 라이브러리로부터 α-아밀라아제-인코딩 클론을 동정하는데 사용할 수 있다. 다르게는, 공지의 α-아밀라아제 유전자와 상동인 서열을 함유하는 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브를, 저 엄격성의 세척 조건 및 혼성화를 이용해, α-아밀라아제-인코딩 클론을 동정하기 위한 프로브로서 사용할 수 있다.

[0265] 또한 또 다른 α-아밀라아제-인코딩 클론 동정 방법에는, 게놈 DNA 의 단편을 플라스미드 등의 발현 벡터 내로 삽입하여, α-아밀라아제-네거티브 박테리아를 생성 게놈 DNA 라이브러리로 형질전환시킨 다음, 형질전환된 박

테리아를 α -아밀라아제에 대한 기질을 함유하는 아가 (agar) 에 플레이팅시켜, α -아밀라아제를 발현하는 클론을 동정가능하게 하는 것을 포함한다.

[0266] 다르게는, 효소를 인코딩하는 DNA 서열은 예를 들어 S. L. Beaucage and M. H. Caruthers (1981) 에 의해 기술된 포스포아미다이트 방법 또는 Matthes et al. (1984) 에 의해 기술된 방법 등의 성립된 표준 방법들로 합성시켜 제조될 수 있다. 포스포아미다이트 방법에서, 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 자동 DNA 합성기 내에서 합성, 정제, 어닐링, 절찰 및 적절한 벡터내로 클로닝된다.

[0267] 마지막으로, DNA 서열은, 표준 기술에 따라, 합성, 게놈 또는 cDNA 기원의 단편들 (적절한 경우, 상기 단편들은 전 DNA 서열의 각종 부위에 상응함) 을 절찰시킴으로써 제조되는, 게놈 및 합성의 혼합 기원, 합성 및 cDNA 의 혼합 기원, 또는 게놈 및 cDNA 의 혼합 기원의 것일 수 있다. DNA 서열은 또한 특정 프라이머, 예를 들어 U.S. Pat. No. 4,683,202, 또는 R. K. Saiki et al (1988) 에서 기술된 프라이머를 이용해 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 으으로써 제조될 수도 있다.

[0268] 2.2 부위-특이적 돌연변이유발 (Site-directed Mutagenesis)

[0269] 일단, α -아밀라아제-인코딩 DNA 서열을 단리시키고, 돌연변이에 바람직한 부위가 식별되면, 합성 올리고뉴클레오티드를 이용해 돌연변이를 도입할 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 원하는 돌연변이 부위에 인접하는 (flanking) 뉴클레오티드 서열을 포함한다; 돌연변이체 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 합성 동안에 삽입된다. 특정 방법에서는, DNA 의 단일-가닥 간격을, α -아밀라아제-인코딩 서열을 연결해 α -아밀라아제 유전자를 갖는 벡터 내에 형성한다. 이어서, 원하는 돌연변이를 갖는 합성 뉴클레오티드를 상기 단일-가닥 DNA 의 상동 부분에 어닐링한다. 그 다음에 남은 간격을 DNA 중합효소 I (Klenow 단편) 로 채우고, 구축물을 T4 리가아제로 절찰한다. 이러한 방법의 구체적인 실시예는 Morinaga et al., (1984) 에 기술되어 있다. U.S. Pat. No. 4,760,025 는, 카세트의 적은 변경 수행으로, 다중 돌연변이를 인코딩하는 올리고뉴클레오티드의 도입을 개시하고 있다. 그러나, 훨씬 더 다양한 돌연변이가 Morinaga 방법으로 어느 때든 1 회 도입할 수 있는데, 그 이유는 다수의 각종 길이의 올리고뉴클레오티드를 도입할 수 있기 때문이다.

[0270] α -아밀라아제-인코딩 DNA 서열로 돌연변이를 도입하기 위한 또 다른 방법은, Nelson and Long (1989) 에 기술되어 있다. 이에 PCR 반응에서 프라이머들 중 하나로서 화학적으로 합성된 DNA 가닥을 이용하여 도입된 바람직한 돌연변이를 함유하는 PCR 단편의 3-단계 제조법이 포함된다. PCR 로 생성된 단편으로부터, 돌연변이를 지닌 DNA 단편을 제한핵산내부가수분해효소를 통해 분할시켜 단리시킬 수 있고, 이를 발현 플라스미드로 다시 삽입할 수 있다.

[0271] 변이체를 제공하는 대체 방법은, 예를 들어 WO 95/22625 (Affymax Technologies N. V.) 또는 WO 96/00343 (Novo Nordisk A/S), 또는 치환(들) 및/또는 결실(들) 등 당해 돌연변이(들) 을 포함하는 하이브리드 효소를 야기하는 기타 상응하는 기술에서 나타낸 바와 같은 유전자 셔플 (shuffling) 이 포함된다.

[0272] 2.3 α -아밀라아제 변이체의 발현

[0273] 상술한 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 대체 방법들을 통해 제조된 α -아밀라아제 변이체를 인코딩하는 DNA 서열을, 전형적으로 프로모터, 작동자, 리보솜 결합 부위, 번역 개시 신호 및 임의로는 억제자 유전자 또는 각종 활성화자 유전자를 인코딩하는 제어 서열을 포함하는 발현 벡터를 이용해, 변이체 아밀라아제 (즉, 효소) 를 발현시킬 수 있다.

[0274] α -아밀라아제 변이체를 인코딩하는 DNA 서열을 지닌 재조합 발현 벡터는 재조합 DNA 절차에 편리하게 적용될 수 있는 임의의 벡터일 수 있으며, 벡터의 선택은 종종 도입할 숙주 세포에 좌우될 것이다. 따라서, 벡터는 자가 복제 벡터, 즉, 복제가 염색체 복제와 독립적으로 일어나는, 염색체의 실재로서 존재하는 벡터, 예컨대, 플라스미드, 박테리오파지 또는 염색체의 요소, 미니-염색체 또는 인공 염색체일 수 있다. 다르게는, 벡터는 숙주 세포에 도입시, 숙주 세포 게놈에 통합되어, 피혼입 염색체(들)와 함께 복제되는 벡터일 수 있다.

[0275] 상기 벡터에서, DNA 서열은 적당한 프로모터 서열에 작동가능하게 연결되어야 한다. 프로모터는 선택된 숙주 세포에서 전사 활성을 나타내는 임의의 DNA 서열일 수 있고, 숙주 세포에 상동 또는 이종인 단백질을 인코딩하는 유전자로부터 유래된 것일 수 있다. 특별히 박테리아 숙주에서, 본 조성물 및 방법의 알파-아밀라아제 변이체를 인코딩하는 DNA 서열의 전사를 지휘하는 적당한 프로모터의 예는, *E. 콜리*의 *lac* 오페론의 프로모터, 스트렙토마이세스 코엘리컬러 (*Streptomyces coelicolor*) 아가라아제 유전자 *dagA* 프로모터, 바실러스 리체니포르미스 알파-아밀라아제 유전자 (*amyL*) 의 프로모터, 제오바실러스 스테아로테르모필루스 말토오스 생성 아밀라아제 유전자 (*amyM*) 의 프로모터, 바실러스 아밀로리쿠에파시엔스 알파-아밀라아제 (*amyQ*) 의 프로모터, 및 바

실러스 서브틸리스 *xyIA* 및 *xyIB* 유전자의 프로모터 등이다. 진균 숙주에서의 전사에 있어서, 유용한 프로모터의 예에는, *A. 오리제* (*oryzae*) TAKA 아밀라아제, *리조뮤코르 미에헤이* (*Rhizomucor miehei*) 아스파르트산 프로테이나아제, *A. 니게르* (*niger*) 중성 알파-아밀라아제, *A. 니게르* 산 안정성 알파-아밀라아제, *A. 니게르* 글루코아밀라아제, *리조뮤코르 미에헤이 리파아제*, *A. 오리제* 알칼리 프로테아제, *A. 오리제* 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 또는 *A. 니들란스* (*nidulans*) 아세트아미다아제를 인코딩하는 유전자로부터 유래된 것이다.

[0276] 상기 발현 벡터는 또한 본 조성물 및 방법의 알파-아밀라아제 변이체를 인코딩하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 적당한 전사 종결자 및, 진핵생물에서는 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 종결 및 폴리아데닐화 서열은 적당하게는 프로모터와 동일한 원천으로부터 유래된 것일 수 있다.

[0277] 벡터는 당해 숙주 세포에서 벡터의 복제를 가능하게 하는 DNA 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 서열의 예는 플라스미드 pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, 및 pIJ702 의 복제 원점들이다.

[0278] 상기 벡터는 또한 선별가능 마커, 예를 들어, 숙주 세포에서 결함을 보완하는 산물을 생성하는 유전자, 예컨대 *B. 서브틸리스* 또는 *B. 리체니포르미스*로부터의 *dal* 유전자, 또는 항생제 내성 예컨대, 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜 또는 테트라사이클린 내성을 부여하는 유전자를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 벡터는 하이그로마이신 내성을 부여하는 마커인, *amdS*, *argB*, *niaD* 및 *sC* 와 같은 *아스페르길루스* 선별 마커를 포함할 수 있고, 또는 선별을 예를 들어, WO 91/17243 에 기술한 바와 같이 공동-형질전환에 의해 달성할 수도 있다.

[0279] 세포내 발현은, 예컨대, 숙주 세포로서 특정 박테리아를 사용하는 경우 등에서, 일부 면에서 유리할 수 있으나, 일반적으로는, 발현이 세포외적인 것이 유리하다. 일반적으로, 본원에 언급된 *바실러스* 알파-아밀라아제는 발현된 프로테아제가 배양 배지 내로 분비될 수 있게 하는 선영역 (preregion) 을 포함한다. 원하는 경우, 상기 선영역을 상이한 선영역 또는 신호 서열로 대체할 수 있는데, 이는 각 선영역을 인코딩하는 DNA 서열의 치환에 의해 편리하게 달성된다.

[0280] 알파-아밀라아제 변이체, 프로모터, 종결자 및 기타 요소 각각을 인코딩하는 DNA 구축물을 결합하는데 사용되고, 이들을 복제에 필수적인 정보를 갖는 적합한 벡터 내로 삽입하는 절차는 당업자에게 익히 공지되어 있다 (예를 들어, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989 비교).

[0281] DNA 구축물 또는 발현 벡터 중 하나를 포함하는 단리된 세포는, 유리하게는 알파-아밀라아제 변이체의 제조합 생성에 숙주 세포로서 사용된다. 상기 세포를 상기 변이체를 인코딩하는 본 조성물 및 방법의 DNA 구축물로 형질전환할 수 있는데, 편리하게는 상기 DNA 구축물 (하나 이상의 복제물) 을 숙주 염색체 내에 혼입함으로써이다. 상기 혼입의 경우 일반적으로 DNA 서열이 세포내에 안정적으로 유지될 가능성이 더 높아 유리한 것으로 고려된다. 숙주 염색체 내로의 DNA 구축물의 혼입은 통상적인 방법에 따라, 예를 들어 상동 또는 이중 재조합에 의해 수행될 수 있다. 다르게는, 세포를 상이한 유형의 숙주 세포와 관련해 상기 기재한 바와 같은 발현 벡터로 형질전환시킬 수 있다. 상기 세포는 포유류 또는 곤충 등의 고등 유기체의 세포일 수 있으나, 바람직하게는 미생물 세포, 예를 들어 박테리아 또는 진균류 (효모 포함) 세포이다.

[0282] 적합한 박테리아의 예는 그람-양성 박테리아, 예를 들어 *바실러스 서브틸리스*, *바실러스 리체니포르미스*, *바실러스 쉐네투스*, *바실러스 브레비스*, *제오바실러스 스테아로테르모필루스*, *바실러스 알칼로필루스*, *바실러스 아밀로리쿠에파시엔스*, *바실러스 코아쿨란스*, *바실러스 키르쿨란스*, *바실러스 라우투스*, *바실러스 메가테리움* (*megaterium*), *바실러스 투링기엔시스*, 또는 *스트렙토마이세스 리비단스* 또는 *스트렙토마이세스 무리너스*, 또는 그람-음성 박테리아, 예를 들어 *E. coli* 이다. 박테리아의 형질전환은, 예를 들어 그 자체로 공지된 방식으로 적격 세포를 이용함으로써 원형질체 형질전환에 의해 행해질 수 있다.

[0283] 효모 유기체는 *사카로마이세스* (*Saccharomyces*) 또는 *스키조사카로마이세스* (*Schizosaccharomyces*), 예를 들어 *사카로마이세스 세레비시애* 종으로부터 선택되는 것이 유리할 수 있다. 사상 진균은 유리하게 *아스페르길루스* (*Aspergillus*) 종, 예를 들어, *아스페르길루스 오리제* 또는 *아스페르길루스 니게르*에 속할 수 있다. 진균 세포는, 당업계에 공지된 방식으로 원형질체 형성 및 형질전환 후 세포벽 재생성을 수반하는 방법에 의해 형질전환시킬 수 있다. *아스페르길루스* 숙주 세포의 형질전환에 적합한 절차는 예를 들어 유럽 특허 제 238023 호에 기재되어 있다.

[0284] 또 다른 측면에서는, 알파-아밀라아제 변이체를 제조하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 변이체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 상기 기재한 바와 같은 숙주 세포를 배양하고, 세포 및/또는 배양 배지로부터 변이체를 회수하는 것을 포함한다.

[0285] 세포를 배양하는데 사용되는 배지는 해당 숙주 세포를 성장시키고 알파-아밀라아제 변이체의 발현물을 수득하는데 적합한 임의의 통상적인 배지일 수 있다. 적당한 배지는 시판 공급업자로부터 입수가능하거나, 또는 공개된 방법에 따라, 예컨대, ATCC (American Type Culture Collection) 의 카탈로그에 기재된 바와 같이 하여, 제조할 수 있다.

[0286] 숙주 세포로부터 분리된 알파-아밀라아제 변이체는, 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 배지로부터 분리하고, 암모늄 술페이트와 같은 염에 의해 배지의 단백질 성분을 침전시킨 후, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피 절차를 사용하는 것을 포함하는, 익히 공지된 절차에 의해 배양 배지로부터 편리하게 회수될 수 있다.

[0287] 3. 산업적 응용

[0288] 본원에서 제시한 알파-아밀라아제 변이체는 다양한 산업적 응용에 허용되는 유용한 특성을 지닌다. 특히, 효소 변이체는 세척, 식기세척 및 경질 표면 세정용 세제 조성물의 구성요소로서 적용가능하다.

[0289] 변경된 특성을 갖는 하나 이상의 변이체는 전분 가공, 구체적으로 전분 전환, 특히 전분의 액화에 사용될 수 있다 {예를 들어, U.S. Pat. No. 3,912,590, EP 특허 출원 제 252 730 호 및 제 63 909 호, WO 99/19467, 및 WO 96/28567 로, 이들 전체를 본원에 참조인용함}. 본 조성물 및 방법의 변이체 이외에 또한 글루코아밀라아제, 풀룰라나아제 및 기타 알파-아밀라아제도 포함하는 전분 전환 목적용 조성물도 고려된다.

[0290] 또한, 전분 또는 전곡 (whole grain) 으로부터, 하나 이상의 변이체가 또한 감미제 및 에탄올, 예컨대 연료, 응용 및 공업용 에탄올의 생산에 특히 유용하다 (예를 들어, 그 전체가 본원에 참조 인용되어 있는 U.S. Pat. No. 5,231,017 를 참조).

[0291] 본원의 변이체는 또한 섬유, 직물 및 의류의 발호 {예를 들어, 그 전체가 본원에 참조인용되어 있는, WO 95/21247, U.S. Pat. No. 4,643,736, 및 EP 119,920 를 참조함}, 비어 제조 또는 양조, 펄프 및 종이 제조에 유용할 수 있다.

[0292] 3.1 전분 전환

[0293] 액화 및 당화 공정 등의 통상의 전분-전환 공정은, 예컨대, 본원에 참조로 포함되는 U.S. 특허 제 3,912,590 호 및 유럽 특허 공개공보 제 252,730 호 및 제 63,909 호에 기재되어 있다.

[0294] 일부 구현예에서, 전분을 당 또는 지방 대체물질 (fat replacer) 등의 보다 저분자량의 탄수화물 성분으로 분해하는 전분 전환 공정에는 탈분지화 단계가 포함된다.

[0295] 3.2 전분에서 당 전환

[0296] 전분을 당으로 전환하는 경우, 전분은 해중합된다. 이러한 해중합 공정은 전처리 단계 및 2 또는 3 가지 연속 공정 단계, 예컨대 액화 공정, 당화 공정 및 (목적하는 최종 생성물에 따라), 임의로는 이성질체화 공정으로 이루어질 수 있다.

[0297] 3.3 본래적 전분의 예비 처리

[0298] 본래적 전분은 미세 과립으로 이루어지는데, 이는 실온의 물에서 불용성이다. 수성 전분 슬러리를 가열할 경우, 과립이 팽창하여 종국에는 과열하여, 전분 분자들이 용액 중에 분산된다. 이러한 "겔라틴화" 공정 동안 점도가 급격히 증가한다. 전형적인 산업 공정에서 고체 수준이 30-40% 이므로, 전분을 취급가능하게 하기 위해서 묽게 하거나 또는 "액화"해야 한다. 오늘날 이러한 점도의 감소는 주로 효소적 분해로 달성한다.

[0299] 3.4 액화

[0300] 상기 액화 단계 동안, 장쇄의 전분은 알파-아밀라아제에 의해 분지형 및 선형의 보다 짧은 단위 (말토덱스트린) 로 분해된다. 상기 액화 공정은 105-110℃ 에서 5 내지 10 분간, 이어서 약 95℃ 에서 1-2 시간으로, pH 5.5 내지 6.2 에서 실시된다. 이러한 조건 하에서 최적의 효소 안정성을 확보하기 위해서, 1 mM 의 칼슘을 첨가한다(40 ppm 유리 칼슘 이온). 상기 처리 후 액화 전분은 "덱스트로스 당량" (DE) 이 10-15 가 될 것이다.

[0301] 3.5 당화

[0302] 액화 공정 후, 글루코아밀라아제 (예컨대, OPTIDEX[®] L-400) 및 탈분지화 효소, 예컨대 이소아밀라아제 (U.S. 특허 제 4,335,208 호) 또는 풀룰라나아제를 첨가하면 말토텍스트린이 텍스트로스로 전환된다. 본 단계 전에, 액화 알파-아밀라아제를 비활성화시켜 탈분지화 효소에 의해 적절히 가수분해될 수 없는 "파노스 (panose) 전구체"로 불리는 짧은 올리고당의 형성을 감소시키기 위해, 고온 (95℃ 초과) 을 유지하면서 pH 를 4.5 미만의 값으로 감소시킨다.

[0303] 온도를 60℃ 로 저하시키고, 글루코아밀라아제 및 탈분지화 효소를 첨가한다. 당화 공정은 24-72 시간 동안 진행된다.

[0304] 정상적으로는, 액화 단계 후 알파-아밀라아제의 변성시 당화 생성물의 약 0.2-0.5% 는 풀룰라나아제에 의한 분해가 불가능한 분지형 삼당류인 Glc *pa* l-6Glc *pa* l-4Glc (파노스) 이다. 당화 동안 상기 액화 단계의 활성 아밀라아제가 존재하는 경우 (즉, 변성이 일어나지 않은 경우), 상기 수준은 1-2% 정도로 높을 수 있는데, 이는 당화 수율을 현저히 저하시키므로 매우 바람직하지 않다.

[0305] 3.6 이성질체화

[0306] 상기 목적의 최종 당 생성물이 예컨대 고 과당 시럽인 경우, 텍스트로스 시럽을 과당으로 전환시킬 수 있다. 당화 공정 후에 pH 를 6-8 범위의 값, 바람직하게 pH 7.5 로 증가시키고, 이온 교환으로 칼슘을 제거한다. 상기 텍스트로스 시럽을 그 후, 예컨대, 고정화 글루코오스 이소머라아제 (예컨대, Gensweet[®] IGI-HF) 를 이용하여, 고 과당 시럽으로 전환시킨다.

[0307] 3.7 에탄올 생성

[0308] 일반적으로, 전곡으로부터 알코올 (에탄올) 을 생성하는 것은

[0309] 도정 (milling),

[0310] 액화,

[0311] 당화,

[0312] 발효의 4 가지 주요 단계로 분리될 수 있다.

[0313] 3.7.1 도정

[0314] 곡물은 구조를 개방하여 추가 가공을 가능하게 하기 위해 도정된다. 이용되는 두 가지 공정은 습식 또는 건식 도정이다. 건식 도정에서는, 전립 (whole kernel) 을 도정하여 이를 공정의 나머지 부분에서 사용한다. 습식 도정은 배아 및 거친가루 (전분 과립 및 단백질) 를 매우 양호하게 분리하는데, 일부 예외가 있으나, 시럽이 병행 제조되는 위치에 적용된다.

[0315] 3.7.2 액화

[0316] 상기 액화 공정에서, 전분 과립은 가수분해에 의해 가용화되어 대부분 DP 가 4 를 초과하는 말토텍스트린으로 변한다. 상기 가수분해는 산 처리에 의해 또는 알파-아밀라아제에 의해 효소적으로 실시가능하다. 제한적으로는 산 가수분해가 사용된다. 원료는 도정된 전곡 또는 전분 가공에서의 측류 (side stream) 일 수 있다.

[0317] 효소에 의한 액화는 전형적으로 3 단계의 고온 슬러리 공정으로 실시된다. 슬러리를 60-95℃, 바람직하게 80-85℃ 범위가 되도록 가열하고, 효소(들)를 첨가한다. 그런 다음 슬러리를 95-140℃, 바람직하게 105-125℃ 에서 제트 쿡킹 (jet cooking) 하고, 60-95℃ 로 냉각시킨 후, 여분의 효소(들)를 첨가하여 최종 가수분해를 달성한다. 상기 액화 공정은 pH 4.5-6.5, 전형적으로 5 내지 6 의 pH 에서 실시한다. 도정 및 액화된 곡물은 또한 매쉬로도 알려져 있다.

[0318] 3.7.3 당화

[0319] 효모에 의해 대사가가능한 DP₁₋₃ 의 저분자 당을 생성하기 위해서는, 상기 액화에서의 말토텍스트린을 추가로 가수분해해야 한다. 상기 가수분해는 전형적으로는 글루코아밀라아제를, 다르게는 알파-글루코시다아제, 또는 산 알파-아밀라아제를 이용하여 효소적으로 실시된다. 전체 당화 단계를 72 시간까지 계속할 수도 있으나, 전형적으로 40-90 분의 전-당화 (pre-saccharification) 및 이어서 발효 중 완전 당화 (SSF) 만을 실시하는 것

이 보통이다. 당화는 일반적으로 30-65℃, 전형적으로 약 60℃ 의 온도에서, 및 pH 4.5 에서 실시한다.

[0320] **3.7.4 발효**

[0321] 상기 매쉬에 효모 (전형적으로는 *사카로마이세스*종의 효모) 를 첨가하고, 24-96 시간, 예컨대 전형적으로 35-60 시간 동안 발효를 진행한다. 이때 온도는 26-34℃, 전형적으로는 약 32℃ 이고, pH 는 pH 3-6, 바람직하게 는 약 pH 4-5 이다.

[0322] 가장 광범위하게 사용되는 공정은 당화를 위한 유지 단계가 없는 동시 당화 및 발효 (SSF) 공정으로서, 이는 효모 및 효소가 함께 첨가된다는 것을 의미하는 것임을 유의해야 한다. SSF 를 실시할 때, 약 50℃ 초과 의 온도에서의 전-당화 단계를 발효 직전에 도입하는 것이 보통이다.

[0323] **3.8 증류**

[0324] 발효 후 매쉬를 증류하여 에탄올을 추출한다. 본 공정에 따라 수득되는 에탄올은, 예컨대, 연료 에탄올; 음용 에탄올, 즉, 음용의 중성 알코올; 또는 공업용 에탄올로 사용가능하다.

[0325] **3.9 부산물**

[0326] 상기 발효의 잔존물은 곡물로서, 이는 전형적으로 액체 형태 또는 건조된 상태로 동물 사료에 사용된다.

[0327] 액화, 당화, 발효, 증류, 및 에탄올 회수의 실시 방법에 대한 더욱 상세한 것은 당업자에 익히 공지되어 있다.

[0328] 본 공정에 따라서, 당화 및 발효는 동시적으로 또는 개별적으로 실시될 수 있다.

[0329] **3.10 펄프 및 종이 생산**

[0330] 본 알칼리 알파-아밀라아제는, 전분 강화 폐종이 및 카드보드로부터, 펄프, 종이 및 카드보드 등의 리그노셀룰로오스계 물질 제조에 사용될 수도 있는데, 특히 여기서는 7 초과 의 pH 에서 재펄프화 (repulping) 하며, 아밀라아제가 강화 전분의 분해를 통해 폐 물질의 분해를 촉진한다. 알파-아밀라아제는 특히 전분-코팅된 인쇄지로부터 제지 펄프를 제조하는 공정에서 유용하다. 상기 공정은 WO 95/14807 에 기술된 바와 같이 하기 단계를 포함해 수행할 수 있다:

- [0331] a) 종이를 분해하여 펄프를 제조함,
- [0332] b) 단계 a) 이전, 동안 또는 이후에, 전분-분해 효소로 처리함, 및
- [0333] c) 단계 a) 및 b) 이후에 펄프로부터 잉크 입자를 분리함.

[0334] 알파-아밀라아제는 또한 전분 변성에 매우 유용할 수 있으며, 이때 효소에 의해 변성된 전분이 탄산 칼슘, 카올린 및 점토 등의 알칼리 충전제와 함께 제지에서 사용된다. 본 조성물 및 방법의 α -아밀라아제로, 충전제의 존재하에서 전분을 변성시키는 것이 가능해질 수 있어, 더 간단한 통합 공정이 된다.

[0335] **3.11 식물, 섬유 및 의류의 발효**

[0336] 본 α -아밀라아제는 또한 섬유, 식물 또는 의류 발효에 매우 유용할 수도 있다. 식물 공정 산업에 있어서, 전통적으로 α -아밀라아제는 직조 (weaving) 동안, 위사 상에 보호 코팅으로서 역할하는 전분 함유 사이즈 (아교풀; size) 의 제거를 촉진시키는 발효 공정에서 보조제로서 사용된다. 직조 후 사이즈 코팅의 완벽한 제거는, 섬유를 세정 (scouring), 표백 및 염색하는 후속 공정에서 최적의 결과를 확보하는데 중요하다. 효소에 의한 전분 분쇄가 섬유 물질에 어떠한 해도 입히지 않기 때문에 바람직하다. 공정 비용을 줄이고 도정 처리량을 늘리기 위해서, 발효 공정은 종종 세정 및 표백 단계와 조합된다. 그러한 경우에, 알칼리 또는 산 화제와 같은 효소에 의한 것이 아닌 보조제가 전형적으로 사용되어 전분을 분쇄하는데, 그 이유는 통상의 알파-아밀라아제는 고 pH 수준 및 표백제와 그렇게 상용가능하지 않기 때문이다. 효소에 의하지 않은 전분 사이즈의 분쇄는 사용되는 다소 공격적인 화학품으로 인한 섬유 손상을 일부 발생시킨다. 따라서, 본 조성물 및 방법의 α -아밀라아제 변이체를 사용하는 것이 바람직할 수 있는데, 이는 이들이 알칼리 용액 내에서 개선된 성능을 갖기 때문이다. α -아밀라아제는 단독으로 또는 셀룰로오스-함유 섬유 또는 직물을 발효시에 셀룰라아제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0337] 발효 및 표백 공정은 당업계에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 이러한 공정은 본원에 참조인용되고 있는 WO 95/21247, U.S. Pat. No. 4,643,736, 및 EP 119,920 에 기술되어 있다.

- [0338] 발효용 시중 제품에는 Genencor 의 OPTISIZE® FLEX 이 포함된다.
- [0339] 하나 이상의 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체를 이용하는, 섬유 처리 방법 (예를 들어 식물 발효) 및 조성물도 또한 고려된다. 당업계에 익히 공지되어 있는 임의의 섬유-처리 방법에 효소가 사용될 수 있다. 예를 들어, U.S. 특허 No. 6,077,316 를 참조한다. 예를 들어, 한 측면에서, 섬유의 감촉 및 외향이 용액 중 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체와 직물을 접촉시키는 것을 포함하는 방법으로 개선된다. 한 측면에서, 섬유는 가압 하 용액으로 처리한다.
- [0340] 하나의 측면에서, 효소는 식물 직조 동안 또는 이후에, 또는 발효 단계 동안에, 또는 하나 이상의 추가적인 직물 가공 단계 동안에 적용된다. 직물의 직조 동안, 실은 상당한 기계적 스트레인 (mechanical strain) 에 노출된다. 기계 직기 (loom) 에서 직조하기 전, 이의 인장 강도를 증가시키고 파손을 방지하기 위해 경사를 종종 사이징 (sizing) 전분 또는 전분 유도체로 코팅한다. 상기 효소는 이러한 사이징 전분 또는 전분 유도체를 제거하기 위해 적용될 수 있다. 직물 직조 후, 섬유는 발효 단계를 거칠 수 있다. 이어서 하나 이상의 부가적인 섬유 가공 단계가 뒤따를 수 있다. 발효는 직물로부터 사이즈를 제거하는 작용이다. 직조 후, 균질하고 내세탁성 (wash-proof) 인 결과를 확보하기 위해서는 섬유의 추가 가공 전에 사이즈 코팅을 제거하여야 한다. 또한 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체의 작용에 의한 사이즈의 효소적 가수분해를 포함하는 발효 방법이 제공된다.
- [0341] 효소는, 수성 조성물 등에서, 세제 첨가제로서 면-함유 섬유를 비롯한 섬유의 발효를 위해 단독으로 또는 기타 발효 화학 시약 및/또는 발효 효소와 함께 사용될 수 있다. *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그 변이체는 또한 인디고-염색 데님 직물 및 의류에 스톤워시 룩 (stonewashed look) 을 생성하기 위한 조성물 및 방법에도 사용될 수 있다. 의복의 제조를 위해, 직물을 절단 및 재봉하여 의복 또는 의류가 되도록 할 수 있는데, 이들은 차후에 마감된다. 특히, 데님 청바지의 제조를 위해, 상이한 효소 마감 방법이 개발되었다. 데님 의류 마감은 통상적으로 효소 발효 단계로 시작하는데, 이 단계 동안 섬유에 유연성을 부여하고 면을 후속 효소 마감 단계에 좀 더 이용가능하게 하기 위해 의류에 대하여 전분가수분해 효소를 작용시킨다. 효소는 데님 의류 마감 (예를 들어, "바이오-스토닝 (bio-stoning) 공정"), 효소 발효 및 섬유에의 유연성 부여, 및/또는 마감 공정의 방법들에 사용가능하다. 아밀라아제 용량은 공정 유형에 따라 다르다. 용량이 적을수록 동일한 효소를 더 많은 용량으로 할 때보다 더 많은 시간을 요구한다. 그러나, 용액의 물리적인 제약에 의해 영향받는 것 이외에 존재하는 발효 아밀라아제 양에 대해서는 상한선은 없다. 따라서, 효소의 한계는 용액 내 가용할 수 있는 양일 것이다. 전형적으로, α -아밀라아제 등의 발효 효소는, 섬유의 중량에 대한 효소 단백질 약 0.00001% 내지 약 2%; 또는 섬유의 중량에 대한 효소 단백질 약 0.0001% 내지 약 1%; 섬유의 중량에 대한 효소 단백질 약 0.001% 내지 약 0.5% 의 양으로 처리 조성물에 혼입되고; 및 또 다른 예에서는, 섬유 중량에 대한 효소 단백질은 약 0.01% 내지 약 0.2% 일 것이다.
- [0342] **3.12 비어 제조**
- [0343] 본원에서 제공되는 변이체 α -아밀라아제는 또한 비어 제조 공정에서 매우 유용할 수 있다; α -아밀라아제는 전형적으로 매싱 공정 동안에 첨가될 것이다.
- [0344] **3.13 세제 조성물**
- [0345] 본원에 기재된 변이체 α -아밀라아제는 첨가될 수 있어, 이에 따라 세제 조성물의 성분이 될 수 있다.
- [0346] 본원에서 제공된 세제 조성물은 예를 들어 얼룩진 직물의 예비처리에 적합한 세탁 첨가제 조성물 및 린스가 첨가된 섬유 유연제 조성물을 포함하는 손 또는 기계 세탁물 세제 조성물로서 제형화될 수 있거나, 또는 일반적인 가정 경질 표면 세정 작업에서 사용하기 위한 세제 조성물로서 제형화될 수 있거나, 또는 손 또는 기계 식기세척 작업을 위해 제형화될 수 있다.
- [0347] 특정 측면에서, 본원에 기술된 변이체 효소를 포함하는 세제 첨가제가 본원에서 제공된다. 세제 첨가제뿐만 아니라 세제 조성물은 프로테아제, 리파아제, 퍼옥시다아제, 또 다른 전분분해 효소, 예를 들어 또다른 α -아밀라아제, 글루코아밀라아제, 말토제닉 아밀라아제, CGTase 및/또는 셀룰로오스, 만난아제 (예컨대, MANNASTAR™, Danisco U.S.A., Inc., Genencor Division), 펙티나아제, 펙틴 리아제, 큐티나아제, 및/또는 락카아제와 같은 하나 이상의 기타 효소를 포함할 수 있다.
- [0348] 일반적으로, 선택된 효소(들)의 특성은 선택되는 세제와 상용성이어야 하고 (즉, pH-최적, 기타 효소 및 비효소 성분과의 상용성, 등), 효소(들)은 유효량으로 존재해야 한다.

- [0349] 프로테아제: 적당한 프로테아제에는, 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것들이 포함된다. 미생물 기원인 것이 바람직하다. 화학적으로 개질되거나 단백질 조작된 돌연변이체도 또한 적당하다. 프로테아제는 세린 프로테아제 또는 메탈로프로테아제, 바람직하게, 알칼리성 미생물 프로테아제, 또는 트립신-유사 또는 키모트립신-유사 프로테아제일 수 있다. 알칼리성 프로테아제의 예는 서브틸리신, 특별히 *바실러스* 종으로부터 유래된 것들, 예컨대, 서브틸리신 Novo, 서브틸리신 Carlsberg, 서브틸리신 309, 서브틸리신 147, 및 서브틸리신 168 (WO 89/06279 에 기술됨) 이다. 트립신-유사 프로테아제의 예는 트립신 (예컨대, 돼지 또는 소 기원), 및 WO 89/06270 및 WO 94/25583 에 기술된 *푸사리움* 프로테아제이다.
- [0350] 유용한 프로테아제의 예에는 이에 제한되는 것은 아니나, WO98/23732, WO99/20770, WO92/19729, WO98/20115, WO 98/20116, 및 WO 98/34946 에 기술된 변이체가 포함되며, 특히 하기 위치 중 하나 이상에서 치환을 갖는 변이체가 포함된다: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 및 274.
- [0351] 예의 시판중인 프로테아제 효소에는, Alcalase[®], Savinase[®], Primase[®], Duralase[®], Esperase[®], 및 Kannase[®] (Novozyme A/S); Maxatase[®], Maxacal, Maxapem[®], Properase[®], Purafect[®], Purafect OxP[®], FN2[®], FN3[®] 및 FN4[®] (Genencor) 이 있다.
- [0352] 리파아제: 적당한 리파아제에는 박테리아 또는 진균 기원의 것이 포함된다. 화학적으로 개질되거나 단백질 조작된 돌연변이체도 또한 포함된다. 유용한 리파아제의 예로서는 이들에 한정되는 것은 아니나, *휴미콜라* (*Humicola*) (동의어 *테르모마이세스*), 예컨대, *H. 라누기노사* (*H. lanuginosa*) (*T. 라누기노수스* (*T. lanuginosus*)) (EP 제 258068 호 및 제 305216 호에 기재됨), 또는 *H. 인솔렌스* (*H. insolens*) (WO 96/13580 에 기재됨)로부터의 리파아제; *슈도모나스* 리파아제 (예컨대, *P. 알칼리게네스* (*P. alcaligenes*) 또는 *P. 슈도알칼리게네스* (*P. pseudoalcaligenes*); EP 제 218272 호), *P. 세파시아* (*P. cepacia*) (EP 제 331376 호), *P. 스투트제리* (*P. stutzeri*) (GB 1,372,034), *P. 플루오레센스* (*P. fluorescens*), *슈도모나스* 종 균주 SD 705 (WO 95/06720 및 WO 96/27002), *P. 위스콘시넨시스* (*P. wisconsinensis*) (WO 96/12012); *바실러스* 리파아제 (예컨대, *B. 서브틸리스* 유래의 것; Dartois 등 (1993) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253-360), *B. 스테아로테르모필루스* (JP 64/744992), 또는 *B. 푸밀러스* (*B. pumilus*) (WO 91/16422) 가 포함된다. 상기 제형물에의 사용이 고려되는 부가적인 리파아제 변이체에는 예를 들어 하기에 기재된 것들이 포함된다: WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 및 WO 97/07202.
- [0353] 시판중인 리파아제 효소에는 Lipolase[™] 및 Lipolase Ultra[™] (Novozymes A/S) 가 포함된다.
- [0354] 폴리에스테라아제: 적당한 폴리에스테라아제가 조성물에 포함될 수 있다. 적당한 폴리에스테라아제의 예는 WO 01/34899 및 WO 01/14629 에 기재된 것들이 포함된다.
- [0355] 아밀라아제: 하나 이상의 추가의 아밀라아제 (본원에서 기술된 변이체 아밀라아제(들) 에 더하여) 가 또한 포함될 수 있다. 적절한 아밀라아제 (α 및/또는 β) 는 박테리아 또는 진균 기원의 것일 수 있다. 화학적으로 개질되거나 또는 단백질 조작된 돌연변이체가 포함된다. 아밀라아제는, 예를 들어, *바실러스*, 예컨대 특정 균주 *B. 리체니포르미스* (GB 1,296,839 에 상세히 기술됨) 으로부터 수득된 α -아밀라아제를 포함한다. 유용한 α -아밀라아제의 예는 WO 94/18314, WO 96/39528, WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, 및 WO 97/43424 에 기술된 변이체이며, 특히 하기 위치에서 하나 이상이 치환된 변이체이다: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 및 444.
- [0356] 시판중인 α -아밀라아제는 DURAMYL[™], LIQUEZYME[™] TERMAMYL[™], NATALASE[™], STAINZYME[™] PLUS, STAINZYME[™] ULTRA, FUNGAMYL[™] 및 BAN[™] (Novozymes A/S), RAPIDASE[™] 및 PURASTAR[™] (Genencor) 이다.
- [0357] 셀룰라아제: 상기 조성물에는 셀룰라아제가 첨가될 수 있다. 적당한 셀룰라아제로서는, 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 들 수 있다. 화학적으로 개질되거나 단백질 조작된 돌연변이체도 포함된다. 적당한 셀룰라아제로서는 *바실러스*, *슈도모나스*, *트리코더마*, *휴미콜라*, *푸사리움*, *티엘라비아* (*Thielavia*), *아크레모니움* (*Acremonium*) 속으로부터의 셀룰라아제, 예컨대, U.S. 특허 제 4,435,307 호; 제 5,648,263 호; 제 5,691,178 호; 제 5,776,757 호; 및 WO 89/09259 에 기재된 *휴미콜라* 인솔렌스, *마이셀리오프토라 테르모필라* (*Myceliophthora thermophila*) 및 *푸사리움 옥시스포룸*으로부터 생성된 진균 셀룰라아제가 포함되나 이들로 제한되지는 않는다. 대표적인 *트리코더마 리이세이* 셀룰라아제는 U.S. Pat. No. 4,689,297, U.S. Pat. No.

5,814,501, U.S. Pat. No. 5,324,649, WO 92/06221 및 WO 92/06165 에 개시되어 있다. 대표적인 바실러스 셀룰라아제는 U.S. Pat. No. 6,562,612 에 개시되어 있다.

[0358] 시판중인 셀룰라아제로서는 Celluzyme® 및 Carezyme® (Novozymes A/S); Clazinase® 및 Puradax HA® (Genencor International, Inc.); 및 KAC-500(B)® (Kao Corporation) 을 들 수 있다.

[0359] 퍼옥시다아제/옥시다아제: 적당한 퍼옥시다아제/옥시다아제로는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 들 수 있다. 화학적으로 개질되거나 단백질 조작된 돌연변이체도 포함된다. 유용한 퍼옥시다아제의 예로서는, 예컨대 WO 93/24618, WO 95/10602, 및 WO 98/15257 에 기재된 것 등의 코프리누스 (*Coprinus*), 예를 들어, *C. 시네레우스* (*C. cinereus*) 및 이들의 변이체로부터의 퍼옥시다아제를 들 수 있다.

[0360] 시판중인 퍼옥시다아제로는 예를 들어, Guardzyme® (Novozymes A/S) 를 들 수 있다.

[0361] 상기 세제 효소(들)은, 하나 이상의 효소를 함유하는 별도의 첨가제를 첨가하거나, 이들 효소 모두를 포함하는 조합 첨가제를 첨가하여 세제 조성물에 포함시킬 수 있다. 본 조성물 및 방법의 세제 첨가제, 즉, 별도의 첨가제 또는 조합 첨가제는 과립, 액체, 슬러리 등으로 제형화될 수 있다. 바람직한 세제 첨가제 제형물은 과립, 특히 무(無)분진 과립, 액체, 특히 안정화된 액체, 또는 슬러리이다.

[0362] 무(無)-분진 과립에 대해서는 예컨대, U.S. 특허 제 4,106,991 호 및 제 4,661,452 호에 개시된 바와 같이 제조할 수 있고, 임의로는 당업계에서 공지된 방법으로 코팅할 수도 있다. 왁스성 코팅 물질의 예로서는 평균 몰중량이 1,000 내지 20,000 인 폴리(에틸렌 옥사이드) 제품 (예컨대, 폴리에틸렌글리콜, PEG); 16 내지 50 개의 에틸렌 옥사이드 단위를 갖는 에톡시화 노닐페놀; 에톡시화 지방 알코올 (이 때, 알코올의 탄소수는 12 내지 20 이고, 15 내지 80 개의 에틸렌 옥사이드 단위가 존재함); 지방 알코올; 지방산; 및 지방산의 모노- 및 디- 및 트리글리세리드가 있다. 유동층 기술에 의한 응용에 적당한 막-형성 코팅 물질의 예는 예를 들어, GB 1483591 에 제시되어 있다. 액체 효소 제제에 대해서는 예를 들어, 확립된 방법에 따라 프로필렌 글리콜 등의 폴리올, 당 또는 당 알코올, 락트산 또는 붕산을 첨가하여 안정화할 수 있다. 보호된 효소는 유럽 특허 제 238216 호에 개시된 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0363] 일반적으로, 상기 세제 조성물은 임의의 편리한 형태, 예를 들어, 바 (bar), 정제, 분말, 과립, 페이스트 또는 액체일 수 있다. 액체 세제는 수성일 수 있는데, 전형적으로 약 70% 이하의 물 및 0% 내지 약 30% 의 유기용매를 함유한다. 또한 약 30% 이하의 물을 함유하는 고밀도 세제 겔도 고려된다.

[0364] 세제 조성물은 하나 이상의 계면활성제를 포함하는데, 이들은 반-극성 (semi-polar) 을 포함하는 비-이온성, 및/또는 음이온성, 양이온성 및/또는 쯔비터이온성일 수 있다. 계면활성제는 전형적으로 0.1 중량% 내지 60 중량% 의 수준으로 존재한다.

[0365] 음이온성 계면활성제가 포함되는 경우, 상기 세제는 전형적으로 이를 약 1% 내지 약 40% 함유할 것인데, 이의 예는 선형 알킬벤젠설포네이트, α-올레핀설포네이트, 알킬 술페이트 (지방 알코올 술페이트), 알코올 에톡시설포네이트, 2차 알칸설포네이트, α-술포 지방산 메틸 에스테르, 알킬- 또는 알케닐숙신산, 또는 비누 등이다.

[0366] 비-이온성 계면활성제가 포함되어 있는 경우, 상기 세제는 이를 약 0.2% 내지 약 40% 함유할 것인데, 이의 예는 보통 알코올 에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 알킬폴리글리코사이드, 알킬디메틸아민옥사이드, 에톡시화 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 폴리히드록시 알킬 지방산 아미드, 또는 글루코사민의 N-아실-N-알킬 유도체 ("글루카미드") 이다.

[0367] 상기 세제는 0% 내지 약 65% 의 세제 강화제 또는 착화제, 예컨대 제올라이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스포네이트, 카르보네이트, 시트레이트, 니트릴로트리아세트산, 에틸렌디아민테트라아세트산, 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 알킬- 또는 알케닐숙신산, 가용성 실리케이트 또는 층상 실리케이트 (예컨대, Hoechst 사의 SKS-6) 를 함유할 수 있다.

[0368] 상기 세제는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 예로서는 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피리딘-N-옥사이드), 폴리(비닐이미다졸), 폴리카르복실레이트, 예컨대, 폴리아크릴레이트, 말레산/아크릴산 공중합체, 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체가 있다.

[0369] 상기 세제는, 과산-형성 표백 활성화제 (예를 들어, 테트라아세틸에틸렌디아민 또는 노나노일옥시벤젠설포네이트

트)와 배합될 수 있는, 과불산염 또는 과탄산염과 같은 H_2O_2 공급원을 포함할 수 있는 표백 시스템을 함유할 수 있다. 다르게는, 상기 표백 시스템은 퍼옥시산 (예컨대, 아미드, 이미드, 또는 술폰 유형의 퍼옥시산)을 포함할 수 있다. 표백 시스템은 또한 효소 표백 시스템일 수도 있다. 예를 들어, WO 05/056782를 참조한다.

[0370] 본 조성물의 상기 세제 조성물의 효소(들)는, 통상적인 안정화제, 예컨대, 폴리올 (예컨대, 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤), 당 또는 당 알코올, 락트산, 붕산, 또는 붕산 유도체 (예컨대, 방향족 붕산염 에스테르), 또는 페닐 보론산 유도체 (예컨대, 4-포르밀페닐 보론산)를 사용하여 안정화할 수 있고, 상기 조성물은 예를 들어, WO 92/19709 및 WO 92/19708에 기재된 바와 같이 제형화될 수 있다.

[0371] 상기 세제는 또한 예컨대 점토를 비롯한 섬유 유연제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 제침착방지제, 염료, 살균제, 형광 증백제, 가용화제, 변색 억제제, 및/또는 향료의 기타 통상의 세제 성분을 함유할 수 있다.

[0372] 상기 세제 조성물에, 특히 바실러스 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 이의 변이체를, 세척액 1 리터당 약 0.01 내지 약 100 mg의 효소 단백질, 예를 들어 세척액 1 리터당 약 0.05 내지 약 5.0 mg의 효소 단백질, 또는 세척액 1 리터당 약 0.1 내지 약 1.0 mg의 효소 단백질에 해당하는 양으로 첨가할 수 있는 것이 고려된다.

[0373] 본원에서 기술된 변이체 효소 중 하나 이상이 본원에 참조 인용되는 WO 97/07202에 개시된 세제 제형물에 추가적으로 혼입될 수 있다.

[0374] 4. 조성물 및 용도

[0375] 본원에서 기술된 변이체 효소 중 하나 이상은, 또한 본원에서 기술된 바와 같은 세제, 특히 세탁물 세제 조성물 및 식기세척 세제 조성물, 경질 표면 세정 조성물에서, 및 직물, 섬유 또는 의류 발호용, 펄프 및 종이 제조용, 비어 제조, 에탄올 생산 및 전분 전환 공정용 조성물에서, α -아밀라아제 변이체를 이용하는 방법에서 사용될 수도 있다.

[0376] 4.1 세탁물 세제 조성물 및 용도

[0377] 한 구현예에 따르면, 하나 이상의 바실러스 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 전형적으로 세탁 세제 조성물의 성분일 수 있다. 그러한 것으로서, 이는 무(無)-분진 과립, 안정화된 액체, 또는 보호된 효소의 형태로 세제 조성물에 포함될 수 있다. 건조 제형물은 과립 또는 미세과립의 형태일 수 있다. 무-분진 과립은 예컨대 미국 특허 제 4,106,991호 및 제 4,661,452호에 개시된 바와 같이 제조될 수 있고, 임의로는 당업계에 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다. 왁스성 코팅 물질의 예로서는 평균 몰 중량이 1,000 내지 20,000인 폴리(에틸렌 옥시드) 제품 (폴리에틸렌글리콜, PEG); 16 내지 50개의 에틸렌 옥시드 단위를 갖는 에톡시화 노닐페놀; 에톡시화 지방 알코올 (이때, 알코올의 탄소수는 12 내지 20이고, 여기에는 15 내지 80개의 에틸렌 옥시드 단위가 존재함); 지방 알코올; 지방산; 및 지방산의 모노- 및 디- 및 트리글리세리드가 있다.

유동층 기술에 의한 응용에 적합한 막-형성 코팅 물질의 예는 예를 들어, GB 특허 제 1483591호에 제시되어 있다. 액체 효소 제제는 예를 들어, 확립된 방법에 따라 프로필렌 글리콜과 같은 폴리올, 당 또는 당 알코올, 락트산 또는 붕산을 첨가하여 안정화할 수 있다. 기타 효소 안정화제는 당업계에 익히 공지되어 있다.

보호된 효소는 예를 들어 유럽 특허 제 238216호에 개시된 방법에 따라 제조할 수 있다. 폴리올은 단백질의 안정화제로서 뿐 아니라, 단백질 용해도 개선용으로서 인지되어 왔다. 예컨대, 문헌 [J.K.Kaushik 등, "Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose" *J. Biol. Chem.* 278: 26458-65 (2003)] 및 여기에 언급된 참조문헌들; 및 문헌 [Monica. Conti 등, "Capillary isoelectric focusing: the problem of protein solubility," *J. Chromatography* 757: 237-245 (1997)]를 참조한다.

[0378] 상기 조성물은 바실러스 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체를 주요 효소 성분으로서, 예를 들어 모노-성분 조성물을 포함할 수 있다. 다르게는, 상기 조성물은 아미노펩티다아제, 아밀라아제, 카르보히드라아제, 카르복시펩티다아제, 카탈라아제, 셀룰라아제, 키티나아제, 큐티나아제, 시클로텍스트린 글리코실트랜스퍼라아제, 데옥시리보뉴클레아제, 에스테라아제, α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 할로퍼옥시다아제, 인버타아제, 락카아제, 리파아제, 만노시다아제, 옥시다아제, 펙틴 가수분해 효소, 펩티도글루타미나아제, 퍼옥시다아제, 파이타아제, 폴리페놀옥시다아제, 단백질가수분해 효소, 리보뉴클레아제, 트랜스글루타미나아제, 또는 자일라나아제뿐 아니라 하기에 논의된 기타 효소들의 다중의 효소에 의한 활성을 포함할 수 있다. 부가적인 효소(들)은 아스페르길루스 속, 트리코더마 속,

휴미콜라 (예를 들어, *H. 인솔렌스*) 속, 및 *푸사리움* 속들에 속하는 미생물을 통해 생산가능하다. 아스페르길루스 속의 예시 구성원에는, *아스페르길루스 아쿨레아투스* (*aculeatus*), *아스페르길루스 아와모리* (*awamori*), *아스페르길루스 니게르*, 또는 *아스페르길루스 오리제*가 있다. *푸사리움* 속의 예시 구성원에는, *푸사리움 박트리디오이데스* (*bactridioides*), *푸사리움 세레알리스* (*cerealis*), *푸사리움 크록웰렌스* (*crookwellense*), *푸사리움 쿨모룸* (*culmorum*), *푸사리움 그라미네아룸* (*graminearum*), *푸사리움 그라미눔* (*graminum*), *푸사리움 헤테로스포룸* (*heterosporum*), *푸사리움 네군디니스* (*negundinis*), *푸사리움 옥시스포룸* (*oxysporum*), *푸사리움 레티쿨라툼* (*reticulatum*), *푸사리움 로세움* (*roseum*), *푸사리움 삼부시눔* (*sambucinum*), *푸사리움 사르코크로움* (*sarcocroum*), *푸사리움 술푸레움* (*sulphureum*), *푸사리움 토룰로숨* (*torulosum*), *푸사리움 트리코테시이오데스* (*trichothecioides*), 및 *푸사리움 베네나툼* (*venenatum*) 이 있다.

[0379] 세제 조성물은 임의의 유용한 형태, 예컨대, 분말, 과립, 페이스트 또는 액체일 수 있다. 액체 세제는, 전형적으로 약 70% 이하의 물 및 0% 내지 약 30% 의 유기 용매를 함유하는 수성일 수 있다. 또한 물을 약 30% 만 함유하는 고밀도 겔 유형의 형태일 수 있다. 효소의 안정성에 친화적인 임의의 세제 조성물 내에 효소를 사용할 수 있다. 효소는 일반적으로 공지된 캡슐화 형태, 예를 들어, 히드로겔 내에서의 과립화 또는 격리에 의해 유해한 성분으로부터 보호될 수 있다. 효소, 및 구체적으로 α -아밀라아제는 세탁 및 식기세척 용도로 제한되는 것이 아니라, 또한 표면 세정제, 전분 또는 바이오매스로부터의 에탄올 생성에도 또한 사용될 수 있다.

[0380] 세제 조성물은 하나 이상의 계면활성제를 포함하며, 이들은 각각 음이온성, 비이온성, 양이온성 또는 쯔비터이온성일 수 있다. 상기 세제는 통상 0 내지 약 50% 의 음이온성 계면활성제, 예컨대 선형 알킬벤젠술포네이트 (LAS); α -올레핀술포네이트 (AOS); 알킬 술폰레이트 (지방 알코올 술폰레이트) (AS); 알코올 에톡시술폰레이트 (AEOS 또는 AES); 2 차 알칸술포네이트 (SAS); α -술폰 지방산 메틸 에스테르; 알킬- 또는 알케닐숙신산; 또는 비누를 포함할 것이다. 조성물은 또한 0 내지 약 40% 의 비이온성 계면활성제, 예컨대 알코올 에톡실레이트 (AEO 또는 AE), 카르복실화 알코올 에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 알킬폴리글리코시드, 알킬디메틸아민 옥시드, 에톡실화 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 또는 폴리히드록시 알킬 지방산 아미드 (예를 들어, WO 92/06154 에 기술됨) 를 포함할 수 있다.

[0381] 상기 세제 조성물은 추가적으로 하나 이상의 기타 효소들, 예컨대 리파아제, 큐티나아제, 프로테아제, 셀룰라아제, 퍼옥시다아제, 및/또는 락카아제를 임의로 조합하여 포함할 수 있다. 상기를 참고한다.

[0382] 상기 세제는 약 1% 내지 약 65% 의 세제 강화제 또는 복합제, 예컨대 제올라이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스포네이트, 시트레이트, 니트릴로트리아세트산 (NTA), 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTMPA), 알킬- 또는 알케닐숙신산, 가용성 실리케이트 또는 층상 실리케이트 (예컨대, SKS-6, Hoechst 사 제조) 를 함유할 수 있다. 상기 세제는 또한 미강화 (unbuilt), 즉 본질적으로 세제 강화제가 없는 것일 수 있다.

[0383] 세제는 임의로는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 예로서는 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC), 폴리(비닐피롤리돈) (PVP), 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리(비닐 알코올) (PVA), 폴리카르복실레이트, 예컨대 폴리아크릴레이트, 말레산/아크릴산 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체를 들 수 있다.

[0384] 세제는, 테트라아세틸에틸렌디아민 (TAED) 또는 노나노일옥시벤젠술포네이트 (NOBS) 등의 과산-형성 표백 활성화제와 임의로 조합될 수 있는, 과불산염 또는 과탄산염과 같은 H_2O_2 공급원을 포함할 수 있는 표백 시스템을 함유할 수 있다. 다르게는, 표백 시스템은 예를 들어, 아미드, 이미드, 또는 술폰 유형의 퍼옥시 산을 포함할 수 있다. 표백 시스템은 또한, 예컨대 WO 2005/056783 에 기재된 것과 같은, 퍼히드롤라아제가 퍼옥시드를 활성화하는 효소 표백 시스템일 수 있다.

[0385] 상기 세제 조성물의 효소는 통상의 안정화제, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤 등의 폴리올; 당 또는 당 알코올; 락트산; 방향족 보레이트 에스테르 등의 붕산 또는 붕산 유도체를 사용하여 안정화할 수 있고; 상기 조성물은 예를 들어, WO 92/19709 호 및 WO 92/19708 호에 기재된 바와 같이 제형화될 수 있다.

[0386] 상기 세제는 또한 기타 통상의 세제 성분, 예컨대 점토를 포함하는 섬유 유연제, 거품 촉진제, 비누거품 억제제, 향부식제, 오염 현탁화제, 오염 제침착방지제, 염료, 살균제, 형광 증백제, 또는 향료를 함유할 수 있다.

[0387] pH (사용 농도의 수용액에서 측정) 는 통상 중성 또는 알칼리성, 예를 들어 pH 약 7.0 내지 약 11.0 이다.

- [0388] 바실러스 중 균주 TS-23 α- 아밀라아제 또는 그의 변이체를 포함하는 세제 조성물의 구체적인 형태는 하기를 포함하도록 제형화될 수 있다:
- [0389] 1) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도 (bulk density) 를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로서 계산됨) 약 7% 내지 약 12%; 알코올 에톡시설포네이트 (예컨대, C₁₂₋₁₈ 알코올, 1-2 에틸렌 옥시드 (EO)) 또는 알킬 설포네이트 (예컨대, C₁₆₋₁₈) 약 1% 내지 약 4%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C₁₄₋₁₅ 알코올, 7 EO) 약 5% 내지 약 9%; 탄산나트륨 (예컨대, Na₂CO₃) 약 14% 내지 약 20%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na₂O, 2SiO₂) 약 2 내지 약 6%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO₄) 약 15% 내지 약 22%; 황산나트륨 (예컨대, Na₂SO₄) 0% 내지 약 6%; 나트륨 시트레이트/시트르산 (예컨대, C₆H₅Na₃O₇/C₆H₈O₇) 약 0% 내지 약 15%; 과붕산나트륨 (예컨대, NaBO₃H₂O) 약 11% 내지 약 18%; TAED 약 2% 내지 약 6%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 2%; 중합체 (예컨대, 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG) 0-3%; 효소 (순수 효소로서 계산됨) 0.0001-0.1% 단백질; 및 미량 성분 (예컨대, 비누거품 억제제, 향료, 형광 증백제, 광표백제) 0 - 5%.
- [0390] 2) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산됨) 약 6% 내지 약 11%; 알코올 에톡시설포네이트 (예컨대, C₁₂₋₁₈ 알코올, 1-2 EO) 또는 알킬 설포네이트 (예컨대, C₁₆₋₁₈) 약 1% 내지 약 3%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C₁₄₋₁₅ 알코올, 7 EO) 약 5% 내지 약 9%; 탄산나트륨 (예컨대, Na₂CO₃) 약 15% 내지 약 21%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na₂O, 2SiO₂) 약 1% 내지 약 4%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO₄) 약 24% 내지 약 34%; 황산나트륨 (예컨대, Na₂SO₄) 약 4% 내지 약 10%; 나트륨 시트레이트/시트르산 (예컨대, C₆H₅Na₃O₇/C₆H₈O₇) 0% 내지 약 15%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 2%; 중합체 (예컨대, 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG) 1-6%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 미량 성분 (예컨대, 비누거품 억제제, 향료) 0-5%.
- [0391] 3) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산됨) 약 5% 내지 약 9%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO) 약 7% 내지 약 14%; 지방산으로서의 비누 (예컨대, C₁₆₋₂₂ 지방산) 약 1 내지 약 3%; 탄산나트륨 (Na₂CO₃ 으로서) 약 10% 내지 약 17%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na₂O, 2SiO₂) 약 3% 내지 약 9%; 제올라이트 (NaAlSiO₄ 로서) 약 23% 내지 약 33%; 황산나트륨 (예컨대, Na₂SO₄) 0% 내지 약 4%; 과붕산나트륨 (예컨대, NaBO₃H₂O) 약 8% 내지 약 16%; TAED 약 2% 내지 약 8%; 포스포네이트 (예컨대, EDTMPA) 0% 내지 약 1%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 2%; 중합체 (예컨대, 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG) 0-3%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 미량 성분 (예컨대, 비누거품 억제제, 향료, 형광 증백제) 0-5%.
- [0392] 4) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산됨) 약 8% 내지 약 12%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO) 약 10% 내지 약 25%; 탄산나트륨 (Na₂CO₃ 으로서) 약 14% 내지 약 22%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na₂O, 2SiO₂) 약 1% 내지 약 5%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO₄) 약 25% 내지 약 35%; 황산나트륨 (예컨대, Na₂SO₄) 0% 내지 약 10%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 2%; 중합체 (예컨대, 말레산/아크릴산 공중합체, PVP, PEG) 1-3%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 비누거품 억제제, 향료) 0 - 5%.
- [0393] 5) 하기를 포함하는 수성 액체 세제 조성물: 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산됨) 약 15% 내지 약 21%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO 또는 C₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO) 약 12% 내지 약 18%; 지방산으로서의 비누 (예컨대, 올레산) 약 3% 내지 약 13%; 알케닐숙신산 (C₁₂₋₁₄) 0% 내지 약 13%; 아미노에탄올 약 8% 내지 약 18%; 시트르산 약 2% 내지 약 8%; 포스포네이트 0% 내지 약 3%; 중합체 (예컨대, PVP, PEG) 0% 내지 약 3%; 붕산염 (예컨대, B₄O₇) 0% 내지 약 2%; 에탄올 0% 내지 약 3%; 프로필렌 글리콜 약 8% 내지 약 14%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 분산제, 비누거품 억제제, 향료, 형광 증백제) 0 - 5%.
- [0394] 6) 하기를 포함하는 수성 구조화 액체 세제 조성물: 선형 알킬벤젠설포네이트 (산으로 계산됨) 약 15% 내지 약 21%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C₁₂₋₁₅ 알코올, 7 EO, 또는 C₁₂₋₁₅ 알코올, 5 EO) 3-9%; 지방산으로서의 비누

(예컨대, 올레산) 약 3% 내지 약 10%; 제올라이트 (NaAlSiO_4 로서) 약 14% 내지 약 22%; 시트르산칼륨 약 9% 내지 약 18%; 붕산염 (예컨대, B_4O_7) 0% 내지 약 2%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 2%; 중합체 (예컨대, PEG, PVP) 0% 내지 약 3%; 부착 중합체, 예를 들어, 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체; 몰비 25:1, MW 3800) 0% 내지 약 3%; 글리세롤 0% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 분산제, 비누거품 억제제, 향료, 형광 증백제) 0 - 5%.

[0395] 7) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 지방 알코올 술페이트 약 5% 내지 약 10%; 에톡시화 지방산 모노에탄올아미드 약 3% 내지 약 9%; 지방산으로서의 비누 0-3%; 탄산나트륨 (예컨대, Na_2CO_3) 약 5% 내지 약 10%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na_2O , 2SiO_2) 약 1% 내지 약 4%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO_4) 약 20% 내지 약 40%; 황산나트륨 (예컨대, Na_2SO_4) 약 2% 내지 약 8%; 과붕산나트륨 (예컨대, $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$) 약 12% 내지 약 18%; TAED 약 2% 내지 약 7%; 중합체 (예컨대, 말레산/아크릴산 공중합체, PEG) 약 1% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 형광 증백제, 비누거품 억제제, 향료) 0 - 5%.

[0396] 8) 하기를 포함하는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 선형 알킬벤젠술포네이트 (산으로 계산됨) 약 8% 내지 약 14%; 에톡시화 지방산 모노에탄올아미드 약 5% 내지 약 11%; 지방산으로서의 비누 0% 내지 약 3%; 탄산나트륨 (예컨대, Na_2CO_3) 약 4% 내지 약 10%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na_2O , 2SiO_2) 약 1% 내지 약 4%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO_4) 약 30% 내지 약 50%; 황산나트륨 (예컨대, Na_2SO_4) 약 3% 내지 약 11%; 나트륨 시트레이트 (예컨대, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) 약 5% 내지 약 12%; 중합체 (예컨대, PVP, 말레산/아크릴산 공중합체, PEG) 약 1% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 비누거품 억제제, 향료) 0 - 5%.

[0397] 9) 하기를 포함하는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 선형 알킬벤젠술포네이트 (산으로 계산됨) 약 6% 내지 약 12%; 비이온성 계면활성제 약 1% 내지 약 4%; 지방산으로서의 비누 약 2% 내지 약 6%; 탄산나트륨 (예컨대, Na_2CO_3) 약 14% 내지 약 22%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO_4) 약 18% 내지 약 32%; 황산나트륨 (예컨대, Na_2SO_4) 약 5% 내지 약 20%; 나트륨 시트레이트 (예컨대, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) 약 3% 내지 약 8%; 과붕산나트륨 (예컨대, $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 약 4% 내지 약 9%; 표백 활성화제 (예컨대, NOBS 또는 TAED) 약 1% 내지 약 5%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 2%; 중합체 (예컨대, 폴리카르복실레이트 또는 PEG) 약 1% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 형광 증백제, 향료) 0-5%.

[0398] 10) 하기를 포함하는 수성 액체 세제 조성물: 선형 알킬벤젠술포네이트 (산으로 계산됨) 약 15% 내지 약 23%; 알코올 에톡시술포네이트 (예컨대, C_{12-15} 알코올, 2-3 EO) 약 8% 내지 약 15%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C_{12-15} 알코올, 7 EO, 또는 C_{12-15} 알코올, 5 EO) 약 3% 내지 약 9%; 지방산으로서의 비누 (예컨대, 라우르산) 0% 내지 약 3%; 아미노에탄올 약 1% 내지 약 5%; 나트륨 시트레이트 약 5% 내지 약 10%; 가용화제 (예컨대, 소듐 톨루엔술포네이트) 약 2% 내지 약 6%; 붕산염 (예컨대, B_4O_7) 0% 내지 약 2%; 카르복시메틸셀룰로오스 0% 내지 약 1%; 에탄올 약 1% 내지 약 3%; 프로필렌 글리콜 약 2% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 중합체, 분산제, 향료, 형광 증백제) 0-5%.

[0399] 11) 하기를 포함하는 수성 액체 세제 조성물: 선형 알킬벤젠술포네이트 (산으로 계산됨) 약 20% 내지 약 32%; 알코올 에톡실레이트 (예컨대, C_{12-15} 알코올, 7 EO, 또는 C_{12-15} 알코올, 5 EO) 6-12%; 아미노에탄올 약 2% 내지 약 6%; 시트르산 약 8% 내지 약 14%; 붕산염 (예컨대, B_4O_7) 약 1% 내지 약 3%; 중합체 (예컨대, 말레산/아크릴산 공중합체, 부착 중합체, 예컨대, 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체) 0% 내지 약 3%; 글리세롤 약 3% 내지 약 8%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 가용화제, 분산제, 향료, 형광 증백제) 0 - 5%.

[0400] 12) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: 음이온성 계면활성제 (선형 알킬벤젠술포네이트, 알킬 술페이트, α -올레핀술포네이트, α -술포 지방산 메틸 에스테르, 알칸술포네이트, 비누) 약 25% 내지 약 40%; 비이온성 계면활성제 (예컨대, 알코올 에톡실레이트) 약 1% 내지 약 10%; 탄산나트륨 (예컨대, Na_2CO_3) 약 8% 내지 약 25%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na_2O , 2SiO_2) 약 5% 내지 약

15%; 황산나트륨 (예컨대, Na_2SO_4) 0% 내지 약 5%; 제올라이트 (NaAlSiO_4) 약 15% 내지 약 28%; 과불산나트륨 (예컨대, $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0% 내지 약 20%; 표백 활성화제 (TAED 또는 NOBS) 약 0% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 미량 성분 (예컨대, 향료, 형광 증백제) 0 -3%.

[0401] 13) 상기 조성물 1)- 12) 에 기재된 바와 같은 세제 조성물로서, 이 때 선형 알킬벤젠술포네이트의 전부 또는 일부가 (C_{12} - C_{18}) 알킬 술페이트로 대체된 조성물.

[0402] 14) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: (C_{12} - C_{18}) 알킬 술페이트 약 9% 내지 약 15%; 알코올 에톡실레이트 약 3% 내지 약 6%; 폴리히드록시 알킬 지방산 아마이드 약 1% 내지 약 5%; 제올라이트 (예컨대, NaAlSiO_4) 약 10% 내지 약 20%; 층상 디실리케이트 (예컨대, Hoechst 사의 SK56) 약 10% 내지 약 20%; 탄산나트륨 (예컨대, Na_2CO_3) 약 3% 내지 약 12%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na_2O , 2SiO_2) 0% 내지 약 6%; 나트륨 시트레이트 약 4% 내지 약 8%; 과탄산나트륨 약 13% 내지 약 22%; TAED 약 3% 내지 약 8%; 중합체 (예컨대, 폴리카르복실레이트 및 PVP) 0% 내지 약 5%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 형광 증백제, 광표백제, 향료, 비누거품 억제제) 0 - 5%.

[0403] 15) 하기를 포함하는 적어도 600 g/L 의 용적 밀도를 갖는 과립으로서 제형화된 세제 조성물: (C_{12} - C_{18}) 알킬 술페이트 약 4% 내지 약 8%; 알코올 에톡실레이트 약 11% 내지 약 15%; 비누 약 1% 내지 약 4%; 제올라이트 MAP 또는 제올라이트 A 약 35% 내지 약 45%; 탄산나트륨 (Na_2CO_3 으로서) 약 2% 내지 약 8%; 가용성 실리케이트 (예를 들어, Na_2O , 2SiO_2) 0% 내지 약 4%; 과탄산나트륨 약 13% 내지 약 22%; TAED 1-8%; 카르복시메틸셀룰로오스 (CMC) 0% 내지 약 3%; 중합체 (예컨대, 폴리카르복실레이트 및 PVP) 0% 내지 약 3%; 효소 (순수 효소 단백질로서 계산됨) 0.0001-0.1%; 및 미량 성분 (예컨대, 형광 증백제, 포스포네이트, 향료) 0 - 3%.

[0404] 16) 상기 1) - 15) 에 기재된 바와 같은 세제 제형물로서, 안정화되거나 캡슐화된 과산을 부가적인 성분 또는 이미 상술한 표백 시스템에 대한 대체물로서 함유하는 제형물.

[0405] 17) 상기 1), 3), 7), 9), 및 12) 에 기재된 바와 같은 세제 조성물로서, 과불산염이 과탄산염으로 대체된 조성물.

[0406] 18) 상기 1), 3), 7), 9), 12), 14), 및 15) 에 기재된 바와 같은 세제 조성물로서, 망간 촉매를 부가적으로 함유하는 조성물. 망간 촉매는 예를 들어 문헌 [Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching, "Nature 369:637-639 (1994)"] 에 기술된 화합물 중 하나이다.

[0407] 19) 선형 알콕시화 1차 알코올과 같은 액체 비이온성 계면활성제, 강화제 시스템 (예컨대, 포스페이트), 효소 (들), 및 알칼리를 포함하는 비-수성 세제 액체로서 제형화된 세제 조성물. 상기 세제는 또한 음이온성 계면활성제 및/또는 표백 시스템을 포함할 수 있다.

[0408] *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 세제에 통상 사용되는 농도로 혼입될 수 있다. 현재, 세제 조성물에, *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 세척액 1 리터당 0.00001-1.0 mg (순수 효소 단백질로서 계산됨) 의 효소에 해당하는 양으로 첨가될 수 있는 것으로 고려된다.

[0409] 또 다른 구현예에서, 세제 조성물에 2,6- β -D-프록탄 히드롤라아제를 도입하여, 가정용 및/또는 공업용 직물/세탁물에 존재하는 균막의 제거/세정에 사용할 수 있다.

[0410] 상기 세제 조성물은 예를 들어 얼룩진 섬유의 예비 처리에 적합한 세탁 첨가제 조성물 및 린스가 첨가된 섬유 유연제 조성물을 비롯한 손세탁 또는 기계 세탁 세제 조성물로서 제형화될 수 있고, 또는 일반 가정용 경질 표면 세정 작업에 사용하기 위한 세제 조성물로서 제형화될 수 있고, 또는 손걸거지 또는 식기세척기 작업을 위해 제형화될 수 있다.

[0411] 특정 측면에서, 상기 세제 조성물은 2,6- β -D-프록탄 히드롤라아제, 하나 이상의 α -아밀라아제 변이체에 더하여 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체 및 하나 이상의 기타 세정 효소, 예컨대 프로테아제, 리파아제, 큐티나아제, 카르보히드라아제, 셀룰라아제, 펙티나아제, 만난아제, 아라비나아제, 갈락타나아제, 자일라나아제, 옥시다아제, 락카아제, 및/또는 퍼옥시다아제, 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0412] 일반적으로 선택된 효소(들)의 특성은 선택되는 세제와 상용성이어야 하고 (예컨대, 최적 pH, 기타 효소 및 비-

효소 성분과의 상용성, 등), 효소(들)는 유효한 양으로 존재해야 한다.

[0413] **4.2 식기세척 세제 조성물**

[0414] 본 α-아밀라아제는 또한 하기를 포함하는 식기 세척 세제 조성물에서 사용될 수 있다:

[0415] 1) 분말 자동 식기세척 조성물

[0416]	비이온성 계면활성제	0.4-2.5%
[0417]	나트륨 메타실리케이트	0-20%
[0418]	나트륨 디실리케이트	3-20%
[0419]	나트륨 트리포스페이트	20-40%
[0420]	탄산나트륨	0-20%
[0421]	과불산나트륨	2-9%
[0422]	테트라아세틸 에틸렌 디아민 (TAED)	1-4%
[0423]	황산나트륨	5-33%
[0424]	효소	0.0001-0.1%

[0425] 2) 분말 자동 식기세척 조성물

[0426]	비이온성 계면활성제	1 -2%
[0427]	(예를 들어, 알코올 에톡실레이트)	
[0428]	나트륨 디실리케이트	2-30%
[0429]	탄산나트륨	10-50%
[0430]	나트륨 포스포네이트	0-5%
[0431]	트리나트륨 시트레이트 디히드레이트	9-30%
[0432]	니트릴로트리나트륨 아세테이트 (NTA)	0-20%
[0433]	과불산나트륨 모노히드레이트	5-10%
[0434]	테트라아세틸 에틸렌 디아민 (TAED)	1-2%
[0435]	폴리아크릴레이트 중합체	6-25%
[0436]	(예를 들어, 말레산/아크릴산 공중합체)	
[0437]	효소	0.0001-0.1%
[0438]	향료	0.1-0.5%
[0439]	물	5-10 %

[0440] 3) 분말 자동 식기세척 조성물

[0441]	비이온성 계면활성제	0.5-2.0%
[0442]	나트륨 디실리케이트	25-40%
[0443]	나트륨 시트레이트	30-55%
[0444]	탄산나트륨	0-29%
[0445]	나트륨 바이카르보네이트	0-20%

[0446]	과붕산나트륨 모노히드레이트	0-15%
[0447]	테트라아세틸 에틸렌 디아민 (TAED)	0-6%
[0448]	말레산/아크릴산 공중합체	0-5%
[0449]	점토	1-3%
[0450]	폴리아미노산	0-20%
[0451]	나트륨 폴리아크릴레이트	0-8%
[0452]	효소	0.0001-0.1%
[0453]	4) 분말 자동 식기세척 조성물	
[0454]	비이온성 계면활성제	1 -2%
[0455]	제올라이트 MAP	15-42%
[0456]	나트륨 디실리케이트	30-34%
[0457]	나트륨 시트레이트	0-12%
[0458]	탄산나트륨	0-20%
[0459]	과붕산나트륨 모노히드레이트	7- 15%
[0460]	테트라아세틸 에틸렌	0-3%
[0461]	디아민 (TAED) 중합체	0-4%
[0462]	말레산/아크릴산 공중합체	0-5%
[0463]	유기 포스포네이트	0-4%
[0464]	점토	1-2%
[0465]	효소	0.0001-0.1%
[0466]	황산나트륨	잔량
[0467]	5) 분말 자동 식기세척 조성물	
[0468]	비이온성 계면활성제	1 -7%
[0469]	나트륨 디실리케이트	18-30%
[0470]	트리나트륨 시트레이트	10-24%
[0471]	탄산나트륨	12-20%
[0472]	모노퍼술페이트	15-21%
[0473]	(2 KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄)	
[0474]	표백 안정화제	0.1 -2%
[0475]	말레산/아크릴산 공중합체	0-6%
[0476]	디에틸렌 트리아민 펜타아세테이트,	0-2.5%
[0477]	펜타나트륨 염	
[0478]	효소	0.0001-0.1%

[0479]	황산나트륨, 물	잔량
[0480]	6) 세정 계면활성제 시스템을 갖는 분말 및 액체 식기세척 조성물	
[0481]	비이온성 계면활성제	0-1.5%
[0482]	옥타데실 디메틸아민 N-옥시드 디히드레이트	0-5%
[0483]	옥타데실 디메틸아민 N-옥시드 디히드레이트	0-4%
[0484]	및 헥사데실디메틸 아민 N-옥시드 디히드레이트의	
[0485]	80:20 wt. C18/C16 블렌드	
[0486]	옥타데실 비스(히드록시에틸)아민 N-옥시드 무수물	0-5%
[0487]	및 헥사데실 비스(히드록시에틸)아민 N-옥시드 무수물	
[0488]	의 70:30 wt. C18/C16 블렌드	
[0489]	에톡시화 평균 정도가 3 인 C ₁₃ -C ₁₅ 알킬	0-10%
[0490]	에톡시술페이트	
[0491]	에톡시화 평균 정도가 3 인 C ₁₂ -C ₁₅ 알킬	0-5%
[0492]	에톡시술페이트	
[0493]	에톡시화의 평균 정도가 12 인 C ₁₃ -C ₁₅	0-5%
[0494]	에톡실화 알코올	
[0495]	에톡시화 평균 정도가 9 인 C ₁₂ -C ₁₅	0-6.5%
[0496]	에톡실화 알코올 블렌드	
[0497]	에톡실화 평균 정도가 30 인 C ₁₃ -C ₁₅	0-4%
[0498]	에톡실화 알코올 블렌드	
[0499]	나트륨 디실리케이트	0-33%
[0500]	나트륨 트리폴리포스페이트	0-46%
[0501]	나트륨 시트레이트	0-28%
[0502]	시트르산	0-29%
[0503]	탄산나트륨	0-20%
[0504]	과불산나트륨 모노히드레이트	0-11.5%
[0505]	테트라아세틸 에틸렌 디아민 (TAED)	0-4%
[0506]	말레산/아크릴산 공중합체	0-7.5%
[0507]	황산나트륨	0-12.5%
[0508]	효소	0.0001-0.1%
[0509]	7) 비-수성 액체 자동 식기세척 조성물	
[0510]	액체 비이온성 계면활성제	2.0-10.0%
[0511]	(예를 들어, 알코올 에톡실레이트)	

[0512]	알칼리 금속 실리케이트	3.0-15.0%
[0513]	알칼리 금속 포스페이트	20.0-40.0%
[0514]	고급 글리콜, 폴리글리콜, 폴리옥시드,	25.0-45.0%
[0515]	글리콜에테르로부터 선택된 액체 담체	
[0516]	안정화제	0.5-7.0%
[0517]	(예를 들어, 인산 및 C ₁₆ -C ₁₈ 알칸올의 부분 에스테르)	
[0518]	거품 억제제 (예를 들어, 실리콘)	0-1.5%
[0519]	효소	0.0001-0.1%
[0520]	8) 비-수성 액체 식기세척 조성물	
[0521]	액체 비이온성 계면활성제	2.0-10.0%
[0522]	(예를 들어, 알코올 에톡실레이트)	
[0523]	나트륨 실리케이트	3.0-15.0%
[0524]	알칼리 금속 카르보네이트	7.0-20.0%
[0525]	나트륨 시트레이트	0.0-1.5%
[0526]	안정화 시스템 (예를 들어, 미세 실리콘 및	0.5-7.0%
[0527]	저분자량 디알킬 폴리글리콜 에테르의 혼합물)	
[0528]	저분자량 폴리아크릴레이트 중합체	5.0-15.0%
[0529]	점토 겔 증점제 (예를 들어, 벤토나이트)	0.0-10.0%
[0530]	히드록시프로필 셀룰로오스 중합체	0.0-0.6%
[0531]	효소	0.0001-0.1%
[0532]	고급 글리콜, 폴리글리콜, 폴리옥시드 및	잔량
[0533]	글리콜 에테르로부터 선택되는 액체 담체	
[0534]	9) 요변성 액체 자동 식기세척 조성물	
[0535]	C ₁₂ -C ₁₄ 지방산	0-0.5%
[0536]	블록 공중합체 계면활성제	1.5-15.0%
[0537]	나트륨 시트레이트	0-12%
[0538]	나트륨 트리폴리포스페이트	0-15%
[0539]	탄산나트륨	0-8%
[0540]	알루미늄 트리스테아레이트	0-0.1%
[0541]	나트륨 큐멘 술포네이트	0-1.7%
[0542]	폴리아크릴레이트 증점제	1.32-2.5%
[0543]	나트륨 폴리아크릴레이트	2.4-6.0%
[0544]	붕산	0-4.0%

[0545]	나트륨 포르메이트	0-0.45%
[0546]	칼슘 포르메이트	0-0.2%
[0547]	나트륨 n-데시디페닐 옥시드 디술포네이트	0-4.0%
[0548]	모노에탄올 아민 (MEA)	0-1.86%
[0549]	나트륨 히드록시드 (50%)	1.9-9.3%
[0550]	1,2-프로판디올	0-9.4%
[0551]	효소	0.0001-0.1%
[0552]	비누거품 억제제, 염료, 향료, 물	잔량
[0553]	10) 액체 자동 식기세척 조성물	
[0554]	알코올 에톡실레이트	0-20%
[0555]	지방산 에스테르 술포네이트	0-30%
[0556]	나트륨 도데실 술포에이트	0-20%
[0557]	알킬 폴리글리코시드	0-21%
[0558]	올레산	0-10%
[0559]	나트륨 디실리케이트 모노히드레이트	18-33%
[0560]	나트륨 시트레이트 디히드레이트	18-33%
[0561]	나트륨 스테아레이트	0-2.5%
[0562]	과불산나트륨 모노히드레이트	0-13%
[0563]	테트라아세틸 에틸렌 디아민 (TAED)	0-8%
[0564]	말레산/아크릴산 공중합체	4-8%
[0565]	효소	0.0001-0.1%
[0566]	11) 보호된 표백 입자를 함유하는 액체 자동 식기세척 조성물	
[0567]	나트륨 실리케이트	5-10%
[0568]	테트라포타슘 피로포스페이트	15-25%
[0569]	나트륨 트리포스페이트	0-2%
[0570]	탄산칼륨	4-8%
[0571]	보호된 표백 입자, 예를 들어 염소	5-10%
[0572]	중합체계 증점제	0.7-1.5%
[0573]	포타슘 히드록시드	0-2%
[0574]	효소	0.0001-0.1%
[0575]	물	잔량
[0576]	11) 과불산염이 과탄산염으로 대체된, 1), 2), 3), 4), 6) 및 10) 에 기술된 자동 식기세척 조성물.	

- [0577] 12) 망간 촉매를 추가로 포함하는 1)-6) 에 기술된 바와 같은 자동 식기세척 조성물. 망간 촉매는, 예를 들어 문헌 ["Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994 pp, 637-639] 에 기술된 화합물들 중 하나일 수 있다.
- [0578] **4.3 균막 제거 조성물 및 용도**
- [0579] 상기 조성물은 주요 효소 성분으로서 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체를 포함할 수 있는데, 예컨대, 균막 제거에 사용하기 위한 1 성분 조성물일 수 있다. 다르게는, 상기 조성물은 균막 제거를 위해 다중 효소 활성, 예컨대 다수의 아밀라아제, 또는 아미노펩티다아제, 아밀라아제 (β -, 또는 α -, 또는 글루코아밀라아제), 카르보히드라아제, 카르복시펩티다아제, 카탈라아제, 셀룰라아제, 키티나아제, 큐티나아제, 시클로텍스트린 글리코실트랜스퍼라아제, 테옥시리보뉴클레아제, 에스테라아제, α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 할로퍼옥시다아제, 인버타아제, 락카아제, 리파아제, 만노시다아제, 옥시다아제, 펙틴 가수분해 효소, 펩티도글루타미나아제, 퍼옥시다아제, 파이타아제, 폴리페놀옥시다아제, 단백질가수분해 효소, 리보뉴클레아제, 트랜스글루타미나아제, 및/또는 자일라나아제를 포함하는 효소들의 콕테일, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 부가적인 효소(들)는 *아스페르길루스* 속, *트리코더마*, *휴미콜라* (예를 들어, *H. 인솔렌스*) 속, 및 *푸사리움* 속에 속하는 미생물을 통해 생성될 수 있다. *아스페르길루스* 속의 예시 구성원으로는 *아스페르길루스 아쿨레아투스*, *A. 아와모리*, *A. 니게르*, 및 *A. 오리제*가 포함된다. *푸사리움* 속의 예시 구성원에는 *F. 박트리디오이데스*, *F. 세레알리스*, *F. 크록웰렌스*, *F. 클로룸*, *F. 그라미네아룸*, *F. 그라미눔*, *F. 헤테로스포룸*, *F. 네균디니스*, *F. 옥시스포룸*, *F. 레티쿨라툼*, *F. 로세움*, *F. 삼부시눔*, *F. 사르코크로움*, *F. 스펀레움*, *F. 토룰로숨*, *F. 트리코테시오이데스*, 및 *F. 베네나툼*이 포함된다.
- [0580] 상기 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체 포함 조성물은 당업계에 공지된 방법에 따라 제조가능하고, 액체 또는 건조 조성물의 형태일 수 있다. 예를 들어, *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체 함유 조성물은 과립 또는 미세과립의 형태일 수 있다. 조성물에 포함되는 폴리펩티드는 당업계에 공지된 방법에 따라 안정화할 수 있다.
- [0581] 폴리펩티드 조성물의 용도에 대한 예가 하기에 제시된다. *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체 함유 조성물의 투여량 및 조성물이 사용되는 기타 조건은 당업계에 공지된 방법에 근거해 결정가능하다.
- [0582] *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 2,6- β -D-프룩탄 히드롤라아제 또는 이의 변이체와 함께 조성물에 사용하는 것이 추가로 고려된다.
- [0583] 또 다른 측면은 균막의 분해 및/또는 제거를 위한 조성물 및 방법이다. 본원에 사용된 용어 "분해"는 균막 내의 개별 미생물 세포들을 함께 연결 및 결합시키는 균막 매트릭스 내의 다당류의 가수분해로서 이해되어야 하며, 이렇게 하여 미생물 세포는 균막으로부터 방출 및 제거될 수 있다. 균막은 표면에 존재할 수 있는데; 균막의 분해는 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체, 또는 균막의 분해를 담당하는 하나 이상의 기타 효소 (예컨대, 이에 한정되는 것은 아니나 2,6- β -D-프룩탄 히드롤라아제)를 포함하는 수성 매질에 상기 표면을, 예를 들어, 침지, 이로 덮음 또는 이를 뿌림에 의해, 접촉시켜 달성할 수 있다. 상기 조성물은 점액질, 예를 들어 펄프 및 제지 산업에서의 백수 (white water)에서의 점액질을 가수분해하는데 사용될 수 있다.
- [0584] 상기 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 0.0001 내지 10000 mg/L, 0.001 - 1000 mg/L, 0.01 -100 mg/L, 또는 0.1 -10 mg/L 의 양으로 존재할 수 있다. 부가적인 효소 및 효소 변이체는 이와 유사하거나 더 적은 양으로 존재할 수 있다.
- [0585] 공정은 대략 주위 온도 내지 약 70°C 의 온도에서 수행될 수 있다. 적당한 온도 범위는 약 30°C 내지 약 60°C, 예컨대, 약 40°C 내지 약 50°C 이다.
- [0586] 균막의 가수분해에 적당한 pH 는 약 3.5 내지 약 8.5 이다. 대표적인 pH 범위는 약 5.5 내지 약 8, 예컨대, 약 6.5 내지 약 7.5 이다. 효소 변이체가 균막을 효과적으로 제거하기 위한 접촉 시간 또는 반응 시간은 균막 특성 및 표면을 효소 변이체 단독 또는 2,6- β -D-프룩탄 히드롤라아제와 같은 다른 효소와 조합된 것으로 처리하는 빈도에 따라, 상당히 다를 수 있다. 대표적인 반응 시간은 약 0.25 내지 약 25 시간, 및 약 1 내지 약 10 시간, 예컨대 약 2 시간이다.

- [0587] *바실러스* 중 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체, 및 2,6- β -D-프룩탄 히드롤라아제와 조합될 수 있는 추가의 균막 분해 효소는 이에 제한되는 것은 아니나, 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제, 자일라나아제, 기타 α -아밀라아제를 포함하는 기타 아밀라아제, 리파아제, 프로테아제, 및/또는 펙티나아제가 포함된다.
- [0588] *바실러스* 중 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 효소성 또는 비(非)효소성-살생물제 등의 항균제와 배합될 수 있다. 효소성 살생물제는, 산화환원효소, 예컨대, 락카아제 또는 퍼옥시다아제, 특별히 할로퍼옥시다아제, 및 임의로 예를 들어 PCT 출원 WO 97/42825 및 DK 97/1273 에 기재된 바와 같은, 알킬 시린게이트 등의 증강제를 포함한 조성물일 수 있다.
- [0589] 균막이 제거되고/되거나 세정 제거되는 표면은 경질 표면일 수 있는데, 이는 정의상 미생물에 본질적으로 비-투과성인 임의의 표면에 관련된 것이다. 이의 예는, 임의로는 페인트, 에나멜, 중합체 등으로 코팅될 수 있는, 금속, 예컨대, 스테인레스 스틸 합금, 플라스틱/합성 중합체, 고무, 판자, 유리, 목재, 종이, 직물, 콘크리트, 바위, 대리석, 석고 및 세라믹 물질로부터 제조된 표면이다. 따라서, 표면은 급수 시스템, 식품 가공 시스템, 냉각 시스템, 화학적 처리 시스템, 약제 가공 시스템 등의 수용액을 보유, 이송, 처리 또는 접촉하는 시스템의 한 구성원일 수 있다. 펄프 및/또는 종이 산업 등의 목재 가공 산업에서, 균막을 제거하기 위한 조성물을 이용하는 방법 및 조성물이다. 따라서, 상기 효소를 함유한 조성물 및 상기 효소는 통상의 제자리-세정 (cleaning-in-place: C-I-P) 시스템에 유용하다. 상기 표면은 파이프, 탱크, 펌프, 막, 필터, 열 교환기, 원심분리기, 증발기, 믹서, 분무탑 (spray tower), 밸브 및 반응기와 같은 시스템 장치의 한 구성원일 수 있다. 상기 표면은 또한 오염된 내시경, 보철 장치 또는 의료용 이식물과 같은 의료 과학 및 산업에서 사용되는 기구 또는 그의 일부일 수 있다.
- [0590] 균막 제거용 조성물로는 또한 수송관 등의 금속 표면에 미생물 균막이 침범했을 때 발생하는 소위 생물-부식을 방지하기 위한 것이 고려된다, 즉 상기 조성물은 균막을 분해하여, 균막의 미생물 세포가 그것이 부착된 금속 표면을 부식시키는 균막 환경을 생성하는 것을 방지한다.
- [0591] 항-균막 조성물의 또 다른 용도에는 구강 관리가 포함된다. 그러나, 표면은 또한 점막, 치아, 헤어, 네일 등과 같은 생물학적 기원일 수도 있다.
- [0592] 예를 들어 상기 효소를 치약에 혼입함에 의한, 치태가 있는 치아 및 오염된 콘택트 렌즈가 상기 표면에 포함된다. 따라서, 상기 *바실러스* 중 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 인간 또는 동물 치아에 존재하는 플라크 분해용으로 효소 변이체를 포함하는 의약의 제조를 위한 조성물 및 방법에 사용될 수 있다. 추가의 용도는 점막으로부터 균막, 예컨대 낭성 섬유증 환자의 폐에 있는 균막을 분해하는 것이다.
- [0593] 따라서, 추가의 측면에서는 재조합 효소, 예컨대 임의의 활성 오염원이 본질적으로 없는 정제된 효소를 포함하는 구강 관리 조성물에 관한 것이다. 구강 관리 조성물은 적합하게는 일정 양의 재조합 효소를 포함할 수 있다.
- [0594] 구강 관리 조성물에 유용한 기타 균막 분해 효소에는 구강 관리 조성물 내에 2,6- β -D-프룩탄 히드롤라아제를 포함하나 이로 제한되지는 않는다. 고려되는 효소 활성물에는 하기를 포함하는 효소 균으로부터의 활성물을 포함한다: 텍스트라나아제; 뮤타나아제; 옥시다아제, 예컨대 글루코오스 옥시다아제, L-아미노산 옥시다아제, 퍼옥시다아제, 예컨대 WO 95/10602 에 기재된 *코프리누스* 중 퍼옥시다아제 또는 락토퍼옥시다아제; 할로퍼옥시다아제, 특별히 *쿠르불라리아* (*Curvularia*) 중, 특히 *C. 베루쿨로사* (*C. verruculosa*) 및 *C. 이나에쿠알리스* (*C. inaequalis*) 로부터의 할로퍼옥시다아제; 락카아제; 프로테아제, 예컨대 파파인; 산성 프로테아제 (예를 들어, WO 95/02044 에 기재된 산성 프로테아제); 엔도글루코시다아제; 리파아제; AMG (Novo Nordisk A/S) 등의 아밀로글루코시다아제를 비롯한 아밀라아제; 항-미생물 효소; 및 이들의 혼합물.
- [0595] 상기 구강 관리 조성물은 임의의 적당한 물리적 형태 (즉, 분말, 페이스트, 젤, 액체, 연고, 정제 등) 일 수 있다. "구강 관리 조성물"에는 충치를 방지하고, 치태 및 치석의 형성을 방지하고, 치태 및 치석을 제거하고, 치과 질환을 예방 및/또는 치료하는 등에 의해, 인간 및 동물의 입 안의 구강 위생을 유지하거나 개선하기 위해 사용될 수 있는 조성물이 포함된다. 적어도 본 문맥에서 구강 관리 조성물은 또한 의치, 인공치 등을 세정하기 위한 제품도 포함한다. 구강 관리 조성물의 예로서는 치약, 치과용 크림, 젤 또는 가루치약, 치아 구강세정제, 양치 전- 또는 후 린스 제형물, 츄잉검, 로젠지 (lozenges) 및 캔디가 있다. 치약 및 치아용 젤에는 전형적으로 연마 광택 물질, 발포제, 향신제, 보습제 (humectant), 결합제, 증점제, 감미제, 미백/표백/염색제거제, 물, 및 임의로 추가의 효소 및 효소 조합물이 포함된다.
- [0596] 플라크-제거액을 비롯한 구강세정제는 전형적으로 물/알코올 용액, 향신제, 보습제, 감미제, 발포제, 착색제 및

임의로 추가의 효소 및 효소 조합물을 포함한다.

- [0597] 연마 광택 물질이 또한 치분 등의 구강 관리 조성물 내에 혼입될 수 있다.
- [0598] 그에 따라, 연마 광택 물질에는 알루미늄 및 그의 수화물, 예컨대 α -알루미나 3수화물; 마그네슘 트리실리케이트; 탄산마그네슘; 카올린; 알루미늄실리케이트, 예컨대 하소 (calcined) 알루미늄 실리케이트 및 알루미늄 실리케이트; 탄산칼슘; 지르코늄 실리케이트; 및 또한 분말 플라스틱, 예컨대 폴리비닐 클로라이드; 폴리아미드; 폴리메틸 메타크릴레이트; 폴리스티렌; 페놀-포름알데히드 수지; 멜라민-포름알데히드 수지; 우레아-포름알데히드 수지; 에폭시 수지; 분말 폴리에틸렌; 실리카 제로겔; 히드로겔 및 에어로겔 등이 포함될 수 있다. 연마제로서 또한 적당한 것은 피로인산칼슘; 수-불용성 알칼리 메타포스페이트; 인산이칼슘 및/또는 그의 2수화물, 오르토인산이칼슘; 인산삼칼슘; 미립자 히드록시아파타이트 등이다. 또한 이러한 물질들의 혼합물을 사용하는 것도 가능하다.
- [0599] 구강 관리 조성물에 따라, 연마 제품은 약 0 중량% 내지 약 70 중량%, 예를 들어, 약 1 중량% 내지 약 70 중량%로 존재할 수 있다. 치약에 있어서, 연마제 함량은 전형적으로 최종 치약의 10 중량% 내지 70 중량% 범위내이다.
- [0600] 보습제는 예를 들어 치약으로부터 수분 손실을 방지하기 위해 사용된다. 구강 관리 조성물에 사용하기에 적당한 보습제에는 글리세롤; 폴리올; 소르비톨; 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 프로필렌 글리콜; 1,3-프로판디올; 1,4-부탄디올; 수소화된 부분 가수분해 다당류 등 및 이들의 혼합물이 있다. 보습제는 일반적으로 치약 중에 0 중량% 내지 약 80 중량%, 또는 약 5 중량% 내지 약 70 중량%로 존재한다.
- [0601] 실리카, 전분, 트래거캔스 겔, 잔탄 겔, 아이리쉬 모스 (Irish moss) 추출물, 알기네이트, 펙틴, 셀룰로오스 유도체, 예컨대 히드록시에틸 셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스 및 히드록시프로필 셀룰로오스, 폴리아크릴산 및 그의 염, 폴리비닐피롤리돈은, 치약 제품의 안정화를 돕는 적당한 증점제 및 결합제의 예이다. 증점제는 치약 크림 및 겔에 최종 생성물의 약 0.1 중량% 내지 약 20 중량%의 양으로, 결합제는 약 0.01 내지 약 10 중량%로 존재할 수 있다.
- [0602] 발포제로서, 비누, 음이온성, 양이온성, 비이온성, 양쪽이온성 및/또는 켄비터이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 이들은 최종 생성물의 0 내지 약 15 중량%, 약 0.1 내지 약 13 중량%, 또는 약 0.25 내지 약 10 중량%의 수준으로 존재할 수 있다.
- [0603] 계면활성제는 오로지 바실러스 중 균주 TS-23 알파-아밀라아제 또는 그의 변이체를 비활성화하지 않는 정도로만 적합하다. 계면활성제로서는 지방 알코올 술페이트, 술폰화 모노-글리세리드 또는 탄소수 10 내지 20 의 지방산의 염, 지방산-알부민 추출 생성물, 지방산 아마이드 및 타우린의 염 및/또는 이세티논산의 지방산 에스테르의 염을 들 수 있다.
- [0604] 제형물에 사용하기에 적당한 감미제로는 사카린을 들 수 있다.
- [0605] 스피아민트와 같은 향신제 또한 보통 적은 양으로, 예컨대 약 0.01 내지 약 5 중량%, 특별히 약 0.1 내지 약 5 중량%로 존재한다. 미백/표백제로는 H_2O_2 를 들 수 있으며, 최종 생성물의 중량으로 계산하여, 약 5% 미만, 또는 약 0.25% 내지 약 4% 의 양으로 첨가될 수 있다. 미백/표백제는 산화환원효소 등의 효소일 수 있다. 적당한 치아 표백 효소의 예는 WO 97/06775 에 기재된 것이다.
- [0606] 물은 보통 치약 등의 상기 조성물을 유동가능한 형태가 되게 하는 양으로 첨가된다.
- [0607] 수용성 항-세균제, 예컨대 클로로헥시딘 디글루코네이트, 헥세티딘, 알렉시딘, Triclosan®, 4 차 암모늄 항-세균 화합물 및 아연, 구리, 은 및 주석과 같은 특정 금속 이온의 수용성 공급원 (예컨대, 염화주석, 구리 및 아연, 및 질산은) 이 또한 포함될 수 있다.
- [0608] 사용될 수 있는 부가적인 화합물로는 불소 공급원, 염료/착색제, 보존제, 비타민, pH-조정제, 항-충치제, 민감성 감소제 (desensitizing agent) 등이 있다.
- [0609] 균막 분해 효소는 구강 세정에 사용될 경우 여러 가지 이점을 제공한다. 프로테아제는 타액 단백질을 분해하는데, 이는 치아 표면에 흡착하여 결과적으로 생성된 플라크의 첫번째 층인 피막을 형성하는 것이다. 프로테아제는 리파아제와 함께 박테리아 세포벽 및 세포막의 구조 성분을 형성하는 단백질 및 지질을 용해함으로써 박테리아를 파괴한다.

- [0610] 텍스트라나아제 및 2,6-β-D-프룩탄 히드롤라아제와 같은 기타 카르보히드라아제는 박테리아에 의해 생성된 박테리아 부착용 매트릭스를 형성하는 유기 골격 구조를 분해한다. 프로테아제 및 아밀라아제는 플라크 형성을 방지할 뿐 아니라, 또한 칼슘을 결합시키는 탄수화물-단백질 복합체를 파괴하여 석회화 (mineralization) 발달을 방지한다.
- [0611] 치약은 전형적으로 하기 성분들을 포함할 수 있다(단위: 최종 치약 조성물에 대한 중량%): 연마제 약 70% 까지; 보습제: 0% 내지 약 80%; 증점제: 약 0.1% 내지 약 20%; 결합제: 약 0.01% 내지 약 10%; 감미제: 약 0.1% 내지 약 5%; 발포제: 0% 내지 약 15%; 미백제: 0% 내지 약 5%; 및 효소: 약 0.0001% 내지 약 20%.
- [0612] 특정 구현예에서, 치약은 pH 가 약 6.0 내지 약 8.0 범위이고, a) 약 10% 내지 약 70% 의 연마제; b) 0% 내지 약 80% 의 보습제; c) 0.1% 내지 약 20% 의 증점제; d) 0.01% 내지 약 10% 의 결합제; e) 약 0.1% 내지 약 5% 의 감미제; f) 0% 내지 약 15% 의 발포제; g) 0% 내지 약 5% 의 미백제; i) 약 0.0001% 내지 약 20% 의 효소를 포함한다.
- [0613] 상기 효소에는, 단독 또는 2,6-β-D-프룩탄 히드롤라아제 등의 기타 균막 분해 효소와 조합된 i) *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체, 및 임의로는 치약 등에 사용되는 것으로 공지된 상술된 기타 유형의 효소가 포함된다.
- [0614] 구강세정제는 전형적으로 하기 성분들을 포함할 수 있다(단위: 최종 구강세정 조성물에 대한 중량%): 0% 내지 약 20% 의 보습제; 0% 내지 약 2% 의 계면활성제; 0% 내지 약 5% 의 효소; 0% 내지 약 20% 의 에탄올; 0% 내지 약 2% 의 기타 성분 (예컨대, 향신제, 감미제 활성 성분, 예컨대 불소). 상기 조성물은 또한 약 0% 내지 약 70% 의 물을 함유할 수도 있다.
- [0615] 구강세정제 조성물은 시트르산 또는 인산 나트륨 등의 적당한 완충액으로 약 6.0 내지 약 7.5 의 pH 범위로 완충될 수 있다. 구강세정제는 비-회석 형태일 수 있다 (즉, 사용전에 회석해야 함).
- [0616] 구강 관리 조성물은 구강 관리 업계에 공지된 임의의 통상적인 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0617] **4.4 전분 가공 조성물 및 용도**
- [0618] 또 다른 측면에서, 개시된 *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체를 함유한 조성물은 전분 액화 및/또는 당화에 이용될 수 있다.
- [0619] 한 측면은 전분으로부터 감미제를 제조하기 위한 조성물 및 조성물의 용도를 고려한다. 전분을 과당 시럽으로 전환하기 위한 "전통적인" 공정은 통상 3 가지의 연속적인 효소 공정, 즉, 액화 공정 후 당화 공정 및 이성질체화 공정으로 이루어진다. 액화 공정 동안, *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체는 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.2 의 pH 및 약 95℃ 내지 약 160℃ 의 온도에서 대략 2 시간 동안 전분을 텍스트린으로 분해한다. 이러한 조건하에서 효소 안정성을 최적화하기 위해, 1 mM 의 칼슘 (40 ppm 유리 칼슘 이온) 을 첨가한다. 전분 가공은 알코올 (예를 들어, 연료용 곡류 액화 및 음용 알코올, 알코올 양조), 감미제 제조용 전분 액화, 감자당 가공, 및 기타 전분 가공 목적과 관련 있는 음식을 제조하는데 유용하다. 다른 조건이 상이한 *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체에 사용될 수 있다.
- [0620] 액화 공정 후, 글루코아밀라아제 (예컨대, AMG™) 및 임의로 탈분지화 효소, 예컨대 이소아밀라아제 또는 폴룰라나아제 (예를 들어, Promozyme®) 를 첨가하면 텍스트린을 텍스트로스로 전환할 수 있다. 이 단계 전에, 고온 (95℃ 초과) 을 유지하면서 pH 를 약 4.5 미만의 값으로 감소시켜, 액화 *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체 활성을 변성시킨다. 온도를 60℃ 로 저하시키고, 글루코아밀라아제 및 탈분지 효소를 첨가할 수 있다. 당화 공정은 전형적으로 약 24 내지 약 72 시간 동안 진행된다.
- [0621] 당화 공정 후, pH 를 약 6.0 내지 약 8.0 (예컨대, pH 7.5) 의 범위의 값으로 증가시키고, 칼슘을 이온 교환으로 제거한다. 그런 다음 텍스트로스 시럽을 예를 들어, 고정화 글루코오스 이소머라아제 (예컨대 Sweetzyme®) 을 사용하여 고 과당 시럽으로 전환시킨다.
- [0622] 적어도 하나의 상기 공정의 효소에 의한 개선이 수행될 수 있다. *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체 액화의 칼슘 의존성 감소.
- [0623] *바실러스* 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체의 고 안정성을 적절하게 확보하기 위해서 유리 칼슘을 첨가해야 할 필요가 있지만; 유리 칼슘은 글루코오스 이소머라아제의 활성을 강하게 억제하여, 고가의 장치 가동에 의해, 유리 칼슘 수준을 3 ~ 5 ppm 미만으로 감소시키는 정도로 제거해야 할 필요가 있다. 이러한 조작

을 피할 수 있고, 액화 공정을 유리 칼슘 이온의 첨가 없이 수행할 수 있다면, 비용을 절감할 수 있다.

- [0624] 예를 들어, 저 농도의 유리 칼슘 (<40 ppm) 에서 안정하고 고도로 활성인 칼슘-의존성이 더 적은 효소를 상기 조성물 및 절차에 이용할 수 있다. 이러한 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 최적 pH 가 약 4.5 내지 약 6.5 의 범위이어야 하는데, 예컨대, 약 pH 4.5 내지 약 pH 5.5 이다.
- [0625] 상기 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 실험실에서 및 공업 환경에서 사용되어 각종 목적용 전분 또는 임의의 말토덱스트린-포함 화합물을 가수분해할 수 있다. 이러한 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체는 특이적 가수분해를 제공하도록 단독으로 사용될 수 있고, 또는 넓은 범위의 활성을 가진 "각테일"을 제공하도록 다른 아밀라아제들과 조합될 수도 있다. 예시 용도로는, 생물학적, 음식, 동물 사료, 약학적 또는 공업용 시료로부터 전분 또는 임의의 말토덱스트린-함유 화합물의 부분적 또는 완전한 가수분해 또는 제거가 포함된다.
- [0626] 또 다른 측면은 조성물 및 발효 공정에서의 조성물을 사용하는 방법에 관한 것으로, 이때 전분 기질은 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체의 존재하에서 액화 및/또는 당화되어 효모 등의 발효 유기체에 의한 발효 생성물로의 전환에 적합한 글루코오스 및/또는 말토오스를 생성시킨다. 이러한 발효 공정에는 연료 또는 음료용 에탄올 (음용 알코올) 용 에탄올 제조 공정, 음료수 제조 공정, 목적 유기 화합물 (예를 들어, 시트르산, 이타콘산, 락트산, 글루콘산, 나트륨 글루코네이트, 칼슘 글루코네이트, 포타슘 글루코네이트, 글루코노 델타 락톤, 또는 나트륨 에리토르베이트), 케톤, 아미노산 (예컨대 글루탐산, 나트륨 모노글루타미네이트), 또한 고 복합 화합물 (예를 들어, 항생제, 예컨대 페니실린, 테트라사이클린), 효소, 비타민 (예를 들어, 리보플라빈, 비타민 B₁₂, β -카로텐), 및 호르몬이 포함되는데, 이는 합성으로 제조하기가 곤란하다.
- [0627] 가공되는 전분은, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99.5% 순수한 고도로 정제된 양질의 전분일 수 있다. 다르게는, 전분은 배아 (germ) 잔류물 및 섬유질 등의 비-전분 분획을 비롯한 도정된 전곡을 포함하는, 좀더 미정제된 전분 함유 물질일 수 있다. 전곡 등의 원료를, 구조를 개방하여 추가 가공을 가능하게 하기 위해 도정한다. 하기 2 가지 도정 공정이 적합하다: 습식 및 건식 도정. 또한, 콘그릿츠 (corn grits), 예컨대 도정된 콘그릿츠를 적용할 수 있다.
- [0628] 건식 도정된 곡물은 전분 외에도 상당한 양의 비-전분 탄수화물 화합물을 포함할 것이다. 이러한 이질적 물질을 *바실러스* 종 균주 TS-23 를 제트 쿡킹하여 가공하는 경우, 보통 전분이 부분적으로만 겔라틴화된다. *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체가 미겔라틴화 전분에 대해 높은 활성을 갖기 때문에, 효소(들)을 액화 및/또는 당화 제트 쿡킹된 건식 도정 전분을 포함하는 공정에 적용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0629] 또한, *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체의 우수한 가수분해 활성 때문에, 당화 단계 동안 글루코아밀라아제에 대한 필요성은 크게 감소한다. 이는 매우 낮은 수준의 글루코아밀라아제 활성으로 당화를 수행할 수 있게 한다. 글루코아밀라아제 활성이 존재하지 않거나, 또는 존재한다면, 그때에는 0.5 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만, 0.4 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 약 0.3 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.1 AGU 미만의 양으로, 예컨대 약 0.05 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만의 전분 기질의 양으로 존재한다. "DS" 는 건조 고체 기질 그램 당 첨가된 효소 단위이다. mg 효소 단백질로 나타낸다면, 글루코아밀라아제 활성을 지닌 효소는 부재중이거나, 또는 약 0.5 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만의 양, 약 0.4 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만의 양, 약 0.3 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만의 양, 또는 약 0.1 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만 (예를 들어, 약 0.05 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.02 mg EP/g DS 의 전분 기질 이하 또는 심지어 미만의 전분 기질) 의 양으로 존재한다. 글루코아밀라아제는 *아스페르길루스* 종, *탈라로마이세스* 종 (*Talaromyces* sp.), *파키카이토스포라* 종 (*Pachykytospora* sp.), 또는 *트라메테스* 종 (*Trametes* sp.) 내의 균주로부터 유래할 수 있으며, 이의 예시는 *아스페르길루스 니게르*, *탈라로마이세스 에메르손니* (*Talaromyces emersonii*), *트라메테스 신굴라타* (*Trametes cingulata*), 또는 *파키카이토스포라 파피라세아* (*Pachykytospora papyracea*) 이다.
- [0630] 상기 공정은 a) 전분 기질을, α -아밀라아제 활성을 갖는 촉매 모듈 및 카르보히드레이트-결합 모듈, 예를 들어 제 1 측면의 폴리펩티드를 포함하는 *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체와 접촉시킴; b) 상기 전분 기질을 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 적어도 99.5% w/w 의 상기 전분 기질의 발효가능 당으로의 전환을 달성하기에 충분한 시간 동안 및 온도에서 상기 효소와 인큐베이션함; c) 발효시켜 발효 생성물을 생성함; 및 d) 임의로는 발효 생성물을 회수함을 포함할 수 있다. b) 및/또는 c) 공정 단계 동안에, 글루코아밀라아제 활성을 지닌 효소는 부재중이거나, 또는 0.001 내지 2.0 AGU/g DS, 0.01 내지 1.5 AGU/g DS, 0.05 내지 1.0

AGU/g DS, 0.01 내지 0.5 AGU/g DS 의 양으로 존재한다. 글루코아밀라아제 활성을 지닌 효소는 부재중이거나 또는 0.5 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.4 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.3 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.1 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만 (예를 들어, 0.05 AGU/g DS 이하 또는 심지어 미만의 전분 기질) 의 양으로 존재할 수 있다. mg 으로 표시한 글루코아밀라아제 활성을 지닌 효소 단백질은 부재중이거나, 또는 0.5 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.4 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만, 0.3 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만, 또는 0.1 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만 (예를 들어, 0.05 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만 또는 0.02 mg EP/g DS 이하 또는 심지어 미만의 전분 기질) 의 양으로 존재한다. 상기 공정에서, 단계 a), b), c), 및/또는 d) 는 개별적으로 또는 동시에 수행될 수 있다.

[0631] 또 다른 측면에서, 상기 공정은 하기를 포함할 수 있다: a) 전분 기질을, α-아밀라아제 활성을 지닌 촉매 모듈 및 카르보히드레이트-결합 모듈을 포함하는 바실러스 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체를 발현하도록 형질전환된 효모 세포와 접촉시킴; b) 상기 전분 기질을 적어도 90% w/w 의 상기 전분 기질이 발효가능 당으로의 전환을 달성하기에 충분한 온도에서 및 시간 동안 상기 효모와 인큐베이션함; c) 발효시켜 에탄올을 제조함; d) 임의로는 에탄올을 회수함. 단계 a), b), 및 c) 는 개별적으로 또는 동시에 수행될 수 있다.

[0632] 또한 또 다른 측면에서, 상기 공정은 젤라틴화 또는 과립형 전분의 슬러리의 가수분해, 특히 과립형 전분의 이 과립형 전분의 초기 젤라틴화 온도 미만의 온도에서 가용성 전분 가수분해물로 가수분해하는 것을 포함한다. 또한 α-아밀라아제 활성을 지닌 촉매 모듈 및 카르보히드레이트-결합 모듈을 포함하는 폴리펩티드와 접촉한다. 전분은 하기 진균류 α-아밀라아제 (EC 3.2.1.1) 중 임의 하나 이상 및 하기 중 하나 이상과 접촉될 수 있다: β-아밀라아제 (EC 3.2.1.2), 및 글루코아밀라아제 (EC 3.2.1.3). 추가 측면에서, 또다른 전분분해성 효소 또는 탈분지 효소, 예컨대 이소아밀라아제 (EC 3.2.1.68), 또는 풀룰라나아제 (EC 3.2.1.41) 가 바실러스 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체에 첨가될 수 있다.

[0633] 구현예에서, 공정은 초기 젤라틴화 온도 미만의 온도에서 수행된다. 이러한 공정은 종종 적어도 30℃, 적어도 31℃, 적어도 32℃, 적어도 33℃, 적어도 34℃, 적어도 35℃, 적어도 36℃, 적어도 37℃, 적어도 38℃, 적어도 39℃, 적어도 40℃, 적어도 41℃, 적어도 42℃, 적어도 43℃, 적어도 44℃, 적어도 45℃, 적어도 46℃, 적어도 47℃, 적어도 48℃, 적어도 49℃, 적어도 50℃, 적어도 51℃, 적어도 52℃, 적어도 53℃, 적어도 54℃, 적어도 55℃, 적어도 56℃, 적어도 57℃, 적어도 58℃, 적어도 59℃, 또는 적어도 60℃ 에서 실시된다. 공정이 실시되는 pH 는 약 3.0 내지 약 7.0, 또는 약 3.5 내지 약 6.0, 또는 약 4.0 내지 약 5.0 의 범위일 수 있다. 한 측면은, 발효, 예를 들어 효모를 이용해 에탄올을 생성하는 공정, 예를 들어 이를 약 32℃ 의 온도에서, 예컨대 30℃ 내지 35℃ 의 온도에서 수행하는 공정을 고려한다.

[0634] 또 다른 측면에서, 공정은 동시 당화 및 발효, 예를 들어 에탄올을 생성하는 효모, 또는 원하는 유기 화합물을 생성하는 또 다른 적합한 발효 유기체를 이용하는 동시 당화 및 발효를 예를 들어 30℃ 내지 35℃, 예를 들어 약 32℃ 에서 하는 것을 포함한다.

[0635] 상기 발효 공정에서, 에탄올 함량은 적어도 약 7%, 적어도 약 8%, 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 예컨대 적어도 약 16% 에탄올에 달한다.

[0636] 상기 측면 중 임의의 것에 사용되는 전분 슬러리는 약 20% 내지 약 55% 건조 고체 과립 전분, 약 25% 내지 약 40% 건조 고체 과립 전분 또는 약 30% 내지 약 35% 건조 고체 과립 전분을 지닐 수 있다. 바실러스 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체와 접촉 후, 효소는 가용성 전분을 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 의 양으로 과립 전분의 가용성 전분 가수분해물로 전환시킨다.

[0637] 또 다른 구현예에서, 바실러스 종 균주 TS-23 α-아밀라아제 또는 그의 변이체는 α-아밀라아제 활성을 지닌 촉매 모듈 및 카르보히드레이트-결합 모듈을 포함하며, 예를 들어 제 1 측면의 폴리펩티드는 제트 쿨링에 의한 젤라틴화에 국한되지 않는 젤라틴화 전분의 액화, 당화 공정에 사용된다. 상기 공정은 발효 생성물, 예를 들어 에탄올을 생성하는 발효를 포함할 수 있다. 전분-함유 물질로부터 발효에 의해 에탄올을 생성하는 공정에는 하기가 포함된다: (i) 상기 전분-함유 물질을 α-아밀라아제 활성을 갖는 촉매 모듈 및 카르보히드레이트-결합 모듈을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 제 1 측면의 폴리펩티드로 액화; (ii) 수득된 액화 매쉬를 당화; 및 (iii) 단계 (ii) 에서 수득한 물질을 발효 유기체의 존재하에서 발효함. 임의로는 상기 공정은 에탄올 회수를 추가로 포함한다. 당화 및 발효 공정은 동시 당화 및 발효 공정 (SSF) 으로서 수행될 수도 있다. 발효 동안, 에탄올 함량은 적어도 약 7%, 적어도 약 8%, 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 예컨대 적어도 약

11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 15%, 또는 적어도 16% 에탄올에 달한다.

- [0638] 상기 측면들에서 가공되는 전분은 덩이줄기, 뿌리, 줄기, 콩과 식물, 곡류 또는 전곡으로부터 수득된 것일 수 있다. 더 구체적으로는, 과립형 전분은 옥수수, 옥수수속 (cobs), 밀, 보리, 귀리, 마일로 (milo), 사고 (sago), 카사바, 타피오카, 사탕수수, 쌀, 완두, 콩, 바나나, 또는 감자로부터 수득된 것일 수 있다. 특히 고려되는 것은 왁스성과 비-왁스성 유형의 옥수수 및 보리 모두이다.
- [0639] 상술된 조성물은 젤라틴화 또는 과립형 전분, 및 부분적으로 젤라틴화된 전분을 액화 및/또는 당화하는데 사용될 수 있다. 부분적으로 젤라틴화된 전분이란, 어느 정도 젤라틴화되어 있는 전분, 즉 전분 일부가 비가역적으로 팽창되어 있고 젤라틴되어 있으며, 전분 일부는 여전히 과립 상태로 존재하는 전분이다.
- [0640] 상술된 조성물은 0.01 내지 10.0 AFAU/g DS, 또는 0.1 내지 5.0 AFAU/g DS, 또는 0.5 내지 3.0 AFAU/AGU, 또는 0.3 내지 2.0 AFAU/g DS 의 양으로 존재하는 산 α -아밀라아제 변이체를 포함할 수 있다. 조성물은 상술한 전분 가공법 중 임의의 것에 적용될 수 있다.
- [0641] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "액화" 또는 "액화하다" 는 전분이 좀더 짧은 사슬 및 덜 점성인 텍스트린으로 전환되는 공정을 의미한다. 일반적으로, 상기 공정에는 바실러스 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체의 첨가와 동시에 또는 차후에 전분의 젤라틴화가 포함된다. 부가적인 액화 유도 효소가 또한 첨가될 수 있다.
- [0642] 본원에서 사용된 바, 용어 "일차 액화"는 슬러리의 온도가 젤라틴화 온도까지 또는 그 근처로 상승될 때의 액화 단계를 말한다. 온도 상승에 이어서, 슬러리를 열 교환기 또는 제트를 통해 200-300°F, 예컨대, 220-235°F 의 온도로 한다. 열 교환 또는 제트 온도에 대한 적용에 이어, 슬러리를 상기 온도에서 3-10 분 동안 유지시킨다. 상기 200-300°F 에서의 슬러리의 유지 단계를 일차 액화라 한다.
- [0643] 본원에서 사용된 바, 용어 "이차 액화"는 슬러리가 실온으로 냉각되는 경우, 일차 액화 (200-300°F 까지 가열)에 이은 액화 단계를 말한다. 상기 냉각 단계는 30 분 내지 180 분 (3 시간), 예를 들어, 90 분 내지 120 분 (2 시간) 일 수 있다.
- [0644] 본원에 사용된 바, 용어 "이차 액화의 분"은 이차 액화의 시작으로부터 DE 측정 시간까지의 경과된 시간을 말한다.
- [0645] 또 다른 측면에서는 바실러스 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체를 포함하는 조성물에서의 β -아밀라아제의 부가적인 사용이 고려된다. β -아밀라아제 (EC 3.2.1.2) 는 외부-작용 말토오스 생성 아밀라아제로서, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 및 관련 글루코오스 중합체 중의 1,4- α -글루코시드 결합을 가수분해시켜, 말토오스를 방출시킨다.
- [0646] β -아밀라아제는 다양한 식물 및 미생물로부터 단리되었다 (Fogarty 및 C.T. Kelly, PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, Vol. 15, pp. 112-115, 1979). 이러한 β -아밀라아제는 40°C 내지 65°C 범위의 최적 온도, 및 약 4.5 내지 약 7.0 범위의 최적 pH 를 갖는 것을 특징으로 한다. 고려되는 β -아밀라아제로서는, 이들 에 한정되는 것은 아니나, 보리 Spezyme® BBA 1500, Spezyme® DBA, Optimalt® ME, Optimalt® BBA (Genencor International Inc.); 및 Novozym™ WBA (Novozymes A/S) 로부터의 β -아밀라아제를 들 수 있다.
- [0647] 상기 조성물에서의 사용이 고려되는 또 다른 효소는 글루코아밀라아제 (EC 3.2.1.3) 이다. 글루코아밀라아제는 미생물 또는 식물로부터 유래된다. 예를 들어, 글루코아밀라아제는 진균 또는 박테리아 기원일 수 있다. 대표적인 박테리아 글루코아밀라아제는 아스페르길루스 글루코아밀라아제, 특히 *A. 니케르* G1 또는 G2 글루코아밀라아제 (Boel et al., EMBOJ. 3(5): 1097-1102 (1984), 또는 그의 변이체, (예컨대 WO 92/00381; 및 WO 00/04136 에 개시된 것); *A. 아와모리* 글루코아밀라아제 (WO 84/02921); *A. 오리제* (Agric. Biol. Chem., 55(4): 941-949 (1991)), 또는 변이체 또는 이의 단편이다.
- [0648] 기타 고려되는 아스페르길루스 글루코아밀라아제 변이체로서는, 열 안정성을 향상시키는 하기 변이체들을 들 수 있다: G137A 및 G139A (Chen et al., Prot. Eng. 9: 499-505 (1996)); D257E 및 D293E/Q (Chen et al., Prot. Eng. 8: 575-582 (1995)); N182 (Chen et al., Biochem. J. 301 : 275- 281 (1994)); 디술피드 결합, A246C (Fierobe et al., Biochemistry, 35: 8698-8704 (1996)); 및 A435 및 S436 위치에 Pro 잔기 도입 (Li et al., Protein Eng. 10: 1199-1204 (1997)). 기타 고려되는 글루코아밀라아제로는, 탈라로마이세스 글루코아밀라아제, 특히 탈라로마이세스 에메르소니이 (WO 99/28448), 탈라로마이세스 레이세타누스 (*leycectanus*) (U.S. 특허 제 RE 32,153 호), 탈라로마이세스 듀폰티 (*duponti*), 또는 탈라로마이세스 테르모필루스 (*thermophilus*)

(U.S. 특허 제 4,587,215 호)로부터 유래된 것을 들 수 있다. 고려되는 박테리아 글루코아밀라아제로서는, 클로스트리디움 (*Clostridium*) 속, 특히 *C. 테르모아밀로라이티쿰* (*C. thermoamylolyticum*) (EP 135138) 및 *C. 테르모히드로술폴리쿰* (*C. thermohydrosulfuricum*) (WO 86/01831) 으로부터의 글루코아밀라아제를 들 수 있다.

대표적인 글루코아밀라아제로서는, 아스페르길루스 오리제로부터의 글루코아밀라아제를 들 수 있다. 또한 시판중인 글루코아밀라아제, 예컨대 AMG 200L; AMG 300L; SANTM SUPER 및 AMGTM E (Novozymes); OPTIDEX[®] 300 (Genencor International, Inc.); AMIGASETM 및 AMIGASETM PLUS (DSM); G-ZYME[®] G900 (Enzyme Bio-Systems); 및 G-ZYME[®] G990 ZR (*A. 니게르* 글루코아밀라아제 및 저 프로테아제 함량) 이 고려된다.

- [0649] 글루코아밀라아제는 0.02-2.0 AGU/g DS, 또는 0.1-1.0 AGU/g DS, 예컨대, 0.2 AGU/g DS 의 양으로 첨가될 수 있다.
- [0650] 부가적인 효소 및 효소 변이체를 상기 조성물에 포함시킬 수 있다. 1 가지 이상의 α -아밀라아제를 바실러스 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체에 더하여 사용할 수 있거나, 또는 본원에 논의된 다른 효소들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0651] 임의로 첨가될 수 있는 또 다른 효소는 탈분지화 효소, 예를 들어 이소아밀라아제 (EC 3.2.1.68) 또는 풀룰라나아제 (EC 3.2.1.41) 이다. 이소아밀라아제는 아밀로펙틴 중의 α -1,6-D-글루코시드 분지 결합 및 β -제한 텍스트린을 가수분해하고, 이소아밀라아제가 풀루란을 공격하지 못함에 의해, 그리고 α -제한 텍스트린에 대한 이소아밀라아제의 제한된 작용에 의해 풀룰라나아제와 구별될 수 있다. 탈분지화 효소는 당업자에게 잘 알려진 유효량으로 첨가될 수 있다.
- [0652] 상기 공정의 생성물의 정확한 조성은 적용되는 효소의 조합뿐 아니라 가공되는 과립형 전분의 유형에 따라 다르다. 예를 들어, 가용성 가수분해물은 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95.0%, 적어도 약 95.5%, 적어도 약 96.0%, 적어도 약 96.5%, 적어도 약 97.0%, 적어도 약 97.5%, 적어도 약 98.0%, 적어도 약 98.5, 적어도 약 99.0% 또는 적어도 약 99.5% 의 순도를 가진 말토오스일 수 있다. 다르게는, 가용성 전분 가수분해물은 글루코오스이고, 또는 전분 가수분해물의 DX (총 가용화된 건조 고체의 글루코오스 %) 는 적어도 94.5%, 적어도 95.0%, 적어도 95.5%, 적어도 96.0%, 적어도 96.5%, 적어도 97.0%, 적어도 97.5%, 적어도 98.0%, 적어도 98.5, 적어도 99.0% 또는 적어도 99.5% 이다. 상기 공정에는 아이스 크림, 케이크, 캔디, 과일 통조림의 제조 공정에서 사용하기 위한 글루코오스, 말토오스, DP3 및 DPn 의 혼합물을 함유하는 특수 시럽 등의 특수 시럽인 제품이 포함될 수 있다.
- [0653] 하기 2 가지 도정 공정이 적합하다: 습식 도정 및 건식 도정. 건식 도정에서, 전립을 도정하여 사용한다. 습식 도정은 배아 및 거친가루 (전분 과립 및 단백질) 를 양호하게 분리하는데, 보통 전분 가수분해물을 시럽 제조에 사용하는 위치에서 적용되는데 몇 가지 예외는 있다. 건식 및 습식 도정 모두 전분 가공 업계에 잘 알려져 있으며, 개시된 조성물 및 방법으로서의 사용에 또한 동등하게 고려된다. 상기 공정은 잔존물 (retentate) 이 효소, 생 (raw) 전분 및 물의 존재하의 재순환 하에서 유지되고, 투과물 (permeate) 이 가용성 전분 가수분해물인 한외여과 시스템에서 수행될 수 있다. 잔존물이 효소, 생 전분 및 물의 존재하의 재순환 하에서 유지되고, 투과물이 가용성 전분 가수분해물인 한외여과 막을 가진 연속 막 반응기에서 수행되는 공정이 동등하게 고려된다. 또한 고려되는 것은 잔존물이 효소, 생 전분 및 물의 존재하의 재순환 하에서 유지되고, 투과물이 가용성 전분 가수분해물인 미세여과 막을 가진 연속 막 반응기에서 수행되는 공정이다.
- [0654] 한 가지 점에서, 상기 공정의 가용성 전분 가수분해물은 고 과당 전분계 시럽 (HFSS), 예컨대 고 과당 옥수수 시럽 (HFCS) 으로의 전환에 적용된다. 상기 전환은 글루코오스 이소머라아제, 및 고체 지지체에 고정된 글루코오스 이소머라아제를 사용하여 달성할 수 있다. 고려되는 이소머라아제로서는 시판 제품 Sweetzyme[®], IT (Novozymes A/S); G-zyne[®] IMGI, 및 G-zyne[®] G993, KetomaxTM, G-zyne[®] G993 (Rhodia); G-zyne[®] G993 liquid, GenSweet[®] IGI (Genencor International, Inc.) 를 들 수 있다.
- [0655] 또 다른 측면에서, 이러한 방법으로 생성된 가용성 전분 가수분해물은 연료 또는 음용 에탄올의 생산에서 사용될 수 있다. 세번째 측면의 공정에서, 발효는 과립형 전분 슬러리의 가수분해와 동시에 또는 별도로/후속적으로 수행될 수 있다. 발효가 상기 가수분해와 동시에 수행되는 경우, 온도는 30℃ 내지 35℃, 또는 31℃ 내지 34℃ 일 수 있다. 공정은, 잔존물이 효소, 생 전분, 효모, 효모 영양분 및 물의 존재하의 재순환 하에서 유지되고 투과물은 에탄올 함유 액체인 한외여과 시스템에서 수행될 수 있다. 또한 고려되는 것은, 잔존물이 효소, 생 전분, 효모, 효모 영양분 및 물의 존재하의 재순환 하에서 유지되고 투과물은 에탄올 함유 액체

인 한외여과 막을 가진 연속 막 반응기에서 수행되는 공정이다.

[0656] 상기 공정의 가용성 전분 가수분해물은 또한 처리된 전분을, 시트르산, 모노나트륨 글루타메이트, 글루콘산, 나트륨 글루코네이트, 칼슘 글루코네이트, 포타슘 글루코네이트, 글루코노 델타 락톤, 또는 나트륨 에리토르베이트 등의 발효 생성물로 발효시키는 것을 포함하는 발효 생성물의 제조에 사용될 수 있다.

[0657] *바실러스* 종 균주 TS-23 α -아밀라아제 또는 그의 변이체의 전분 가수분해 활성은 기질로서 감자 전분을 사용하여 측정할 수 있다. 상기 방법은 상기 효소에 의한 개질된 감자 전분의 분해에 기반하며, 상기 반응에 이어 전분/효소 용액의 시료를 요오드 용액을 혼합한다. 초기에는, 검정빛이 도는 청색 색조가 형성되나, 전분이 분해되는 동안 청색 색조가 열어지고 점차 붉은빛이 도는 갈색으로 변하는데, 이것을 착색된 유리 표준과 비교한다.

[0658] 5. 방법

[0659] 5.1 필터 스크리닝 검정

[0660] 하기에 논의되는 검정을, 고 또는 저 pH 에서 및/또는 Ca^{2+} 고갈된 조건 하에서 모체 α -아밀라아제 효소와 비교했을 때 변경된 안정성을 갖는 AmyTS23 α -아밀라아제 변이체의 스크리닝에서 이용할 수 있다.

[0661] 5.2 고 pH 필터 검정

[0662] 37°C 에서 적어도 21 시간 동안 10 마이크로 g/ml 카나마이신 함유 TY 아가 플레이트 상 셀룰로오스 아세테이트 (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)- 및 니트로셀룰로오스 필터 (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 의 샌드위치 상에, *바실러스* 라이브리리를 플레이트팅한다. 상기 셀룰로오스 아세테이트 층을 TY 아가 플레이트 상에 위치시킨다.

[0663] 필터 상에 양성의 변이체 위치를 알아낼 수 있도록, 플레이트팅 후, 그러나 인큐베이션 이전에 각 필터 샌드위치를 바늘로 특수 표지하고, 결합된 변이체를 갖는 니트로셀룰로오스 필터를 글리신-NaOH 완충액, pH 8.6-10.6 을 갖는 용기에 옮기고, 실온에서 (10-60°C 로부터 변경될 수 있음) 15 분 동안 인큐베이션한다. 콜로니를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 필터를 실온에서 사용할 때까지 TY-플레이트 상에서 저장한다. 인큐베이션 후, 잔류 활성을 글리신-NaOH 완충액, pH 8.6-10.6 중 1% 아가로오스, 0.2% 전분을 함유하는 플레이트 상에서 검출한다. 니트로셀룰로오스 필터를 갖는 검정 플레이트를 필터 샌드위치와 동일한 방식으로 표지하고, 2 시간 동안 실온에서 인큐베이션한다. 필터를 제거한 후, 검정 플레이트를 10% Lugol 용액으로 염색한다. 전분 분해 변이체를 다크 블루 배경에서 백색 반점으로서 검출한 다음 저장 플레이트 상에서 동정한다. 양성 변이체를 첫 스크린과 동일한 조건 하에서 2 회 재스크리닝한다.

[0664] 5.3 저 칼슘 필터 검정

[0665] 적어도 21 시간 동안 37°C 에서, 관련 항생제, 예를 들어 카나마이신 또는 클로르암페니콜을 갖는 TY 아가 플레이트 상 셀룰로오스 아세테이트 (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)- 및 니트로셀룰로오스 필터 (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) 의 샌드위치 상에서 *바실러스* 라이브리리를 플레이트팅한다. 셀룰로오스-아세테이트 층을 TY 아가 플레이트 상에 위치시킨다.

[0666] 양성의 변이체의 필터 상 위치를 알아낼 수 있도록 각각의 필터 샌드위치를 플레이트팅 후, 그러나 인큐베이션 이전에, 바늘로 특수 표지하고, 결합된 변이체를 갖는 니트로셀룰로오스 필터를 상이한 EDTA 농도 (0.001 mM-100 mM) 를 지니고 카르보네이트/바이카르보네이트 완충액 pH 8.5-10 를 갖는 용기에 옮긴다. 필터를 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한다. 콜로니를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 필터를 실온에서 사용할 때까지 TY-플레이트 상에서 저장한다. 인큐베이션 후, 잔류 활성을 카르보네이트/바이카르보네이트 완충액 pH 8.5-10 중 1% 아가로오스, 0.2% 전분을 함유하는 플레이트 상에서 검출한다. 니트로셀룰로오스 필터를 갖는 검정 플레이트를 필터 샌드위치와 동일한 방식으로 표지하고 2 시간 동안 실온에서 인큐베이션한다. 필터를 제거한 후, 검정 플레이트를 10% Lugol 용액으로 염색한다. 전분 분해 변이체를 다크 블루 배경 상에 백색 반점으로서 검출한 다음 저장 플레이트 상에서 동정한다. 양성 변이체를 첫 스크린과 동일한 조건 하에서 2 회 재스크리닝한다.

[0667] 5.4 저 pH 필터 검정

[0668] 적어도 21 시간 동안 37°C 에서 10 마이크로 g/ml 클로로암페니콜을 갖는 TY 아가 상에서 셀룰로오스 아세테이트 (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)- 및 니트로셀룰로오스 필터 (Protran-Ba 85, Schleicher

& Schuell, Dasseli Germany) 의 샌드위치 상에서 *바실러스* 라이브러리를 플레이팅한다. 셀룰로오스 아세테이트 층을 TY 아가 플레이트 상에서 위치시킨다.

[0669] 각각의 필터 샌드위치를 필터 상 양성 변이체 위치를 알아낼 수 있도록 플레이팅 후, 그러나 인큐베이션 이전에 바늘로 특수 표지하고, 결합된 변이체를 갖는 니트로셀룰로오스 필터를 시트레이트 완충액 pH 4.5 를 함유하는 용기에 옮기고, 80℃ 에서 20 분 동안 (야생형 백본의 변이체에 대한 스크리닝시) 또는 85℃ 에서 60 분 간 (모체 α -아밀라아제의 변이체에 대한 스크리닝시) 인큐베이션한다. 콜로니를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 필터를 실온에서 사용할 때까지 TY-플레이트 상에서 저장한다. 인큐베이션 후, 잔류 활성을 시트레이트 완충액, pH 6.0 중 1% 아가로오스, 0.2% 전분을 함유하는 검정 플레이트 상에서 검출한다. 니트로셀룰로오스 필터를 갖는 검정 플레이트를 필터 샌드위치와 동일한 방식으로 표지하고, 2 시간 동안 50℃ 에서 인큐베이션한다. 필터 제거 후, 검정 플레이트를 10% Lugol 용액으로 염색한다. 전분 분해 변이체를 다크 블루 배경에서 백색 반점으로서 검출한 다음 저장 플레이트 상에서 동정한다. 양성 변이체를 제 1 의 스크린과 동일한 조건 하에서 2 회 재-스크리닝한다.

[0670] 5.5 2 차 스크리닝

[0671] 재스크리닝 후 양성의 형질전환체를 저장 플레이트로부터 고르고 2차 플레이트 검정에서 시험한다. 양성 형질전환체를 22 시간 동안 37℃ 에서 5 mL LB+클로르암페니콜 중에서 성장시킨다. 각 양성 형질전환체의 *바실러스* 배양물 및 대조군으로서의 상응하는 백본 발현 클론을 시트레이트 완충액, pH 4.5 중 90℃ 에서 인큐베이션하고, 샘플을 0, 10, 20, 30, 40, 60 및 80 분에 취한다. 3 μ L 샘플을 검정 플레이트 상에서 스폿팅 (spotting) 한다. 검정 플레이트를 10% Lugol 용액으로 염색한다. 개선된 변이체는 백본보다 높은 잔류 활성 (검정 플레이트 상에서 할로로서 검출됨) 을 갖는 변이체로서 판단된다. 개선된 변이체는 뉴클레오티드 서열화로 결정한다.

[0672] 5.6 미정제 변이체의 안정성 검정

[0673] 변이체의 안정성을 하기와 같이 검정할 수 있다: 분석될 변이체를 발현하는 *바실러스* 배양물을 21 시간 동안 37℃ 에서 10 ml LB+클로르암페니콜 중에서 성장시킨다. 800 μ L 배양물을 200 μ L 시트레이트 완충액, pH 4.5 와 혼합한다. 샘플 시간 지점 개수에 상응하는 상응 가지 수의 70 μ L 분취물을 PCR 시험관 내에 만들고 70℃ 또는 90℃ 에서 다양한 시간점 (전형적으로는 5, 10, 15, 20, 25 및 30 분) 동안에 PCR 기기 내에서 인큐베이션한다. 0 분 샘플은 고온에서 인큐베이션하지 않는다. 샘플에서의 활성을, 하기 "알파-아밀라아제 활성에 대한 검정" 제목 하에 기술된 대로 20 μ L 내지 200 μ L 의 α -아밀라아제 PNP-G₇ 기질 MPR3 ((Boehringer Mannheim Cat. no. 1660730) 를 이동시킴으로써 측정한다. 결과를 백분율 활성 대 시간으로 (0 시간 점을 기준으로) 표시하거나, 또는 일정 기간 시간 동안 인큐베이션 후 백분율 잔류 활성으로서 나타낸다.

[0674] 5.7 α -아밀라아제 변이체의 발효 및 정제

[0675] 관련 발현 플라스미드를 갖는 *B. 서브틸리스* 균주를 하기와 같이 발효 및 정제할 수 있다: 균주를 -80℃ 스톱으로부터 10 μ g/ml 카나마이신을 담은 LB-아가 플레이트 상에서 조흔시키고 (streaking), 하룻밤 37℃ 에서 성장시킨다. 콜로니를 500 ml 진탕 플라스크 내 10 마이크로 g/ml 클로르암페니콜로 보충된 100 ml PS-1 배지에 옮긴다.

[0676] PS-1 배지 조성물

[0677]	펄 당 (Pearl sugar)	100 g/l
[0678]	콩가루	40 g/l
[0679]	Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	10 g/l
[0680]	Pluronic™ PE 6100	0.1 g/l
[0681]	CaCO ₃	5 g/l

[0682] 배양액을 37℃ 에서 270 rpm 으로 5 일 동안 진탕한다.

[0683] 세포 및 세포 잔해를 발효 액체배지 (broth) 로부터 20-25 분 4500 rpm 으로 원심분리하여 제거한다. 그 뒤에, 상청액을 여과시켜 완전히 맑은 용액을 수득한다. 여과물을 농축하고 UF-필터 상 (10000 컷 오프 막)

에서 세척하고 완충액을 20 mM 아세테이트 pH 5.5 으로 변경한다. UF-여과물을 S-세파로오스 F.F 상에 적용하고, 용출을 동일한 완충액 중 0.2M NaCl 으로 단계 용출로써 수행한다. 용출액을 10 mM Tris, pH 9.0 에 대해 투석하고, Q-세파로오스 F.F. 상에 적용하고 6 컬럼 부피에 걸쳐 0-0.3M NaCl 로부터 선형 구배로 용출한다. (Phadebas 검정법으로 측정된) 활성물을 함유하는 분획을 모으고 pH 를 pH 7.5 로 조절하고, 남은 색을 0.5% W/vol. 활성 차콜로 5 분 처리하여 제거하였다.

[0684] 5.8 특이 활성 측정

[0685] 특이 활성을 활성/mg 효소로서 Phadebas[®] 검정 (Pharmacia) 을 이용하여 결정한다. 제조자 지시사항은 하기와 같다 (하기 "알파-아밀라아제 활성에 대한 검정" 부분을 또한 참고).

[0686] 5.9 등전점의 결정

[0687] pI 는 등전 초점화 (예, Pharmacia, Ampholine, pH 3.5-9.3) 를 통해 결정한다.

[0688] 5.10 촉진된 안정성 검정

[0689] 50 ml 프로필렌 시험관에서, 10 ml 의 관심 세제를 첨가한다. AmyTS23t 및 AmyTS23t ΔRS 둘 모두를 적절히 희석해, 각각 180 ppm 을, 피펫을 이용해 세제를 함유하는 분리된 시험관으로 측정했다. 각 돌연변이 효소를 갖는 세제를 30 초간 보르텍스 (vortex) 한 다음 10 분 동안 RotaMix (ATR RKVS 모델) 에 놓았다. 100 마이크로리터의 돌연변이 효소 함유 세제를, 피펫을 이용해 측정하고, 1:651 로 희석했다. 돌연변이체의 초기 활성을 Konelab, Model 20XT 상 블로킹된 P-니트로-페닐-말토헵타오스 (Blocked PBNPG7) 기질을 이용해 검정했다. 그 다음에 세제 샘플을 37°C 로 설정된 일정한 온도 유지 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 샘플을 1, 2, 4, 7 및 17 일에 제거하고 효소 활성을 분석했다.

[0690] 5.11 α-아밀라아제 활성에 대한 검정

[0691] 5.11.1 Phadebas 검정

[0692] α-아밀라아제 활성을, 기질로서 Phadebas[®] 정제를 활용하는 방법을 통해 결정한다. Phadebas 정제 (Phadebas[®] Amylase Test, Pharmacia Diagnostic 공급) 는 교차결합된 불용성 청색 전분 중합체를 함유하는데, 이는 소혈청 알부민 및 완충액 물질과 혼합되어 있고 정제화되어 있다.

[0693] 매 단일 측정을 위해, 하나의 정제를, 5 ml 50 mM Britton-Robinson 완충액 (50 mM 아세트산, 50 mM 인산, 50 mM 붕산, 0.1 mM CaCl₂, NaOH 을 이용해 관심 값으로 조절된 pH) 을 함유하는 시험관에서 현탁시킨다. 시험을 수조 중 관심 온도에서 수행한다. 시험되는 α-아밀라아제를 X ml 의 50 mM Britton-Robinson 완충액 중에서 희석한다. 1 ml 의 상기 α-아밀라아제 용액을 5 ml 50 mM Britton-Robinson 완충액에 첨가한다. 전분을 α-아밀라아제로 가수분해하여 가용성 청색 단편들을 수득한다. 620 nm 에서 분광광도계로 측정할 수득한 청색 용액의 흡광도가 α-아밀라아제 활성의 함수이다.

[0694] 10 또는 15 분의 인큐베이션 (시험 시간) 후에, 측정되는 620 nm 흡광도는 620 nm 에서 0.2 내지 2.0 흡광도 단위 범위 내에 있는 것이 중요하다. 이러한 흡광도 범위에서, 활성과 흡광도 간의 선형성이 존재한다 (Lambert-Beer 법칙). 따라서, 효소의 희석은 상기 기준에 적합되도록 조절되어야 한다. 특정 설정 조건 하에서 (온도, pH, 반응 시간, 완충 조건), 1 mg 의 주어진 α-아밀라아제는 어느 정도의 양의 기질을 가수분해할 것이고, 청색이 나타날 것이다. 색 강도는 620 nm 에서 측정된다. 측정된 흡광도는 주어진 조건 설정 하에서, 당해 α-아밀라아제의 특이 활성 (활성/순수 α-아밀라아제의 mg) 에 정비례한다.

[0695] 5.11.2 대안 방법

[0696] α-아밀라아제 활성은 PNP-G₇ 기질을 이용하는 방법으로 측정한다. p-니트로페닐-α-D-말토헵타오시드에 대한 촉약형인 PNP-G₇ 은 엔도-아밀라아제에 의해 분할 될 수 있는 차단된 올리고당이다. 분할 후, 키트에 포함된 α-글리코시다아제는 기질을 파쇄하여 황색인 자유 PNP 분자를 유리시켜, 이에 따라 λ=405 nm (400-420 nm) 에서 시각적 분광측정으로 측정할 수 있다. PNP-G₇ 기질 및 α-글리코시다아제를 함유하는 키트는 Boehringer-Mannheim (cat. no. 1054635) 로 제작된다.

[0697] 시약 용액을 제조하기 위해, 10 ml 의 기질/완충액 용액을 제조업자가 권하는 대로 50 ml 효소/완충액 용액에 첨가한다. 20 μl 샘플을 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 옮기고 25°C 에서 인큐베이션함으로써 검정을 수

행한다. 25℃ 로 예비-평형시킨 200 μ l 시약 용액을 첨가한다. 용액을 혼합하고 1 분 예비-인큐베이션 하고, 흡수도를 ELISA 판독기 내에서 4 분에 걸쳐 OD 405 nm 에서 30 초 마다 측정한다. 시간 의존형 흡수도-곡선의 기울기는 주어진 조건 설정 하에서 당해 α -아밀라아제의 활성과 정비례한다.

5.12 세제 조성물 내 효소 성능의 결정

5.12.1 US 조건

Terg-o-tometer, United States Testing, Hoboken, N. J. 의 용도 - US 세척 조건 하에서 세척 시험을 시뮬레이션하기 위해서, 관심 돌연변이 효소의 용량 효율 곡선 (dose efficiency curve; DEC) 을, 형광 증백제 없이 액체 AATCC 2003 및/또는 분말 AATCC 1993 (American Association of Textile Chemists and Colorists) 등의 표준 세제를 이용해 20℃ 에서 수행하였다. 이어서, 필적하는 α -아밀라아제의 해당 DEC 를 수행하여 본 발명의 돌연변이 효소의 얼룩 제거 성능을 비교하였다. 이러한 방법을 40℃ 에서 반복했다. 전형적으로, CS-28 쌀 전분 얼룩의 4 개의 조각건본 (Holland 의 CFT) 를, 1 l 의 탈이온수 및 1.5 g 의 액체 AATCC 로 충전한 Terg-o-tometer 의 강철 용기 안에 넣었다. 분말 AATCC 를 이용하였을 경우에는, 1.5g 의 세제 분말의 중량을 분석 천칭 (Model PM4800, Mettler Instrument Corp., Highstown, N.J. 08520) 에서 재고, Terg-o-tometer 에 첨가했다. 두 복제물을 동일한 시간에서 작동시켰다. 달리 언급하지 않는한, 시험을 12 분 동안 수행하고, 3 분 동안 행구었다 (rinse). 세척 후, 조각건본을 통풍시키고 시험 조각건본의 반사도를 Konica Minolta 에서 제조한 Chroma Meter Model CR-410 으로 측정했다. 수집한 데이터를 적절한 통계 분석으로 처리했다.

5.12.2 유럽 조건

Atlas Company, Atlanta, Georgia 에 의해 제조된 세탁 견뢰도 시험기 (Launder-O-meter)의 용도- 유럽 세척 조건 하에서 세척 시험을 시뮬레이션하기 위해서, 관심 돌연변이 효소의 용량 효율 곡선 (DEC) 을 40℃ 에서 표준 유럽 시험 세제인 IEC A 및 IEC A + 표백제 (TAED-테트라-아세틸-에틸렌-디아민 아세테이트) 및 과불산나트륨을 이용해 수행하였다. 이어서 필적하는 돌연변이 효소의 상응하는 DEC 곡선을 수행하여, 본 발명의 돌연변이 효소의 얼룩 제거 성능을 비교하였다. 이러한 방법을 원한다면 더 높은 세척 온도에서 반복하였다. 전형적으로, EMPA 161, 옥수수 전분 (EMPA, 스위스) 의 4 가지 조각건본을 6.8 g/L 의 IEC A 세제 또는 8.0 g/L 의 IEC A + 표백제 세제를 함유하는 250 ml 의 탈이온수를 담은 강철 용기에 넣었다. 두 복제본을 동일한 시간에서 작동시켰다. 달리 언급하지 않는 한, 시험을 45 분 동안 수행하고 5 분 동안 행구었다. 세척 후, 조각건본을 통풍시키고 시험 조각건본의 반사도를 Chroma Meter 모델 CR-410 를 이용해 측정했다. 수집한 데이터를 적절한 통계 분석으로 처리했다.

5.12.3 세제 조성물의 극소조각건본 평가 방법

다수의 α -아밀라아제 세정 검정이 존재한다. 세정력 시험에 대한 대표적인 설명에는 하기가 포함된다.

"조각건본"은 얼룩이 도포된 섬유 등의 물질의 조각이다. 상기 물질은 예를 들어, 면, 폴리에스테르 또는 천연 및 합성 섬유의 혼합물로 만들어진 피복일 수 있다. 상기 조각건본은 추가로 여과지 또는 니트로셀룰로오스와 같은 종이, 또는 세라믹, 금속 또는 유리 등의 경질 물질 조각일 수 있다. 아밀라아제에 있어서, 얼룩은 전분 기재이지만, 혈액, 우유, 잉크, 풀, 차, 와인, 시금치, 육즙, 초콜렛, 달걀, 치즈, 점토, 안료, 오일, 또는 이들 화합물의 혼합물도 포함될 수 있다.

"소 조각건본"은 단일 구멍 펀치 장치, 또는 주문 제작된 96-구멍 펀치 장치 (다중 구멍 펀치의 패턴은 표준 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 부합됨) 로 절단되어진 조각건본의 한 구획, 또는 상기 조각건본으로부터 다르게 절취된 한 구획이다. 상기 조각건본은 식물, 종이, 금속, 또는 기타 적당한 물질일 수 있다. 상기 소 조각건본은 이를 24-, 48- 또는 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 웰에 두기 전 또는 둔 후에 얼룩이 붙을 수 있다. 또한 작은 조각의 물질에 얼룩을 도포하여 "소 조각건본"을 제조할 수도 있다. 예를 들어, 소 조각건본은 직경이 5/8" 또는 0.25" 인 얼룩진 섬유 조각일 수 있다. 상기 주문 제작된 펀치는 96 개의 조각건본을 96-웰 플레이트의 모든 웰에 동시에 전달하는 방식으로 설계된 것이다. 상기 장치는 단순히 동일한 96-웰 플레이트를 여러 번 적재하여 웰 당 1 개 초과와 조각건본을 전달할 수 있게 한다. 다중 구멍 펀치 장치는 조각건본을, 이들에 한정되는 것은 아니나 24-웰, 48-웰, 및 96-웰 플레이트를 포함하는 임의 형식의 플레이트에 동시에 전달하도록 고안될 수 있다. 또 다른 고려가능한 방법에서, 오염된 시험 플랫폼은 식물 이외의 물질에 대한 세정 조성물을 시험하는데 사용되는 오염 기질로 코팅된 금속, 플라스틱, 유리, 세라믹 또

는 기타 적당한 물질로 만들어진 비드 (bead) 일 수 있다. 그런 다음 상기 하나 이상의 코팅된 비드를 적당한 완충액 및 효소가 담긴 96-, 48- 또는 24-웰 플레이트 또는 더 큰 형식의 웰에 넣는다. 이러한 경우에, 상청액에 대해, 직접적인 흡광도 측정에 의해 또는 파생적인 발색 반응 후에 방출된 오염물이 있는지 조사할 수 있다. 방출된 오염물에 대한 분석은 또한 질량 스펙트럼 분석에 의해 수행될 수 있을 것이다. 추가의 마이크로스크리닝 검정은, 예를 들어 인디고-염색 데님 등의 조각견본을 멀티-웰 플레이트의 웰에 제공 및 고정하고, 모래 또는 더 큰 입자, 예를 들어 6 내지 8 또는 9 게이지 입자를 포함하도록 채질된 석류석을 첨가하고, 첨가된 입자들에 의해 조각견본이 마모되도록 플레이트를 교반할 수 있는 것일 것이다. 이러한 검정은 스톤 워싱에 적용시 셀룰라아제를 평가할 때 유용하다. 효소의 유효성은 반응 완충액으로의 색 방출 (예를 들어 방출된 인디고는 디메틸술폰에서 용해되고, $A_{600\text{ nm}}$ 에서의 흡광도가 측정됨) 또는 마멸된 조각견본의 반사도 측정에 의해 판단될 수 있다.

[0707] 예를 들어, 미처리된 BMI (blood/milk/ink; 혈액/우유/잉크) 조각견본을 표백제 없이 세제로 세척하는 경우에, 잉크의 대부분이 심지어는 프로테아제의 도움 없이도 방출된다. 프로테아제를 첨가하면 잉크 방출이 조금 상승하는데, 이는 큰 배경바탕에 있어서는 정량하기가 어려울 수 있다. 한 측면은 얼룩의 고정도를 조절가능하게 하는 처리 프로토콜을 제공한다. 그 결과, 예를 들어, 시험 대상 효소의 부재하에 세척시 각종 양으로 얼룩을 방출하는 조각견본을 제조하는 것이 가능하다. 고정된 조각견본의 사용은 세척 검정법에서 신호-대-잡음 (signal-to-noise) 비의 현저한 개선을 가져온다. 나아가, 고정도를 다르게 함으로써, 다양한 세정 조건하에서 최적의 결과를 산출하는 얼룩을 생성할 수 있다.

[0708] 다양한 유형의 물질에 대해 공지된 "강도"의 얼룩을 갖는 조각견본이 시판중이고/이거나 (EMPA, St. Gallen, 스위스; Testgewebe GmbH, Krefeld 독일; 또는 Center for Test Materials, Vlaardingen, 네덜란드), 및/또는 당업자에 의해 제조될 수 있다(Morris 및 Prato, *Textile Research Journal* 52(4): 280-286 (1982)). 기타 시험 조각견본은 예를 들어, 면-함유 섬유 상 혈액/우유/잉크 (BMI) 얼룩, 면-함유 섬유 상 시금치 얼룩, 또는 면-함유 섬유 상 풀, 및 면-함유 섬유 상 초콜렛/우유/그을음을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0709] BMI 얼룩은 0.0003% 내지 0.3% 과산화수소를 이용하여 면에 고정될 수 있다. 기타 조합에는 0.001% 내지 1% 글루타르알데히드로 고정된 풀 또는 시금치, 0.001% 내지 1% 글루타르알데히드로 고정된 젤라틴 및 Coomassie Brilliant Blue 얼룩, 또는 0.001% 내지 1% 글루타르알데히드로 고정된 초콜렛, 우유 및 그을음이 포함된다.

[0710] 또한 효소 및/또는 세제 제형물과 함께 인큐베이션하는 동안 조각견본을 진탕할 수도 있다. 세척 성능 데이터는 웰, 특히 96-웰 플레이트 내 조각견본의 배향 (수평 대 수직) 에 따라 다르다. 이것은 인큐베이션 기간 동안 혼합이 불충분하였다는 것을 나타내는 것일 것이다. 인큐베이션 동안 충분한 진탕을 확보하기 위한 다수의 방법이 있지만, 마이크로타이터 플레이트가 2 개의 알루미늄 플레이트 사이에 끼어 있는 플레이트 홀더를 구축할 수 있다. 이는 예를 들어, 접착 플레이트 봉합제를 웰들에 걸쳐 둔 다음, 2 개의 알루미늄 플레이트를 임의의 유형의 적절한 시판 집게로 96-웰 플레이트에 집는 정도로 간단할 수 있다. 그런 다음 이를 시판 인큐베이터 셰이커 (shaker) 에서 고정시킬 수 있다. 셰이커를 약 400 rpm 으로 설정하면 매우 효과적으로 혼합되면서도, 누출 또는 교차-오염이 홀더에 의해 효과적으로 방지된다.

[0711] 세척액 중의 아미노기의 농도를 정량화하기 위해 트리니트로벤젠술폰산 (TNBS) 을 사용할 수 있다. 이는 조각견본으로부터 제거된 단백질 양의 척도로서 기능할 수 있다(예컨대, Cayot 및 Tainturier, *Anal. Biochem.* 249: 184-200 (1997) 참조). 그러나, 세제 또는 효소 샘플이 (예를 들어, 샘플 중의 펩티다아제의 존재에 의해) 통상적이지 않게 소형인 펩티드 단편을 형성을 도모하는 경우, 더 큰 TNBS 신호, 즉, 더 큰 "잡음"이 수득될 것이다.

[0712] 혈액/우유/잉크 또는 잉크 방출에 기반하는 기타 얼룩에 대한 세척 성능 측정을 위한 또 다른 수단. 조각견본 상 단백질의 단백질분해는 잉크 입자의 방출을 도출하며, 이는 세척액의 흡광도를 측정함으로써 정량화할 수 있다. 흡광도는 350 내지 800 nm 의 임의의 파장에서 측정할 수 있다. 파장은 410 nm 또는 620 nm 에서 측정한다. 또한, 풀, 시금치, 젤라틴 또는 Coomassie Brilliant Blue 얼룩을 포함한 얼룩에 대한 세척 성능을 측정하기 위해 세척액을 조사할 수 있다. 이러한 얼룩에 대한 적당한 파장으로는, 시금치 또는 풀에 대해서는 670 nm 및 젤라틴 또는 Coomassie Brilliant Blue 에 대해서는 620 nm 를 들 수 있다. 예를 들어, 세척액의 분취물 (예를 들어, 전형적으로 96-웰 마이크로플레이트로부터 100-150 μL) 을 취하여, 큐벳 또는 멀티웰 마이크로플레이트에 넣는다. 그런 다음 이를 분광광도계에 위치시키고, 적절한 파장에서 흡광도를 판독한다.

[0713] 상기 시스템은 또한 식기 세척을 위한 강화 효소 및/또는 세제 조성물을, 예를 들어, 천, 플라스틱 또는 세라믹

등의 적당한 기질 상의 혈액/우유/잉크 얼룩을 사용하여, 측정하는데 사용될 수도 있다.

[0714] 한 측면에서, BMI/면 조각건본에 25℃에서 30 분간 0.3% 과산화수소를 도포하거나, 또는 BMI/면 조각건본에 60℃에서 30 분간 0.03% 과산화수소를 도포하여 면에 BMI 얼룩을 고정한다. BMI/면 조각건본으로부터 대략 0.25" 의 소 조각건본을 절단해 내고, 이를 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 웰에 둔다. 각 웰 내로, 세제 조성물과 변이체 단백질 등의 효소의 공지된 혼합물을 넣는다. 집착 플레이트 봉합제를 마이크로타이터 플레이트의 상부에 둔 후, 마이크로타이터 플레이트를 알루미늄 플레이트에 고정시키고 대략 250 rpm 에서 약 10 내지 60 분 동안 오비탈 셰이커에서 진탕한다. 마지막에, 상청액을 새로운 마이크로타이터 플레이트 중의 웰로 옮기고, 620 nm 에서의 잉크의 흡광도를 측정한다. 상기는, 마찬가지로 0.01% 글루타르알데히드를 시금치/면 조각건본 또는 폴/면 조각건본에 25℃에서 30 분간 적용함으로써, 면에 고정된 시금치 얼룩 또는 폴 얼룩으로 시험할 수 있다. 초콜렛, 우유, 및/또는 그을음 얼룩으로도 동일한 시험을 실시할 수 있다. 추가의 혈액/우유/잉크 검정 및 조건은 U.S. Patent No. 7,122,334 (Genencor International, Inc.) 에 제공되어 있다.

[0715] 5.13 LAS 민감도 측정

[0716] 변이체를 상이한 농도의 LAS (선형 알킬 벤젠 술포네이트; Nansa 1169/P) 로 10 분 동안 40℃ 에서 인큐베이션한다.

[0717] 잔류 활성을 Phadebas[®] 검정법 또는 PNP-G₇ 기질을 이용하는 대안법을 이용해 측정한다.

[0718] LAS 를 0.1 M 포스페이트 완충액 pH 7.5 중에서 희석한다.

[0719] 하기의 농도를 이용한다: 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 및 10 ppm 또는 LAS 없음.

[0720] 변이체를 10 ml 의 총 부피에서 0.01-5 mg/l 의 농도로 하는 상이한 LAS 완충액 중에서 희석하고, 온도조절 수조 내에서 10 분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션을 소량의 분취물을 콜드 검정 완충액에 옮김으로써 정지시킨다. 활성 측정 동안, 활성 측정에 영향을 끼치지 않도록, LAS 농도는 1 ppm 미만으로 하는 것이 중요하다.

[0721] 이때 잔류 활성을 상술한 Phadebas[®] 검정 또는 대안법을 이용하여 2세트로 측정한다.

[0722] 바탕값을 뺀 후에 활성을 측정한다.

[0723] LAS 가 없는 활성이 100% 이다.

[0724] 본 출원은 읽기 쉽도록 숫자를 매겨 수 많은 섹션을 조직화하였으나, 독자는 한 섹션에서의 진술이 다른 섹션에 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 이런 식으로, 본 개시의 상이한 섹션에서 사용된 제목을 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0725] 본 조성물 및 방법 및 이의 장점을 추가로 예시하기 위해, 하기의 구체적인 실시예를 제공하였는데, 이들은 본 조성물 및 방법을 예시하도록 제공된 것이며, 어떠한 식으로든 이의 영역을 제한하는 방식으로 해석해서는 안 된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0726] 개시 전체에서 하기 약자가 적용된다: wt% (중량퍼센트); °C(섭씨 온도); H₂O (물); dH₂O 또는 DI (탈이온수); dIH₂O (탈이온수, Milli-Q 여과); g 또는 gm (그램); µg (마이크로그램); mg (밀리그램); kg (킬로그램); µl 및 µL (마이크로리터); mL 및 ml (밀리리터); mm (밀리미터); µm (마이크로미터); M (몰); mM (밀리몰); µM (마이크로몰); U (단위); MW (분자량); sec (초); min(s) (분/분들); hr(s) (시간/시간들); DO (용존산소); W/V (중량 대 부피); W/W (중량 대 중량); V/V (부피 대 부피); Genencor (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA); Ncm (뉴튼 센티미터) 및 ETOH (에탄올). eq (당량); N (Normal); ds 또는 DS (건조 고체 함량).

[0727] 실시예 1

[0728] B. 서브틸리스 내 AmyTS23 의 발현

[0729] AmyTS23 전장 발현을 시험하기 위해, 도 3 에 나타난 합성 DNA 서열 (Geneart, Regensburg, Germany 가 제작)

를 LAT (*리체니포르미스 아밀라아제*) 프로모터 뒤에 클로닝하고, LAT 신호 펩티드를 인코딩하는 서열에 프레임으로 하여 벡터 pHPLT (예를 들어, W02005111203 및 [Solingen et al. (2001) *Extremophiles* 5: 333- 341] 참고) 에 융합하고, 9 프로테아제 결실 *B. 서브틸리스* 균주로 형질전환시켰다 (degU^{hy}32, oppA, ΔspoII3501, amyE::xylRPxylAcomK⁻ ermC, ΔaprE, ΔnprE, Δepr, ΔispA, Δbpr, Δvpr, ΔwprA, Δmpr-ybfJ, ΔnprB) (예를 들어, US 공보 20050202535A1 참고). 네오마이신 (10 μg/ml) 내성 형질전환체는 요오드 염색 이후에 전분 플레이트 상에 할로 형성에 의해 판단되는 바와 같이 AmyTS23 아밀라아제를 분비한다 (W02005111203 참조). 이들 아밀라아제 양성 형질전환체 중 하나를 선택해 BG6006 (pHPLT-AmyTS23) 로 지명했다. 상기 균주의 배양물은 통상 37 deg 에서 60 내지 72 시간 동안 250 rpm 으로 하기 배지 중 (리터 당) 에서 성장시켰다: 10 g Soytone, 75 g 글루코오스, 7.2 g 우레아, 40 mM MOPS, 4 mM Tricine, 3 mM 2염기성 포타슘 포스페이트, 21.4 mM KOH, 50 mM NaCl, 276 μM 포타슘 술페이트, 528 μM 염화 마그네슘, 50 μM 트리나트륨 시트레이트 디히드레이트, 100 μM 칼슘 클로라이드 디히드레이트, 14 μM 철 술페이트 헵타히드레이트, 5.9 μM 망간 술페이트 디히드레이트, 5.7 μM 아연 술페이트 모노히드레이트, 2.9 μM 염화제2구리 2수화물, 4.2 μM 코발트 클로라이드 헥사히드레이트, 4.5 μM 나트륨 몰리브데이트 디히드레이트. 1 L 부피를 위해, Soytone 을 제외한 모든 성분들을 500 mL 중에서 혼합하고, 멸균 여과하고, 오토클레이브로 멸균해 놓은 동일 부의 2X Soytone 에 첨가했다. 미량 금속 및 시트레이트를 100X 또는 1000X 스톡 용액으로서 만들 수 있다. 완충액, 포타슘 히드록시드, 염화나트륨, 포타슘 술페이트, 및 염화 마그네슘 및 미량 금속을 10X 스톡 용액으로서 제조할 수 있다. 모든 성분들을 혼합한 후에, pH 를 7.3 으로 조절하였다. 이용하기 전에 상기 배지를 20 mM 염화칼슘으로 보충하였다.

[0730] 배양물은 두 주요 형태로 아밀라아제를 발현했다. 10% SDS-PAGE 겔 상 66 kDa 마커에서 고분자량 형태를 관측하였다. 더 짧은 형태를 55 kDa 에서 관측하였다.

[0731] 상기 고 분자량 성분을, 배양 액체배지로부터, 500 mL 의 상기 액체배지를 β-시클로텍스트린 (Sigma Aldrich Cat. No. c4767) 및 에폭시-활성화-세파로오스-6B (GE Healthcare, N.J. Cat. No. 17-0480-01) 로부터 표준 프로토콜에 의해 내부 합성된 10 mL 설정 부피의 β-시클로텍스트린-세파로오스 친화 매트릭스 수지로 하룻밤 4℃ 에서 약하게 교반하면서 처리하고, 상기 수지를 수집한 다음 2 mM 칼슘 클로라이드 (CaCl₂) 을 함유하는 25 mM bis-Tris 프로판 완충액 (pH 8.5) 으로 세척하여 분리시켰다. 상기 수지를 50 mM β-시클로텍스트린이 보충된 상기 동일한 완충액으로 세척함으로써 고분자량 효소를 용출하였다. 분획물을 SDS-PAGE 로 분석하고, 효소를 함유하는 것을 수집하고 투석하여 β-시클로텍스트린을 제거하였다. 효소 단백질 농도는 단백질 기준 역할하는 OxAM 아밀라아제 (Genencor) 로 겔 농도계측기에 의해 추산하였다.

[0732] 실시예 2

[0733] *B. 서브틸리스*에서 AmyTS23t 의 발현

[0734] 유전학적으로 절단된 AmyTS23 (AmyTS23t) 의 발현을 시험하기 위해, 도 4 에 나타낸 합성 DNA 단편을 pHPLT 로 클로닝하고, 실시예 1 에서 기술한 바와 같은 9 프로테아제 결실된 *B. 서브틸리스* 균주로 형질변환시켰다. 네오마이신 내성 형질변환체는 요오드 염색 이후에 전분 플레이트 상에 할로 형성으로 판단되는 바와 같이 AmyTS23t 아밀라아제를 분비한다. 이들 아밀라아제 양성 형질전환체 중 하나를 선택하여 BG6006(pME622.1) 로 지명하였다. 이 균주를 배양해 실시예 1 에 기술한 바와 같은 AmyTS23t 아밀라아제를 생성시켰다. 배양 상청액을 SDS-PAGE 로 검사하여, 55 kDa 의 예상 크기의 생성물을 생성하는 것이 드러났다.

[0735] 아밀라아제 단백질을 최종 농도 1 M 인 500 mL 의 배양액에 NH₄SO₄ 첨가로 부분 정제하였다. 다음으로, 10 mL 설정 부피의 페닐-세파로오스 수지를 첨가하고, 혼합물을 약하게 하룻밤 4℃ 에서 교반하였다. 수지를 수집하고 1 M NH₄SO₄ 및 2 mM 칼슘 클로라이드 (CaCl₂) 를 함유하는 25 mM bis-Tris 프로판 완충액 (pH 8.5) 으로 세척하였다. NH₄SO₄ 없이 동일한 완충액 중에서 효소 활성물을 용출하였다. 분획물을 SDS-PAGE 로 분석하였고, 효소를 함유하는 것들을 수집하고 투석하여 잔류 NH₄SO₄ 를 제거하였다. 효소 단백질 농도는 단백질 기준으로 역할하는 OxAM 아밀라아제 (Genencor International, Inc.) 를 이용해 겔 농도계측으로 추정하였다.

[0736] 실시예 3

[0737] 세정 스크리닝 검정 내에서의 AmyTS23

[0738] 실시예 1 에 나타난 부분 정제된 AmyTS23 전장을, 96-웰 CS28 오렌지색-염색 깔 전분 오염물 함유 조각건본 마이크로 도포 세정 검정에서 분석하였다. 상기 검정을 수행하기 위해, 96-웰 플레이트에 1 시간 동안 실온의 물 중에서 예비세척된 섬유로부터 잘라 통풍시킨 1/4 인치 섬유 조각건본을 로딩하였다. 이러한 행균은 느슨하게 결합되어 있는 오염물 상당량을 제거한다. 다르게는, 조각건본은, 또한 이들이 플레이트에 로딩된 후에 예비-세척되어 있기도 하다. 두 절차 모두 유사한 결과를 양산한다. 선택 완충액을 플레이트의 웰에 첨가하고, 플레이트를 바람직한 온도에 온도 평형화한다. 본 실시예에서, 검정은 25 mM HEPES (pH 8.0) 및 25 mM CAPS (pH 10.3) 완충액에서 실시하고, 인큐베이션은 20℃ 또는 40℃ 에서 하였다. 평형화 기간 이후, 효소를 원하는 농도로 첨가하고, 인큐베이션을 30 분 내지 1 시간 동안 Eppendorf Thermomix 조절 온도 블록에서 750 rpm 으로 진탕하면서 지속시킨다. 용액으로 발색되는 효소량에 의존하는 색으로 성능을 판단하였다. 발색은 488 nm 에서 분광광도법으로 정량하였다. 상기 검정에 대한 추가의 정보는 U.S. 특허 No. 7,122,334 를 참고한다.

[0739] 이 검정에서 상기 효소에 대한 세정 데이터를 도 6 (20℃) 및 도 7 (40℃) 에 나타낸다. 전장 AmyTS23 (AmyTS23f1) 은 pH 8.0 에서 얼룩 제거에 매우 유효하였으나, 또한 pH 10.3 에서도 놀라운 얼룩 제거를 보였다.

[0740] 데이터는 AmyTS23f1 이 두 pH 값 모두에서 대조군 (OxA,) 보다 더 양호하게 수행함을 보인다.

[0741] 상기 조각건본 검정은 상이한 목적에 따라 여러 방식으로 변형할 수 있다. 96-웰 검정은, 조각건본과 함께 효소의 인큐베이션 이후 흡광도 분광법으로 측정함으로써 고-처리량 세정 검정로서 매우 적합한 반면에, 예를 들어 웰에 맞게 잘린 조각건본을 갖는 24-웰 플레이트는 당업계에 공지되어 있는 바대로 반사도를 측정할 수 있는 더 큰 조각건본을 세척하는데 사용할 수 있다. 두 측정법, 상청액 흡광도 및 조각건본 반사도는 거의 완벽한 상관관계를 보였다.

[0742] 세척된 조각건본의 반사도와 상청액의 흡광도 간의 연관성은 높다; 측정 계수 r^2 는 0.99 값을 갖는다. 주로 검정은 384-웰 플레이트에 규격을 맞출 수 있다. 검정은 임의의 오염된 조각건본으로 수행할 수 있고, CS28 조각건본에 더해, CS26, CS27, 및 CS29 조각건본도 실시예 3 에 기술한 바와 같은 측정법의 효능을 입증하는데 시험할 수 있다 (예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 타피오카 전분, 각각; Testfabrics, Inc., West Pittston, PA). 상기 검정은 또한 세제 조성물로 이용될 수 있으며, 상이한 온도 및 상이한 pH 값으로 수행할 수도 있다. 이들 검정은 본원에서 참조 인용되고 있는 U.S. 특허 No. 7,122,334 에 맞추었다.

[0743] 실시예 4

[0744] AmyTS23t 에 대한 세정 스크리닝 검정

[0745] 실시예 2 에 기술되어 있는 부분 정제되고 절단된 AmyTS23 (AmyTS23t) 를 실시예 3 에 기술된 바와 같은 96-웰 CS28 오렌지색 염색 깔 전분 오염물 함유 조각건본 마이크로 도포 세정 검정으로 분석하였다. 상기 검정에서 상기 효소에 대한 세정 데이터는 도 8 (20℃) 및 도 9 (40℃) 에 나타낸다. 데이터는 AmyTS23t 가 대조군 아밀라아제 (OxA, Genencor 에서 수득가능한 시판중인 아밀라아제) 보다 두 pH 값에서 더 양호하게 수행한다는 점을 나타낸다. 도 6 및 8 의 비교는 절단된 AmyTS23 이 20℃ 에서 AmyTS23 전장 분자가 수행하는 것보다 더 양호하게 수행한다는 점을 분명하게 보여준다.

[0746] 실시예 5

[0747] B. 서브틸리스 내 AmyTS23 변이체의 발현

[0748] 이 실시예에서, AmyTS23t 의 변이체를 발현하는 바실러스 서브틸리스 균주의 구축물을 기술한다. 코돈 최적화 AmyTS23 유전자를 함유하는 합성 DNA 단편 056426 (Genart GmbH, Josef-Engert-strasse 11, D-93053 Regensburg, Germany 에서 제조) 은 주형 DNA 역할을 하였다. 바실러스 리체니포르미스 α-아밀라아제 (LAT) 프로모터 및 LAT 신호 펩티드 (pre LAT) 에 이어 클로닝을 위한 PstI 및 HpaI 제한 부위를 포함하는 pHPLT 벡터 (Solingen et al., Extremophiles 5:333- 341, [2001]) 를 AmyTS23t 변이체 발현에 사용하였다.

[0749] 3 가지의 DNA 단편을, 하기에 열거한 DNA 프라이머를 이용하는 PCR 로 제조하였다:

[0750] 1. 코돈 180 의 CGG 및 코돈 181 의 AGC 가 결실된 AmyTS23t (AmyTS23t ΔRS)

[0751] 2. 코돈 201 의 ATG 가 CTG 로 대체된 AmyTS23t (AmyTS23t(M201L))

[0752] 3. 코돈 201 의 ATG 가 CTG 로 대체되고, 또한 코돈 180 의 CGG 및 코돈 181 의 AGC 가 결실된 AmyTS23t (AmyTS23t(M201L + ΔRS))

프라이머 명칭	DNA 서열 (SEQ ID NO)
pHPLT-PstI-FW	CTCATTCTGCAGCTTCAGCAAATACGGCG (SEQ ID NO:7)
pHPLT-HpaI-RV	CTCTGTAACTCATTTGGCGACCCAGATTGAAACG (SEQ ID NO:8)
TS-deIRS-FW	CTATAAATTTACGGGCAAAGCATGGGATTGG (SEQ ID NO:9)
TS-deIRS-RV	TGCTTTGCCCGTAAATTTATAGATCCGGTTCAG (SEQ ID NO:10)
TS-M201L-FW	CTATGACTATCTGCTGTTTGCCGATCTG (SEQ ID NO:11)
TS-M201L-RV	CAGATCGGCAAACAGCAGATAGTCATAG (SEQ ID NO:12)
TS-deIRS/M201L-FW	GCATGGGATTGGGAAGTCGATACGGAAAACGGCAACTA TGACTATCTGCTGTTTGCCG (SEQ ID NO:13)
TS-deIRS/M201L-RV	CGTATCGACTTCCCAATCCCATGCTTTGCCCGTAAATTT ATAGATCCGGTTC (SEQ ID NO:14)

이들 DNA 프라이머를 Sigma에서 합성 및 탈염했다 (Sigma-Aldrich Chemie B.V., Postbus 27, 3330 AA Zwijndrecht, The Netherlands).

[0753]

[0754] 하기에 기술되는 PCR 반응 모두에 있어서, 최종 농도 0.2 μM DNA 프라이머를 이용하고 (전방향 및 역방향 프라이머), 및 0.1 - 10 ng 의 DNA 주형을 사용했다 (DNA 단편 056426 또는 pDNA pHPLT). 나아가, 모든 PCR 반응은 Finnzymes (Finnzymes OY, Keilaranta 16 A, 02150 Espoo, Finland) Phusion High-Fidelity DNA 중합효소 (Cat. no. F-530L) 을 이용해 50 μL 부피에서 완료했다. 또한 모든 PCR 반응 혼합물은 10 μL 의 5 x Phusion HF 완충액, 1 μL 의 10 mM dNTP 혼합물, 0.75 μL 의 Phusion DNA 중합효소 (2 단위/μL), 1 μL 의 100% DMSO 및 최종 부피가 50 μL 을 이루는 탈이온화, 오토클레이브된 물을 포함하였다. MJ Research PTC-200 Peltier 열 순환기 (MJ Research, 590 Lincoln Street, Waltham, MA 02451, USA) 를 이용하는 PCR 프로그램은, Finnzymes (제조업자 프로토콜) 에 기술된 대로 수행하였다: 98℃ 에서 30 sec., 30x (98℃ 에서 10 sec., 55℃ 에서 20 sec., 72℃ 에서 22 sec./kb), 5 min. 72℃.

[0755] 1. AmyTS23tΔRS 의 제조:

[0756] 두 PCR 반응을 합성 DNA 단편 056426 에서 프라이머 TS-deIRS-FW 및 pHPLT-HpaI-RV 를, 및 합성 DNA 단편 056426 에서 프라이머 TS-deIRS-RV 및 pHPLT-PstI-FW 를 이용해 수행했다. 이들 두 제조한 DNA 단편을 융합하기 위해, 양 반응물로부터의 1 μL 미정제 PCR 혼합물을, 프라이머 pHPLT-PstI-FW 및 pHPLT-HpaI-RV 가 첨가된 제 3 의 PCR 반응 샘플에 첨가하였다.

[0757] 증폭된 선형 1.5 kb DNA 단편을 정제하고 (Qiagen® Qiaquick PCR 정제 키트 Cat. no. 28106 를 이용함) 및 PstI 및 HpaI 제한 효소로 소화시켰다. 후속해서, AmyTS23t ΔRS (본원에서 AmyTS23t ΔRS 로도 지칭됨) DNA 단편 및 pHPLT pDNA (50 ng/μl 범위, PstI 및 HpaI 효소로 소화시킴) 을 모두 정제한 다음 (Qiagen® Qiaquick PCR 정제 키트 Cat. no. 28106 를 이용), PstI 및 HpaI 말단에서 결찰시켰다. 반응 조건은 하기와 같다:

[0758] 4 μL 의 정제되고, AmyTS23t ΔRS DNA 단편의 PstI 및 HpaI 소화물, 2 μL 의 정제되고 PstI 및 HpaI 소화된 pHPLT DNA 단편, 8 μL T4 DNA 리가아제 완충액 (Invitrogen® Cat. no. 46300-018), 25 μL 증류된, 오토클레이브된 물 및 1 μL T4 DNA 리가아제, 1 단위/μL (Invitrogen® Cat. no. 15224-017). 결찰 반응은 16-20 시간 동안 20℃ 에서 일어났다.

[0759] 후속해서, 결찰 혼합물을 *B. 서브틸리스* 균주로 형질전환시켰다 (ΔaprE, ΔnprE, Δepr, ΔispA, Δbpr) 및 (degU^{hy}32, oppA, ΔspoIIE3501, amyE::xylRPxylAcomK-ermC, (Δvpr, ΔwprA, Δmpr-ybfJ, ΔnprB). *B. 서브틸리스*로의 형질전환을 WO 02/14490 에 기술한 바와 같이 수행했다. *B. 서브틸리스* 형질전환체를 심장침출액 아가 (Difco, Cat. No. 244400) 및 10 mg/L 네오마이신을 함유하는 아가 플레이트 상에서 선택하였다. pHPLT- AmyTS23t ΔRS 박터를 갖는 *B. 서브틸리스* 형질전환체의 선택적 성장을 실시예 1 에 기술된 바와 같이

진탕 플라스크에서 수행하였다. 이러한 성장으로, 전분 아가 플레이트 상에서 배양 상청액을 스폿팅한 후 요오드 염색함으로써 시각화되는 전분 가수분해 활성을 갖는 분비된 AmyTS23t ΔRS 아밀라아제가 제조되었다.

2. AmyTS23t(M201L)의 제조:

동일한 프로토콜을 처음 두 PCR 반응을 제외하고는 "AmyTS23t ΔRS의 제조"에서 기술한 바와 같이 수행했다:

두 PCR 반응을, 합성 DNA 단편 056426 상에서 프라이머 TS-M201L-FW 및 pHPLT-HpaI-RV를 이용하고, 합성 DNA 단편 056426 상 프라이머 TS-M201L-RV 및 pHPLT-PstI-FW를 이용하여 수행했다.

3. AmyTS23t(M201L)-RSdelete의 제조:

동일한 프로토콜을 처음 두 PCR 반응을 제외한 "AmyTS23t ΔRS의 제조"에서 기술한 바와 같이 수행했다:

두 PCR 반응을, 합성 DNA 단편 056426 상 프라이머 TS-deIRS/M201L-FW 및 pHPLT-HpaI-RV 및 합성 DNA 단편 056426 상 프라이머 TS-deIRS/M201L-RV 및 pHPLT-PstI-FW를 이용하여 수행했다.

실시예 6

세제 내 AmyTS23t ΔRS의 개선된 안정성

AmyTS23t 및 AmyTS23t ΔRS의 안정성을 37°C에서 MOPS 완충액, 비활성화 Tide 및 원형 세제 (Prototype Formula A; 원형식 A)에서 촉진된 안정성 시험으로 시험했다. 효소 샘플을 37°C에서 비활성화 액체 Tide 또는 원형식 A 액체세제 중에서 인큐베이션하고, 잔류 활성을 시간 경과에 따라 Megazyme 검정으로 결정하였다.

그 결과를 도 10에 나타낸다. 두 세제 염기 (비활성화 Tide 및 원형 A 세제) 중 어느 하나의 존재하에서, 오로지 AmyTS23t ΔRS만이 임의의 부가적인 첨가제 없이 안정적이다. 도 10에서 나타나듯이, AmyTS23t는 제 1일 이후에 이의 활성 대부분을 잃고, 37°C에서 촉진된 시험 2일 후에는 완전히 활성을 잃었다. AmyTS23t ΔRS는 동일한 조건 하에서 안정적이고, 17일 후에 본래 효소 활성의 약 90%를 보유한다.

표 6-1

처리	보유된 효소 활성의 백분율					
	제 0일	제 1일	제 2일	제 3일	제 7일	제 17일
비활성화 Tide + AmyTS23tΔRS	100	106	89.5	94.8	87.5	88.9
비활성화 Tide + AmyTS23t	100	0				
비활성화 Tide + STZ	100	100	99.1	100	96.5	88.3
원형식 A + AmyTS23tΔRS	100	86.9	86.6	82.8	79.0	79.3
원형식 A + AmyTS23t	100	0				
원형식 A + STZ	100	86.5	88.7	86.5	77.7	78.2

실시예 7

AmyTS23 및 AmyTS23 돌연변이체의 산화 안정성

아밀라아제는 과산화아세트산 (PAA)의 노출에 대한 반응에 있어서 다양하다. 따라서, 이 실시예는 AmyTS23 및 AmyTS23 돌연변이 아밀라아제의 산화 안정성을 측정하도록 고안하였다. 조건 윤곽은 하기와 같다:

스트레스 조건	Megazyme 검정
30 mM 효소	차단된 PNPg7
25 mM 보레이트, pH 8.65	25 mM BTP/CaCl ₂ , pH 6.9
1 mM PAA, 40°C, 5 분	40°C 45 분 운동

- [0778] Quench 25 mM BTP, pH 8.5
- [0779] 효소 회석물을, 1 mL 스핀 탈염 컬럼 상 완충액 교환에 의한, 25 mM 보레이트 완충액 pH 8.64, 2 mM Ca^{+2} 중에서 제조하였다. 5 μL 부피로 함유된 과산화아세트산을 25 μL 의 효소 용액에 첨가해, 0 내지 1 mM 과산화아세트산을 수득하고, 샘플을 5 분 동안 40°C 에서 PCR 기기 (DNA Engine, BioRad) 중에서 인큐베이션하였다. 반응을 25 mM BTP, pH 8.5 를 이용해 켄칭 (quenching) 하였다. 잔류 아밀라아제 활성을 Megazyme (Wicklow, Ireland) 의 표준 아밀라아제 검정 키트를 이용해 측정했다.
- [0780] 도 11 에서 보듯이, TS23t(M201L) 은 저 PAA 농도에서 100% 초과 안정성을 지니며, 더 높은 농도에서는 감소한다. TS23t (M201L + ΔRS) 는 저 PAA 농도에서 안정성이 25% 증가하고, 최종적으로 고 PAA 농도에서 산화안정성을 유지하면서, 100% 미만으로 떨어진다. TS23t, TS23t ΔRS , 및 Amy 707 은, 저 농도 내지 기초선에서 안정성이 감소하므로 PAA 의 존재하에서 불안정하다.
- [0781] **실시예 8**
- [0782] **세제의 세정 성능**
- [0783] AmyTS23t ΔRS 의 선택된 농도의 용량 효율 곡선을, 본 출원의 섹션 5.12.1 에 기술된 절차를 이용해 만들었다. 성능 평가를 Tergotometer 를 이용해 20°C 및 40°C 모두에서 수행했다. 동일한 조건을 이용해 Stainzyme 및 Stainzyme Plus 에 대한 용량 효율 곡선을 만들었다. 데이터 (도 12) 에서 볼 수 있듯이, AmyTS23t ΔRS 가 20°C 에서 두 Stainzyme 제품 모두보다 현저하게 우수하고, 40°C 에서 적당하게 우수하다. 이러한 데이터로, 고유의 고 성능 냉수 효소로서 AmyTS23t ΔRS 의 고유의 이점이 지지된다.
- [0784] **실시예 9**
- [0785] ***B. 서브틸리스* 내 아밀라아제 생성**
- [0786] 이 실시예에서, *B. 서브틸리스* 내 *바실러스* 종 TS-23t 및 그의 변이체의 생성을 기술한다. 당업계에 공지된 대로 형질전환을 수행하였다 (예를 들어, WO 02/14490 를 참조). 요약하면, 모체 아밀라아제를 인코딩하는 유전자를, LAT 프로모터 (PLAT), LAT 신호 펩티드를 인코딩하는 서열 (preLAT) 다음으로 클로닝을 위한 PstI 및 HpaI 제한 부위를 함유하는 pHPLT 발현 벡터에 클로닝하였다.
- [0787] LAT 신호 펩티드에 대한 코딩 영역을 하기에 나타낸다:
atgaacaacaaaaacggctttacgcccgattgctgacgctgttatttgcgctcatcttctgctgcctcattctgcagcttcagca (SEQ ID NO:5).
- [0788] LAT 신호 펩티드의 아미노산 서열은 하기에 나타낸다:
MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASA (SEQ ID NO:6)
- [0789]
- [0790] 성숙 AmyTS-23t 아밀라아제에 대한 코딩 영역을 도 4 에 나타낸다.
- [0791] 성숙 AmyTS-23t 아밀라아제의 아미노산 서열을 본원에 기술된 변이체 라이브러리를 제조하기 위한 기초로서 사용하였으며, 도 2 에 나타낸다.
- [0792] PCR 생성물을 Qiagen 의 Qiaquick 컬럼을 이용해 정제하고, 50 μL 의 탈이온수 중에서 재현탁하였다. 50 μL 의 정제된 DNA 를 HpaI (Roche) 및 PstI (Roche) 로 소화시키고, 생성 DNA 를 30 μL 의 탈이온수 중에서 재현탁시켰다. 10-20 ng/ μL 의 DNA 를 PstI 및 HpaI 클로닝 부위를 이용해 플라스미드 pHPLT 로 클로닝하였다. 결찰 혼합물을 적격 *B. 서브틸리스* 세포에 직접 형질전환시켰다 (유전형: Δvpr , ΔwprA , $\Delta\text{mpr-ybfJ}$, ΔnprB). *B. 서브틸리스* 세포는 적격 유전자 (comK) 를 가지며, 이를 자일로오스 유도성 프로모터 하에 위치시켜, 자일로오스가 DNA 결합 및 섭취에 적격성을 유도하는데 사용하였다 (Hahn et al., Mol. Microbiol., 21 : 763-775 [1996] 참조).
- [0793] 플라스미드 pHPLT-AmyS 의 요소에는 하기가 포함된다: pUB110 = 플라스미드 pUB110 로부터의 DNA 단편 (McKenzie et al., Plasmid 15: 93-103 [1986]). 플라스미드 특징에는 하기가 포함된다: ori-pUB110 = pUB110 의 복제 기점; neo = pUB110 으로부터의 네오마이신 내성 유전자; Plat = *B. 리체니포르미스* 아밀라아제로부터의 전사 프로모터; Pre-LAT = *B. 리체니포르미스* 아밀라아제로부터의 신호 펩티드; SAMY 425ss = 절단

된 Amy TS-23 유전자 서열에 대한 코딩 영역 (상기 연구에서 발현된 각각의 절단된 Amy TS-23 변이체에 대한 코딩 영역에 의해 대체됨); 및 Terminator = *B. 리체니포르미스* 아밀라아제로부터의 전사 종결자

[0794] **아밀라아제 발현 - 2 mL 스케일.**

[0795] 150 μ L 의 LB 배지 + 10 μ g/ml 네오마이신을 함유하는 96-웰 배양 플레이트 (BD, 353075) 내로, 글리세롤 스톱으로부터의 스틸 96-웰 복제자를 이용해, AmyTS23t 발현 벡터 함유 *B. 서브틸리스* 클론을 복제하고 습한 밀폐 공간 내 37°C, 220 rpm 에서 하룻밤 성장시켰다. 하룻밤의 배양액으로부터 100 μ L 분취한 것을 사용해 5 mL 플라스틱 배양 시험관 중 2000 μ L 한정 배지+ 10 μ g/mL 네오마이신에 접종하였다. 배양 배지는, 주요 질소 공급원으로서 우레아, 주요 탄소 공급원으로서 글루코오스를 갖고, 강건한 세포 성장을 위한 1% soytone 및 5 mM 칼슘이 보충된 MOP 완충액 기재의 풍부한 반-한정 배지였다. 배양 시험관을 37°C, 250 rpm 에서 72 시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후에, 배양 액체배지를 10 분 동안 3000 x g 에서 원심분리했다. 상청액 용액을 15 mL 폴리프로필렌 원뿔 시험관에 디칸팅 (decanting) 하고, 각 샘플 80 μ L 를 단백질 정량화를 위해 96 웰 플레이트에 분취했다.

[0796] **바실러스 중 AmyTS23t 조합 전하 라이브러리 (combinatorial charge library; CCL) 의 제조.**

[0797] 관심있는 물리적 특성 범위를 포괄하는 다수의 단백질 변이체를 기존 라이브러리로부터 선택하거나, 또는 당업계에 공지되어 있는 부위-특이적 돌연변이유발 기법으로 제조했다 (예를 들어, U.S. Pat. Appln. Ser. Nos., 10/576,331, 11/581,102, 및 11/583,334 을 참조). 이어서, 이러한 프로브 단백질의 한정 세트를 관심 시험으로 검정했다.

[0798] AmyTS23t 는, 절단형의 *바실러스* 중 TS-23 알파 아밀라아제이다 (Lin et al., 1998, Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic Bacillus sp. TS-23, Biotechnol. Appl. Biochem. 28: 61-68 참고). 다수의 프로테아제가 결실된 *B. 서브틸리스* 균주 내에 서의 AmyTS23t 의 발현 ($\text{degU}^{\text{Hy}}32$, oppA, $\Delta\text{spoII3501}$, amyE::xylRPxylAcomK- ermC, ΔaprE , ΔnprE , Δepr , ΔispA , Δbpr , Δvpr , ΔwprA , $\Delta\text{mpr-ybfJ}$, ΔnprB) 을 본원에서 기술한다 (또한, U.S. 공보 20050202535A1 참조). 형질전환된 *B. 서브틸리스* 세포로부터 단리된 AmyTS23t 플라스미드 DNA 를 CCL 구축을 위한 주형으로서 DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA) 에 의뢰했다. DNA 2.0 은 하기의 7 가지 돌연변이를 AmyTS23t 에 도입함으로써 결과적으로 AmyTS23t-7mut 로 명명되어지는 CCL 을 위한 모체 구축물을 제조해 달라는 요청을 받았다: Q98R, M201L, S243Q, R309A, Q320R, Q359E, 및 K444E. 변이체는 96-웰 플레이트 내 글리세롤 스톱으로서 공급되었다. 후속해서, 표 9-1 에 나타난 AmyTS23t-7mut 아밀라아제에서의 네 부위의 각각에서 위치 라이브러리의 제조를 위해 DNA2.0 Inc. 에 의뢰했다.

[0799] AmyTS23t-7mut 조합 전하 라이브러리를, AmyTS23t-7mut 에서 하기의 네 잔기를 동정함으로써 고안했다: Gln 87, Asn 225, Asn 272, 및 Asn 282. 네 부위, 81-멤버 CCL 을 각 부위에서 3 가지 확률의 모든 조합으로 하여 만들었다: 야생형, 아르기닌 또는 아스파르트산.

표 9-1. AmyTS23t-7mut CCL 변이체

변이체 #	Q87	N225	N272	N282	Δ 전하
모체 1	-	-	-	-	0
2	Q87E	N225E	N272E	N282E	-4
3	Q87E	N225E	N272E	N282R	-2
4	Q87E	N225E	N272E	-	-3
5	Q87E	N225E	N272R	N282E	-2
6	Q87E	N225E	N272R	N282R	0
7	Q87E	N225E	N272R	-	-1
8	Q87E	N225E	-	N282E	-3
9	Q87E	N225E	-	N282R	-1
10	Q87E	N225E	-	-	-2
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2
12	Q87E	N225R	N272E	N282R	0
13	Q87E	N225R	N272E	-	-1
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0
15	Q87E	N225R	N272R	N282R	+2
16	Q87E	N225R	N272R	-	+1
17	Q87E	N225R	-	N282E	-1
18	Q87E	N225R	-	N282R	+1
19	Q87E	N225R	-	-	0
20	Q87E	-	N272E	N282E	-3
21	Q87E	-	N272E	N282R	-1
22	Q87E	-	N272E	-	-2
23	Q87E	-	N272R	N282E	-1
24	Q87E	-	N272R	N282R	+1
25	Q87E	-	N272R	-	0
26	Q87E	-	-	N282E	-2

[0800]

변이체 #	Q87	N225	N272	N282	Δ 전하
27	Q87E	-	-	N282R	0
28	Q87E	-	-	-	-1
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2
30	Q87R	N225E	N272E	N282R	0
31	Q87R	N225E	N272E	-	-1
32	Q87R	N225E	N272R	N282E	0
33	Q87R	N225E	N272R	N282R	+2
34	Q87R	N225E	N272R	-	+1
35	Q87R	N225E	-	N282E	-1
36	Q87R	N225E	-	N282R	+1
37	Q87R	N225E	-	-	0
38	Q87R	N225R	N272E	N282E	0
39	Q87R	N225R	N272E	N282R	+2
40	Q87R	N225R	N272E	-	+1
41	Q87R	N225R	N272R	N282E	+2
42	Q87R	N225R	N272R	N282R	+4
43	Q87R	N225R	N272R	-	+3
44	Q87R	N225R	-	N282E	+1
45	Q87R	N225R	-	N282R	+3
46	Q87R	N225R	-	-	+2
47	Q87R	-	N272E	N282E	-1
48	Q87R	-	N272E	N282R	+1
49	Q87R	-	N272E	-	0
50	Q87R	-	N272R	N282E	+1
51	Q87R	-	N272R	N282R	+3
52	Q87R	-	N272R	-	+2
53	Q87R	-	-	N282E	0
54	Q87R	-	-	N282R	+2
55	Q87R	-	-	-	+1
56	-	N225E	N272E	N282E	-3
57	-	N225E	N272E	N282R	-1
58	-	N225E	N272E	-	-2
59	-	N225E	N272R	N282E	-1
60	-	N225E	N272R	N282R	+1
61	-	N225E	N272R	-	0
62	-	N225E	-	N282E	-2
63	-	N225E	-	N282R	0
64	-	N225E	-	-	-1
65	-	N225R	N272E	N282E	-1
66	-	N225R	N272E	N282R	+1
67	-	N225R	N272E	-	0
68	-	N225R	N272R	N282E	+1
69	-	N225R	N272R	N282R	+3
70	-	N225R	N272R	-	+2
71	-	N225R	-	N282E	0
72	-	N225R	-	N282R	+2
73	-	N225R	-	-	+1

[0801]

변이체 #	Q87	N225	N272	N282	Δ 전하
74	-	-	N272E	N282E	-2
75	-	-	N272E	N282R	0
76	-	-	N272E	-	-1
77	-	-	N272R	N282E	0
78	-	-	N272R	N282R	+2
79	-	-	N272R	-	+1
80	-	-	-	N282E	-1
81	-	-	-	N282R	+1

[0802]

[0803] 실시예 10

[0804] 성능 지수

[0805] 쌀 극소조각건본 검정.

[0806] 시험 세제를 본원 내 다른 데에서 기재된 대로 제조하였다. 사용된 장치에는 New Brunswick Innova 4230 웨이커/인큐베이터 및 SpectraMAX (340 형) MTP 판독기가 포함된다. MTP 는 Corning (3641 형) 에서 수득하였다. 오렌지색 색소를 갖는 숙성된 쌀 전분의 조각건본 (CS-28) 을 Center for Test Materials (Vlaardingen, 네덜란드) 로부터 수득했다. 0.25 인치 원형 극소조각건본으로 자르기 전에, 섬유를 물로 세척했다. 두 개의 극소조각건본을 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 넣었다. 시험 세제를 20℃ (북아메리카) 또는 40℃ (서유럽) 에서 평형화하였다. 190 μL 의 세제 용액을 극소 조각건본을 포함하는 MTP 의 각 웰에 첨가했다. 상기 혼합물에, 10 μL 의 희석된 효소 용액을 첨가했다. MTP 를 접착 호일로 밀봉하고, 인큐베이터에 1 시간 동안 원하는 시험 온도 (전형적으로는 20℃ 또는 40℃) 에서 750 rpm 으로 교반하면서 놓았다. 인큐베이션 후, 각 웰로부터의 150 μL 의 용액을 새 MTP 에 옮겼다. 이 MTP 를 SpectraMax MTP 판독기를 이용해 488 nm 에서 판독하여 세정력을 수량화했다. 공 대조군뿐 아니라 극소조각건본 및 세제를 포함하나, 효소는 없는 대조군도 또한 포함된다.

[0807] 세제 열 비활성화.

[0808] 시중 규격 세제의 열 비활성화는, 비(非)효소 성분의 특성은 보유하지만 임의의 단백질 성분의 효소 활성을 파괴하는데 역할을 한다. 따라서, 이러한 방법은 본 조성물 및 방법의 효소 변이체를 시험할 때 이용되는 시중에서 구입한 세제를 제조시에 적합하였다. 북아메리카 (NA) 및 서유럽 (WE) 의 중질 액체 세탁 (Heavy duty liquid laundry; HDL) 세제와 관련해서, 열 비활성화를 2 시간 동안 95℃ 에서 수조 내에서 미리 중량을 잰 액체 세제 (유리병 내) 를 둬으로써 수행했다. 북아메리카 (NA) 및 일본 (JPN) 중질 과립형 세탁 (HDG) 세제의 열 비활성화를 위한 인큐베이션 시간은 8 시간이었고, 서유럽 (WE) HDG 세제에 있어서는 5 시간이었다. NA 및 WE 자동 식기 세척 (ADW) 세제의 열 비활성화를 위한 인큐베이션 시간은 8 시간이었다. 세제를 현지 슈퍼마켓 가게에서 구입했다. 정확하게 백분을 비활성화를 측정하기 위해, 가열되지 않은 세제 및 가열된 세제 모두를 5 분의 용해 내로 하여 이들을 검정했다. 효소 활성을 1 mg/mL AAPF 을 이용하는 AAPF 검정으로 시험했다.

[0809] 열-비활성화 세제 내 효소 활성을 시험하기 위해, 열 비활성화 스톱으로 세제의 작업 용액을 만들었다. 적절량의 물 경도 (6 gpg 또는 12 gpg) 및 완충액을 세제 용액에 첨가하여 원하는 조건에 맞추었다 (표 10-1). 용액을 보르텍스하거나 또는 병을 뒤집음으로써 혼합했다.

표 10-1. 세탁 및 식기세척 조건							
지역	형태	용량	세제*	완충액	Gpg	pH	T (°C)
세탁 (중질 액체 및 과립형)							
NA	HDL	0.78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0 g/L	Henkel Persil	5 mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0 g/L	P&G Ariel	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
NA	HDG	1.0 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
자동 식기 세척							
WE	ADW	3.0 g/L	RB Calgonit	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3.0 g/L	P&G Cascade	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

* 약자 : Proctor & Gamble (P&G); 및 Reckitt Benckiser (RB).

효소 성능의 산출.

수득한 흡광도 값을 바탕값 (blank value; 즉, 효소 부재하의 극소 조각견본의 인큐베이션 후 수득된 값) 에 대해 보정했다. 생성 흡광도는 가수분해 활성에 대한 척도이다. 결과를 표 10-2 및 10-3 에 나타낸다.

효소 성능은 상술한 바와 같이 열 비활성화 세제를 이용해 평가하였다. 우승자란 1 초과의 성능 지수 (PI) 를 갖는 것으로서 정의된다. PI 는 돌연변이체 잔류 활성 대 WT 잔류 활성의 비율이다.

표 10-2: TS23t-7mut CCL - CS-28 알 전분 극소조각견본 우승자, Tide 2x

변이체#	87	225	272	282	rel 전하	PI
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2	1.24
12	Q87E	N225R	N272E	N282R	0	1.20
13	Q87E	N225R	N272E		-1	1.16
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0	1.15
17	Q87E	N225R		N282E	-1	1.34
18	Q87E	N225R		N282R	1	1.26
19	Q87E	N225R			0	1.34
20	Q87E		N272E	N282E	-3	1.17
21	Q87E		N272E	N282R	-1	1.34
22	Q87E		N272E		-2	1.13
27	Q87E			N282R	0	1.22
28	Q87E				-1	1.22
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2	1.44
30	Q87R	N225E	N272E	N282R	0	1.15
31	Q87R	N225E	N272E		-1	1.36
36	Q87R	N225E		N282E	-1	1.15
40	Q87R	N225R	N272E		1	1.27
44	Q87R	N225R		N282E	1	1.38
45	Q87R	N225R		N282R	3	1.21
47	Q87R		N272E	N282E	-1	1.65
48	Q87R		N272E	N282R	1	1.52
49	Q87R		N272E		0	1.28
50	Q87R		N272R	N282E	1	1.10
53	Q87R			N282E	0	1.47
54	Q87R			N282R	2	1.25
55	Q87R				1	1.51
64		N225E			-1	1.15
85		N225R	N272E	N282E	-1	1.26
66		N225R	N272E	N282R	1	1.22
67		N225R	N272E		0	1.19
74			N272E	N282E	-2	1.21
76			N272E		-1	1.13
80				N282E	-1	1.27
81				N282R	1	1.49

표 10-3: TS-23t-7mut CCL CS-28 쌀 전분 극소조각견본 우승자, Persil

변이체 #	87	225	272	282	rel 전하	PI
4	Q87E	N225E	N272E	0	-3	1.13
6	Q87E	N225E	N272R	N282R	0	1.11
9	Q87E	N225E		N282R	-1	1.20
10	Q87E	N225E		0	-2	1.17
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2	1.41
13	Q87E	N225R	N272E	0	-1	1.40
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0	1.28
15	Q87E	N225R	N272R	N282R	2	1.13
16	Q87E	N225R	N272R	0	1	1.17
17	Q87E	N225R		N282E	-1	1.51
18	Q87E	N225R		N282R	1	1.47
19	Q87E	N225R		0	0	1.48
20	Q87E		N272E	N282E	-3	1.46
21	Q87E		N272E	N282R	-1	1.40
22	Q87E		N272E	0	-2	1.42
25	Q87E		N272R	0	0	1.18
26	Q87E			N282E	-2	1.54
27	Q87E			N282R	0	1.47
28	Q87E			0	-1	1.40
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2	1.46
30	Q87R	N225E	N272E	N282R	0	1.59
31	Q87R	N225E	N272E	0	-1	1.14
34	Q87R	N225E	N272R	0	1	1.29
35	Q87R	N225E		N282E	-1	1.47
36	Q87R	N225E		N282R	1	1.62
37	Q87R	N225E		0	0	1.53
38	Q87R	N225R	N272E	N282E	0	1.13
39	Q87R	N225R	N272E	N282R	2	1.13
40	Q87R	N225R	N272E	0	1	1.17
41	Q87R	N225R	N272R	N282E	2	1.31
44	Q87R	N225R		N282E	1	1.26
47	Q87R		N272E	N282E	-1	1.45
48	Q87R		N272E	N282R	1	1.50
49	Q87R		N272E	0	0	1.17
50	Q87R		N272R	N282E	1	1.16
53	Q87R			N282E	0	1.21
54	Q87R			N282R	2	1.30
55	Q87R			0	1	1.33
56		N225E	N272E	N282E	-3	1.29
57		N225E	N272E	N282R	-1	1.12
58		N225E	N272E	0	-2	1.41
59		N225E	N272R	N282E	-1	1.16
61		N225E	N272R	0	0	1.20

[0814]

변이체 #	87	225	272	282	rel 전하	PI
66		N225R	N272E	N282R	1	1.27
67		N225R	N272E	0	0	1.34
71		N225R		N282E	0	1.17
73		N225R		0	1	1.12
74			N272E	N282E	-2	1.29
75			N272E	N282R	0	1.24
76			N272E	0	-1	1.20
78			N272R	N282R	2	1.18
79			N272R	0	1	1.11
80				N282E	-1	1.11
81				N282R	1	1.33

[0815]

[0816]

실시예 11

[0817]

조합된 LAS/킬란트 (Chelant) 안정성

[0818]

이 실시예에서는 음이온성 계면활성제 및 킬란트를 함유하는 반응 배지에서 단백질 전하 및 안정성 간의 관계 측정을 기술하였다. LAS 안정성은, 0.1% LAS (도데실벤젠설포네이트 나트륨) 및 10 mM EDTA 의 존재하에서 시험 아밀라아제의 인큐베이션 후에, 상술한 방법에 따라 BODIPY 검정에서 잔류 활성을 측정함으로써 측정하였다. 스트레스 및 비(非)스트레스 샘플의 알파-아밀라아제 활성의 측정을 위해, BODIPY-전분 검정을 이용했다. 스트레스 플레이트로부터의 잔류 LAS 및 EDTA 는 BODIPY-전분 검정에 영향을 미치지 않는다.

- [0819] 사용된 시약은 하기를 포함한다: 대조군 완충액: 50 mM HEPES, 0.005% Tween-80, pH 8.0 및 스트레스 완충액 50 mM HEPES, 0.1% (w/v) LAS (도데실벤젠-술포네이트, 나트륨 염, Sigma D-2525), 10 mM EDTA, pH 8.0). 효소 변이체 (20 ppm) 를 대조군 또는 스트레스 완충액을 함유하는 96-웰 비결합 평평 바닥 플레이트에 1:20 희석하고 혼합했다. 대조군 플레이트를 실온에서 인큐베이션한 반면에, 스트레스 플레이트는 37°C 에서 30-60 분 동안 (시험될 효소의 안정성에 좌우됨) 즉시 놓았다. 인큐베이션 후, 효소 활성을 아밀라아제에 대한 BODIPY-전분 검정을 이용해 측정했다. 남은 또는 잔류 활성의 분획물은, 대조군 샘플의 반응비로 나눈 스트레스 받은 샘플의 반응비와 동일하다. 모체 효소 및 변이체는 60 분 동안 대조군 완충액에서 안정적이다.
- [0820] 표 11-1 은, 80 개의 변이체를 함유하는 라이브러리에 있어서, 야생형 TS-23t-7mut 에 대한 총 (net) 전하 변동의 함수로서 강화된 LAS/EDTA 안정성을 갖는 변이체에 대한 데이터를 보여준다. 이 라이브러리를 실시예 2 에 기술한 방법에 따라 고안하고 구축하여 모체 TS-23t-7mut 분자와 비교되는 수 총 전하를 포괄시켰다.
- [0821] 1 초과와 성능 지수 (PI) 란, 변이체가 상기 전분 기질 (옥수수 전분) 상에서 S242Q 모체보다 특이 활성이 더 높다는 점을 나타낸다.

표 11-1: TS23t-7mut CCL - LAS/EDTA 안정성 우승자

변이체 #	87	225	272	282	전하	Mut 잔류활성/ WT 잔류활성(PI)
2	Q87E	N225E	N272E	N282E	-4	1.39
5	Q87E	N225E	N272R	N282E	-2	1.51
8	Q87E	N225E		N282E	-3	1.29
11	Q87E	N225R	N272E	N282E	-2	1.38
14	Q87E	N225R	N272R	N282E	0	1.64
17	Q87E	N225R		N282E	-1	1.39
20	Q87E		N272E	N282E	-3	1.39
23	Q87E		N272R	N282E	-1	1.65
26	Q87E			N282E	-2	1.41
29	Q87R	N225E	N272E	N282E	-2	2.02
31	Q87R	N225E	N272E	0	-1	1.39
32	Q87R	N225E	N272R	N282E	0	2.21
33	Q87R	N225E	N272R	N282R	2	1.29
34	Q87R	N225E	N272R	0	1	1.47
35	Q87R	N225E		N282E	-1	2.08
37	Q87R	N225E		0	0	1.41
38	Q87R	N225R	N272E	N282E	0	1.85
40	Q87R	N225R	N272E	0	1	1.38
41	Q87R	N225R	N272R	N282E	2	2.15
43	Q87R	N225R	N272R	0	3	1.63
44	Q87R	N225R		N282E	1	2.33
46	Q87R	N225R		0	2	1.62
47	Q87R		N272E	N282E	-1	2.38
48	Q87R		N272E	N282R	1	1.24
49	Q87R		N272E	0	0	1.53
50	Q87R		N272R	N282E	1	2.14
51	Q87R		N272R	N282R	3	1.25
52	Q87R		N272R	0	2	1.60
53	Q87R			N282E	0	2.27
54	Q87R			N282R	2	1.34
55	Q87R			0	1	1.62
56	0	N225E	N272E	N282E	-3	1.69
59	0	N225E	N272R	N282E	-1	1.77
62	0	N225E		N282E	-2	1.50
65	0	N225R	N272E	N282E	-1	1.66
67	0	N225R	N272E	0	0	1.24
68	0	N225R	N272R	N282E	1	1.80
70	0	N225R	N272R	0	2	1.25
71	0	N225R		N282E	0	1.48

[0822]

변이체 #	87	225	272	282	전하	Mut 잔류활성/ WT 잔류활성(PI)
73	0	N225R		0	1	1.29
74	0		N272E	N282E	-2	1.64
77	0		N272R	N282E	0	1.78
80	0			N282E	-1	1.52

[0823]

[0824] ASP 및 FNA 에 있어서는, LAS/EDTA 안정성 (2008 년 6 월 6 일에 제출된 WO/2008/153925, Genencor Attorney

Docket No. 30974WO-2 참조) 의 전하 의존성이 존재한다. - 전하를 첨가하면 안정성이 증가한다. 그러나, 본 출원인의 방법에 의하면, 모체보다 1 또는 2 전하가 더 양성인 것을 이용하는 경우에서조차도, 모체보다 더 큰 또는 동일한 안정성을 부여하는 전하 돌연변이 배열을 찾을 수 있다. 이러한 접근법은 또한 더 큰 효소, 예컨대 도 13 에 나타난 TS23t '에서 유효한데, 여기서 안정성 면에서 양성 전하 첨가의 악영향은 안정성을 증가시키는 최적의 전하 배열로 보상받을 수 있다.

[0825]

상기에서 언급된 모든 공보 및 특허는 본원에서 참조로 인용된다. 각종 변경 및 변형은 본 발명의 영역 및 취지로부터 벗어나지 않은 채 당업자에게는 자명할 것이다. 비록 본 조성물 및 방법을 특정 바람직한 구현예와 연관지어 설명하였더라도, 이들이 그러한 특정한 구현예로 과도하게 한정되어지지 않아야 된다는 점은 분명하다. 정말로, 당업자에게 분명한 본 조성물 및 방법을 실시하기 위해 기술되어 있는 형식들의 각종 변형은 하기 청구항 범위 내에 존재하는 것으로 의도된다.

도면

도면1

SEQ ID NO: 1

AmyTS23의 서열 (전장 분자, 성숙 사슬 ; 583 개의 아미노산 ;
신호 서열 없음) :

```
ntapinetmmqyfewdlpndgtlwtkvkneaanlsslgitalwlppaykgtsq
sdvgygydlydlgefngkgktirtkygkktqyiqaiqaakaagmqvyadvfn
hkagadgtefvdavevdpsnrnqetsgtyqiqawtkfdfpgrgntyssfkwrw
yhfdgtdwdesrklrnriykfrstgkawdwevdtengnydylmfadldmdhpev
vtelknwgtwyvnttnidgfrldavkhikysffpdwltyvrnqtgknlfavge
fwsydvnlhnyitktngsmslfdaplhnnfytaskssgyfdmryllnntlmk
dqpslavtlvdnhdtpqgqslqswvepwfkplayafiltrqegypcvfygdy
gipkynipglkskidplliarrdyaygtqrdyidhqdiigwtregidtkpns
laalitdgpggskwmyvgkhhagkvfydltgnrsdtvtinadgwgfevknggs
vsiwvaktstnvtftvnnatttsgqnvyvvanipelgnwntanaikmnpssypt
wkatialpqgkaiefkfikkdgagnviwestsnrtytvpfsstgsytaswnvp
```

도면2

SEQ ID NO: 2

AmyTS23t의 서열 (절단된 분자, 성숙 사슬)

```
ntapinetmmqyfewdlpndgtlwtkvkneaanlsslgitalwlppaykgtsq
sdvgygydlydlgefngkgktirtkygkktqyiqaiqaakaagmqvyadvfn
hkagadgtefvdavevdpsnrnqetsgtyqiqawtkfdfpgrgntyssfkwrw
yhfdgtdwdesrklrnriykfrstgkawdwevdtengnydylmfadldmdhpev
vtelknwgtwyvnttnidgfrldavkhikysffpdwltyvrnqtgknlfavge
fwsydvnlhnyitktngsmslfdaplhnnfytaskssgyfdmryllnntlmk
dqpslavtlvdnhdtpqgqslqswvepwfkplayafiltrqegypcvfygdy
gipkynipglkskidplliarrdyaygtqrdyidhqdiigwtregidtkpns
laalitdgpggskwmyvgkhhagkvfydltgnrsdtvtinadgwgfevknggs
vsiwvak
```

도면3

SEQ ID NO: 3

최적화 AmyTS23 유전자의 DNA 서열

aatacggcgccgatcaacgaaacgatgatgcagtatTTTTgaatgggatctgccgaatg
atggaacgctgtggacgaaagtcaaaaacgaaagcggcgaaatcttagcagcctgggaat
cacagcactttggcttccgcccggcatataaaggaaacgagccaaagcgatgtcggctat
ggcgtctatgatctgtatgacctgggcgaatttaacccaaaaggcagatccggacga
aatatggcacgaaaacacagtatatccaagcgatccaggcagcaaaagcagcaggcat
gcaagtctatgccgacgtcgtctttaatcataaaagcgggagcggatggcacagaattt
gtcgatgccgtcgaagtgtgatccgagcaacagaaaaccaagaaacgagcggcacgtatc
aaatccaagcgtggacgaaatttgattttcgggcagaggcaatacgtatagcagctt
taaattggcgtcgttatcattttgacggcacggattgggatgaaagcagaaaactgaac
cggatctataaatttcgggacacgggcaaacgcatgggattgggaagtcgatacggaaa
acggcaactatgactatctgatgtttgccgatctggatatggatcatccggaagtcgt
cacggaaactgaaaaattggggcacgtggtatgttaatacgcagcaacatcgatggctt
agactggatgccgtcaaacatatcaaatatagctttttccggactggctgacgtatg
tcagaaaccagacgggcaaaaaccttttgccgtcggcgaaatttgagctatgacgt
caacaaacttcataactatatcacgaaaacgaacggcagcatgagcctttttgatgcc
ccgcttcataacaacttttatacggcgagcaaaagctcaggctattttgatatgagat
atctgctgaacaacacgctgatgaaagatcaaccgagcctggcagtcacactggtcga
taacctgatatacaaacgggccaagccttcaaagctgggtcgaacgtggtttaaa
ccgctggcgtatgcctttatcctgacgagacaagaagggtatccttgctgtctttatg
gcgactattatggcatcccgaatatataatcccgggctgaaaagcaaaatcgatcc
gctgctgatcgccagacgggattatgcctatggcacacagcgggattatatcgacct
caggacatcatcggtggacaagaaggcatcgatacgaaccgaaatagcggactgg
cagcactgattacagatggacgggcccgaagcaaatggatgtatgtcggcaaaaaaca
tgccggcaaaagtcttttatgatctgacgggcaacagaagcgatacggtcacgatcaat
gctgatggctggggagaaatttaaagtcaatggcggcagcgtttcaatctgggtcgcca
aaacgagcaatgtcacgtttacggtcaacaatgccacgacaacgagcggcctaaatgt
ctatgtcgtcgccaatatcccggaactgggcaattggaatacggcgaaacgcaatcaaa
atgaaccggcagcgtatccgacatggaaagcgacaatcgctctgcccgaaggaaaag
cgatcgaatttaaatttatcaaaaagaccaggcgggcaatgttatgggaaagcac
gagcaatagaacgtatacgggtcccgcttttagcagcacaggaaagctatacagcgagctgg
aatgttccgtga

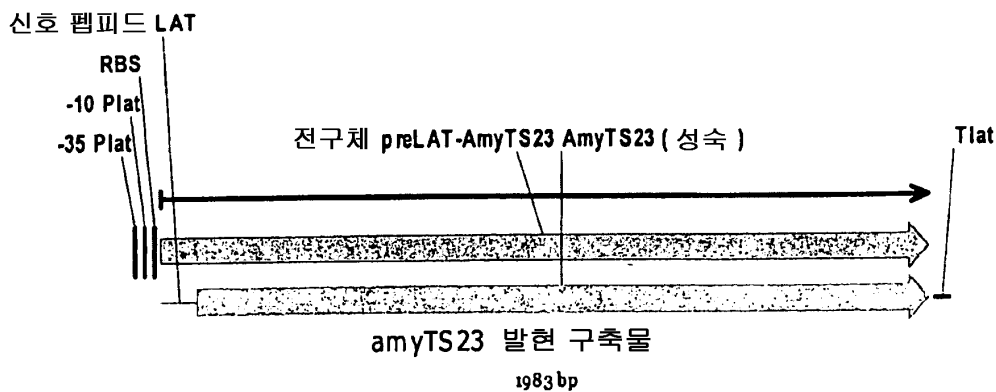
도면4

SEQ ID NO: 4

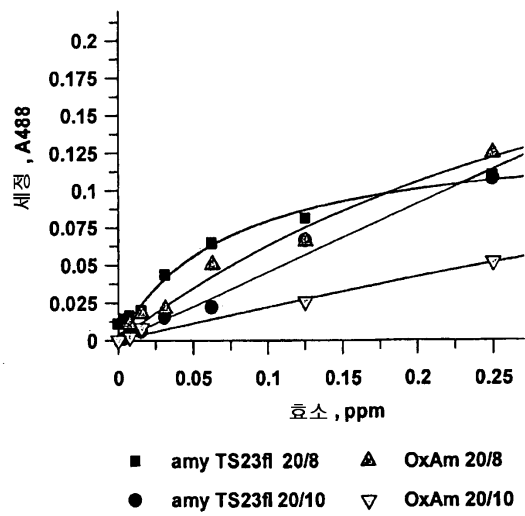
최적화 AmyTS23t 유전자의 DNA 서열

aatacggcgccgatcaacgaaacgatgatgcagtatTTTgaatgggatctgccgaatg
atggaacgctgtggacgaaagtcaaaaacgaagcggcgaatcttagcagcctgggaat
cacagcactTTTggcttccgcccgcataaaaggaacgagccaaagcgatgtcggctat
ggcgtctatgatctgtatgacctgggcgaatttaacccaaaaggcacgatccggacga
aatatggcacgaaaaacacagtatatccaagcgatccaggcagcaaaagcagcaggcat
gcaagtctatgccgacgtcgtctTTAatcataaaagcgggagcggatggcacagaattt
gtcgatgccgtcgaagttgatccgagcaacagaaaccaagaaacgagcgggcacgtatc
aaatccaagcgtggacgaaatttgattttccgggcagaggcaatacgtatagcagctt
taaatggcgctggtatcattttgacggcacggattgggatgaaagcagaaaactgaac
cggatctataaatttcggagcacgggcaaagcatgggattgggaagtcgatacggaaa
acggcaactatgactatctgatgtttgccgatctggatatggatcatccggaagtcgt
cacggaaactgaaaaattggggcacgtggtatgttaatacgcgaacatcgatggcttt
agactggatgccgtcaaacatatcaaatatagctTTTTTccggactggctgacgtatg
tcagaaaccagacgggcaaaaacctTTTTTgccgtcggcgaattttggagctatgacgt
caacaaacttcataactatatcacgaaaacgaacggcagcatgagcctTTTTTgatgcc
ccgcttcataacaactTTTtatacggcgagcaaaagctcaggctatTTTgatatgagat
atctgctgaacaacacgctgatgaaagatcaaccgagcctggcagtcacactggtcga
taaccatgatcacacaaccggggccaaagccttcaaagctgggtcgaaccgtgggttaa
ccgctggcgtatgcctTTTatcctgacgagacaagaagggtatccttgctctTTTatg
gagactattatggcatcccgaatatataatcccgggcctgaaaagcaaaatcgatcc
gctgctgatcgccagacgggattatgcctatggcacacagcgggatttatcgaccat
caggacatcatcggctggacaagagaaggcatcgatacgaaccgaatagcggactgg
cagcactgattacagatggaccgggcggaagcaaatggatgtatgtcggcaaaaaaca
tgccggc aaagtctTTTtattgatctgacgggcaacagaagcgatacgggtcacgatcaat
gctgatggctggggagaatttaaagtcaatggcggcagcgtttcaatctgggtcgcca
aatga

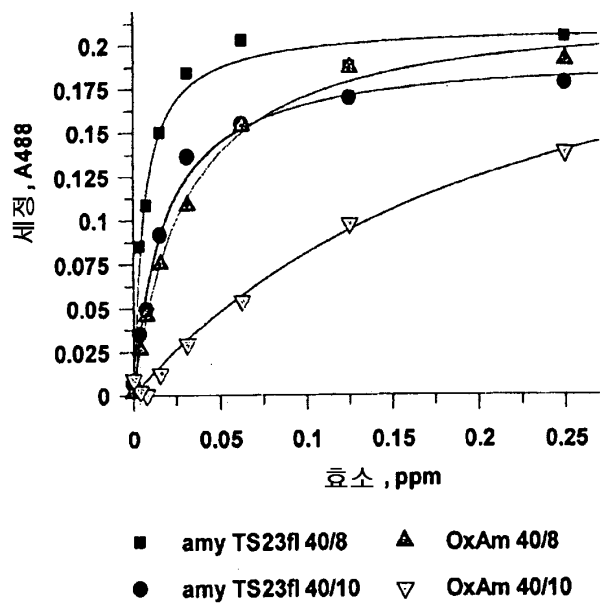
도면5



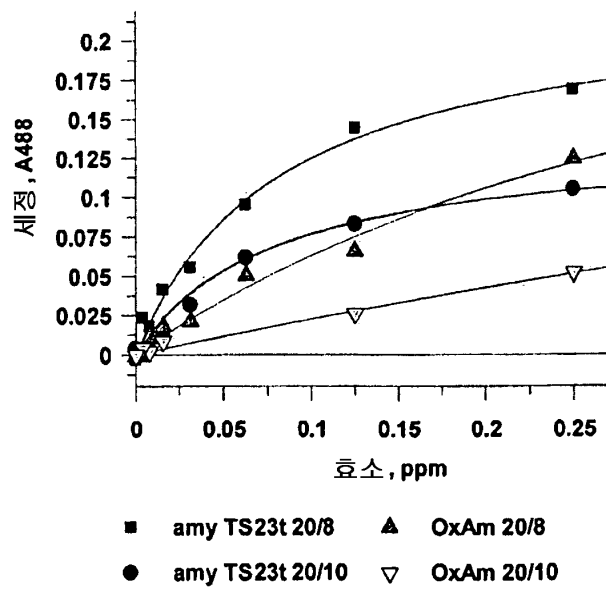
도면6



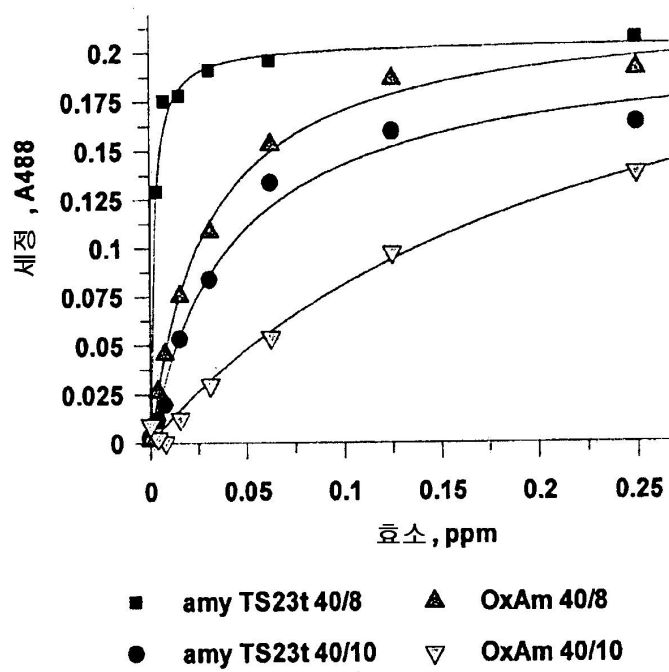
도면7



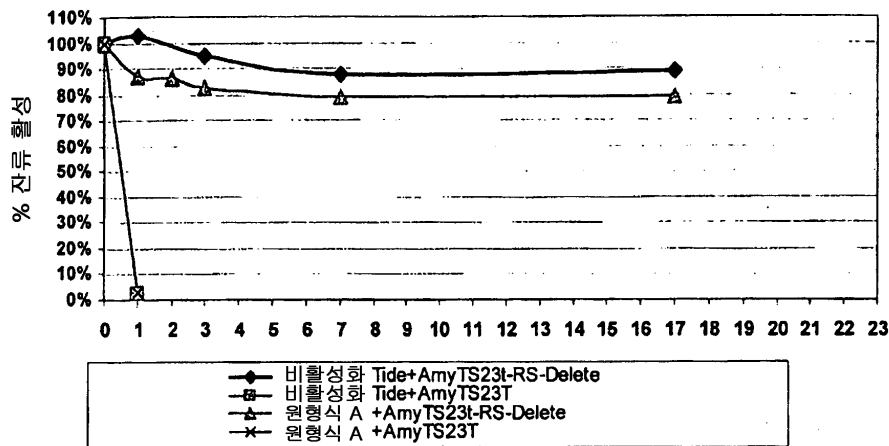
도면8



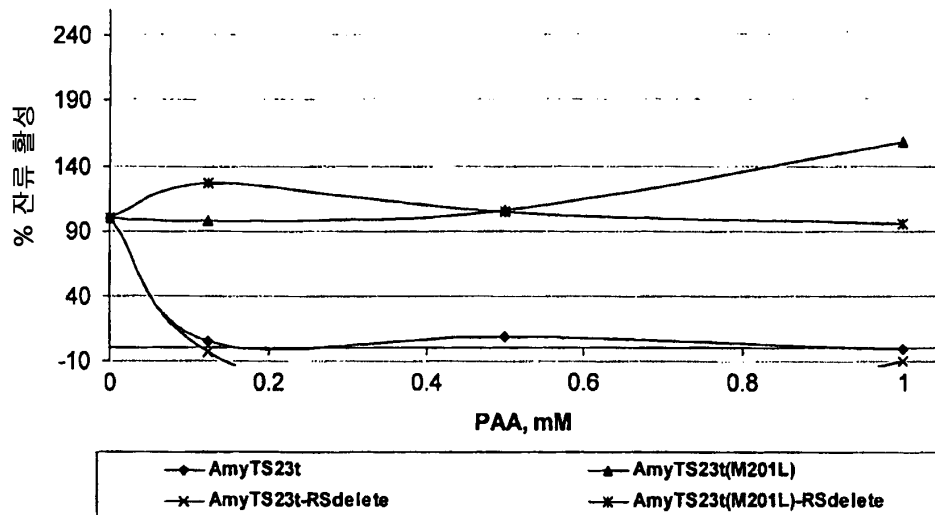
도면9



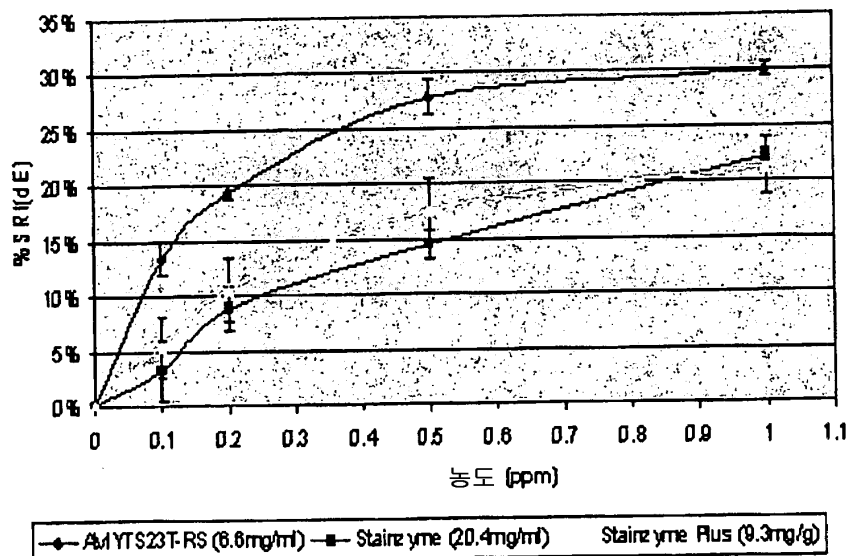
도면10



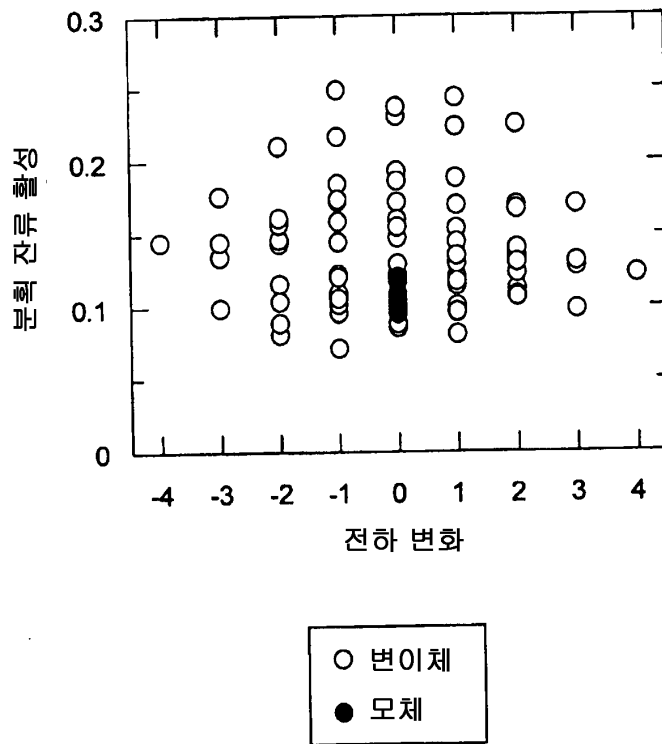
도면11



도면12



도면13



도면14

SEQ ID NO: 5

LAT 신호 펩티드를 위한 코딩 영역

ATGAAACAACAAAAACGGCTTTACGCCCCGATTGCTGACGCTGTTATTTGC
GCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTCAGCA

SEQ ID NO: 6

LAT 신호 펩티드의 아미노산 서열

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASA

SEQ ID NO: 7

프라이머 pHPLT-PstI-FW

CTCATTCTGCAGCTTCAGCAAATACGGCG

SEQ ID NO: 8

프라이머 pHPLT-HpaI-RV

CTCTGTAACTCATTTGGCGACCCAGATTGAAACG

SEQ ID NO: 9

프라이머 TS-delRS-FW

CTATAAATTTACGGGCAAAGCATGGGATTGG

SEQ ID NO: 10

프라이머 TS-delRS-RV

TGCTTTGCCCCGTAAATTTATAGATCCGGTTCAG

SEQ ID NO: 11

프라이머 TS-M201L-FW

CTATGACTATCTGCTGTTTGCCGATCTG

SEQ ID NO: 12

프라이머 TS-M201L-RV

CAGATCGGCAAACAGCAGATAGTCATAG

SEQ ID NO: 13

프라이머 TS-delRS/M201L-FW

GCATGGGATTGGGAAGTCGATACGGAAAACGGCAACTATGACTATCTGCT
GTTTGCCG

SEQ ID NO: 14

프라이머 TS-delRS/M201L-RV

CGTATCGACTTCCCAATCCCATGCTTTGCCCGTAAATTTATAGATCCGGTT
C

서열 목록

<110> Cascao-Pereira, Luis

Chang, Claudine

Choy, Clement

Estabrook, Melodie

Jones, Brian E.

Kellis, Jr., James T.

Kolkman, Marc

Leeflang, Chris

Vroemen, Casper

Weyler, Walter

<120> TS23 Alpha-Amylase Variants with Altered Properties
 <130> 31066WO
 <140> PCT/US2009/033027
 <141> 2009-02-04
 <150> US 61/026,056
 <151> 2008-02-04
 <150> US 61/059,403
 <151> 2008-06-06
 <160> 14

<170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp. TS-23
 <400> 1

Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp
 1 5 10 15
 Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Ala
 20 25 30
 Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr
 35 40 45
 Lys Gly Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala Gly
 85 90 95
 Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp
 100 105 110
 Gly Thr Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asp Pro Ser Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp

130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile
 165 170 175
 Tyr Lys Phe Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr
 180 185 190
 Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met Asp

 195 200 205
 His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Thr Trp Tyr Val
 210 215 220
 Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile
 225 230 235 240
 Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr Tyr Val Arg Asn Gln Thr
 245 250 255
 Gly Lys Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val Asn
 260 265 270

 Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe
 275 280 285
 Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Ser Gly
 290 295 300
 Tyr Phe Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln
 305 310 315 320
 Pro Ser Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly
 325 330 335
 Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr

 340 345 350
 Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly
 355 360 365
 Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys
 370 375 380
 Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln

385 390 395 400
 Arg Asp Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly
 405 410 415

 Ile Asp Thr Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly
 420 425 430
 Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly Lys
 435 440 445
 Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn
 450 455 460
 Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile
 465 470 475 480
 Trp Val Ala Lys Thr Ser Asn Val Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr

 485 490 495
 Thr Thr Ser Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Ala Asn Ile Pro Glu Leu
 500 505 510
 Gly Asn Trp Asn Thr Ala Asn Ala Ile Lys Met Asn Pro Ser Ser Tyr
 515 520 525
 Pro Thr Trp Lys Ala Thr Ile Ala Leu Pro Gln Gly Lys Ala Ile Glu
 530 535 540
 Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Gln Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Ser
 545 550 555 560

 Thr Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Phe Ser Ser Thr Gly Ser Tyr
 565 570 575
 Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580
 <210> 2
 <211> 484
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp. TS-23
 <400> 2
 Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp
 1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Ala
 20 25 30

 Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr
 35 40 45
 Lys Gly Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala Gly
 85 90 95
 Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp

 100 105 110
 Gly Thr Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asp Pro Ser Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile
 165 170 175

 Tyr Lys Phe Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr
 180 185 190
 Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met Asp
 195 200 205
 His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Thr Trp Tyr Val
 210 215 220
 Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile
 225 230 235 240
 Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr Tyr Val Arg Asn Gln Thr

 245 250 255
 Gly Lys Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val Asn

260 265 270
 Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe
 275 280 285
 Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Ser Gly
 290 295 300
 Tyr Phe Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln
 305 310 315 320

 Pro Ser Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly
 325 330 335
 Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr
 340 345 350
 Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly
 355 360 365
 Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys
 370 375 380
 Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln

 385 390 395 400
 Arg Asp Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly
 405 410 415
 Ile Asp Thr Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly
 420 425 430
 Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly Lys
 435 440 445
 Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn
 450 455 460

 Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile
 465 470 475 480
 Trp Val Ala Lys

<210> 3

<211> 1752

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic optimized AmyTS23 gene

<400> 3

aatacggcgc cgatcaacga aacgatgatg cagtattttg aatgggatct gccgaatgat	60
ggaacgctgt ggacgaaagt caaaaacgaa gcggcgaatc ttagcagcct gggaatcaca	120
gcactttggc ttccgccggc atataaagga acgagccaaa gcgatgtcgg ctatggcgtc	180
tatgatctgt atgacctggg cgaatttaac caaaaaggca cgatccggac gaaatatggc	240
acgaaaaacac agtatatcca agcgatccag gcagcaaaag cagcaggcat gcaagtctat	300
gccgacgtcg tctttaatca taaagcggga gcggatggca cagaatttgt cgatgccgtc	360
gaagttgatc cgagcaacag aaaccaagaa acgagcggca cgtatcaaat ccaagcgtgg	420
acgaaatttg attttccggg cagaggcaat acgtatagca gctttaaatg gcgctggtat	480
cattttgacg gcacggattg ggatgaaagc agaaaactga accggatcta taaatttcgg	540
agcacgggca aagcatggga ttgggaagtc gatacggaaa acggcaacta tgactatctg	600
atgtttgccg atctggatat ggatcatccg gaagtcgtca cggaactgaa aaattggggc	660
acgtggtatg ttaatacgaac gaacatcgat ggctttagac tggatgccgt caaacatatac	720
aaatatagct tttttccgga ctggctgacg tatgtcagaa accagacggg caaaaacctt	780
tttgccgtcg gcgaattttg gagctatgac gtcaacaaac ttcataacta taccacgaaa	840
acgaacggca gcatgagcct ttttgatgcc ccgcttcata acaactttta tacggcgagc	900
aaaagctcag gctattttga tatgagatat ctgctgaaca acacgtgat gaaagatcaa	960
ccgagcctgg cagtcacact ggtcgataac catgatacac aaccgggcca aagccttcaa	1020
agctgggtcg aaccgtggtt taaaccgtg gcgtatgcct ttatcctgac gagacaagaa	1080
gggtatcctt gcgtctttta tggcgactat tatggcatcc cgaaatataa tatcccgggc	1140
ctgaaaagca aaatcgatcc gctgctgac gccagacggg attatgccta tggcacacag	1200
cgggattata tcgacatca ggacatcatc ggctggacaa gagaaggcat cgatacga	1260
ccgaatagcg gactggcagc actgattaca gatggaccgg gcggaagcaa atggatgtat	1320
gtcggcaaaa aacatgccgg caaagtcttt tatgatctga cgggcaacag aagcgatacg	1380
gtcacgatca atgctgatgg ctggggagaa tttaaagtca atggcggcag cgtttcaatc	1440
tggttcgcca aaacgagcaa tgtcacgttt acggtcaaca atgccacgac aacgagcggc	1500
caaaatgtct atgtcgtcgc caatatcccg gaactgggca attggaatac ggcgaacgca	1560
atcaaaatga acccgagcag ctatccgaca tggaaagcga caatcgctct gccgcaagga	1620
aaagcgatcg aatttaaat tttcaaaaaa gaccaggcgg gcaatgttat ttgggaaagc	1680

acgagcaata gaacgtatac ggtcccgttt agcagcacag gaagctatac agcgagctgg 1740
aatgttccgt ga 1752
<210> 4
<211> 1455
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic optimized AmyTS23 gene
<400> 4
aatacggcgc cgatcaacga aacgatgatg cagtattttg aatgggatct gccgaatgat 60
ggaacgctgt ggacgaaagt caaaaacgaa gcggcgaatc ttagcagcct gggaatcaca 120
gcactttggc ttccgccggc atataaagga acgagccaaa gcgatgtcgg ctatggcgtc 180
tatgatctgt atgacctggg cgaatttaac caaaaaggca cgatccggac gaaatatggc 240
acgaaaacac agtatatcca agcgatccag gcagcaaaag cagcaggcat gcaagtctat 300
gccgacgtcg tctttaatca taaagcggga gcggatggca cagaatttgt cgatgccgtc 360

gaagttgatc cgagcaacag aaaccaagaa acgagcggca cgtatcaaat ccaagcgtgg 420
acgaaatttg attttccggg cagaggcaat acgtatagca gctttaaatg gcgctggtat 480
cattttgacg gcacggattg ggatgaaagc agaaaactga accggatcta taaatttcgg 540
agcacgggca aagcatggga ttgggaagtc gatacggaaa acggcaacta tgactatctg 600
atgtttgccg atctggatat ggatcatccg gaagtcgtca cggaactgaa aaattggggc 660
acgtggtatg ttaatacgac gaacatcgat ggcttttagac tggatgccgt caaacatatac 720
aaatatagct ttttccgga ctggctgacg tatgtcagaa accagacggg caaaaacctt 780

tttgccgtcg gcgaattttg gagctatgac gtcaacaaac ttcataacta taccacgaaa 840
acgaacggca gcatgagcct ttttgatgcc ccgcttcata acaactttta tacggcgagc 900
aaaagctcag gctattttga tatgagatat ctgctgaaca acacgtgat gaaagatcaa 960
ccgagcctgg cagtcacact ggtcgataac catgatacac aaccgggcca aagccttcaa 1020
agctgggtcg aaccgtggtt taaaccgtg gcgtatgcct ttatcctgac gagacaagaa 1080
gggtatcctt gcgtctttta tggcgactat tatggcatcc cgaaatataa tatcccgggc 1140
ctgaaaagca aaatcgatcc gctgctgac gccagacggg attatgccta tggcacacag 1200

cgggattata tcgaccatca ggacatcatc ggctggacaa gagaaggcat cgatacgaag 1260
ccgaatagcg gactggcagc actgattaca gatggaccgg gcggaagcaa atggatgtat 1320
gtcggcaaaa aacatgccgg caaagtcttt tatgatctga cgggcaacag aagcgatacg 1380

gtcacgatca atgctgatgg ctggggagaa tttaaagtca atggcggcag cgtttcaatc 1440
 tgggtcgcca aatga 1455
 <210> 5
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Bacillus lichenformis
 <400> 5
 atgaaacaac aaaaacggct ttacgccga ttgctgacgc tgttatttgc gctcatcttc 60
 ttgctgcctc attctgcagc ttcagca 87
 <210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Bacillus lichenformis
 <400> 6
 Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala
 20 25
 <210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400>
 > 7
 ctcattctgc agcttcagca aatacggcg 29
 <210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 8
 ctctgttaac tcatttggcg acccagattg aaacg 35
 <210> 9

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 9
 ctataaattt acgggcaaag catgggattg g 31
 <210> 10
 <211> 33
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 10
 tgctttgccg gtaaatttat agatccggtt cag 33
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 11
 ctatgactat ctgctgtttg ccgatctg 28
 <210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 12
 cagatcggca aacagcagat agtcatag 28
 <210> 13
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 13

gcattgggatt gggaagtcga tacggaaaac ggcaactatg actatctgct gtttgccg 58

<210> 14

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 14

cgtatcgact tccaatccc atgctttgcc cgtaaattta tagatccgt tc 52