



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0041228
(43) 공개일자 2008년05월09일

(51) Int. Cl.

C11D 3/38 (2006.01) *C11D 11/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7005090

(22) 출원일자 2008년02월29일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년02월29일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/064720

국제출원일자 2006년07월27일

(87) 국제공개번호 WO 2007/014897

국제공개일자 2007년02월08일

(30) 우선권주장

10 2005 036 586.8 2005년08월01일 독일(DE)

(71) 출원인

바스프 에스이

독일 데-67056 루트빅샤펜

(72) 발명자

뵈크, 디에테르

독일 67117 림부르게르호프 체펠린베크 3

슈벤데만, 폴커

독일 67434 네우스타르트 암 헤우셀베르크 20

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 강승욱

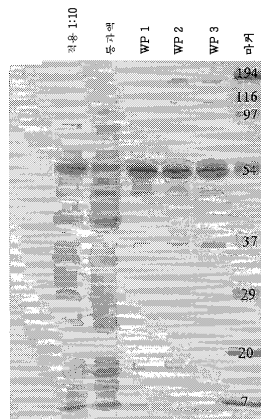
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 표면활성 비효소 단백질의 직물을 세척하기 위한 용도

(57) 요약

계면활성 비효소 단백질의 직물을 세척하기 위한 용도. 또한 계면활성 비효소 단백질을 포함하는 직물 세척용 세척 조성물 및 이러한 단백질을 이용하는 세척 방법.

대표도 - 도1



(72) 발명자

마우스, 울프

독일 69221 도센하임 임 홀가르텐 6비

몬테크, 톨스텐

독일 67373 두텐호펜 베르크하우세르스트라쎄 13

카로스, 마빈

독일 68723 슈베친겐 클레멘타인-바셰르만-스트라쎄 3

서브코브스키, 토마스

독일 68526 라텐부르크 비첸스트라쎄 13

볼슈베이레르, 클라우스

독일 69118 하이델베르크 칼-크리스트-스트라쎄 13

르마이르, 한스-게오르크

독일 67117 림부르게르호프 마인스트라쎄 10

특허청구의 범위

청구항 1

직물 세척용 계면활성 비효소 단백질의 용도.

청구항 2

제1항에 있어서, 동일한 크기의 물방울의 비코팅 유리 표면과의 접촉각에 비해, 유리 표면에 적용한 후 실온에서 물방울의 접촉각을 20° 이상 증가시키는 성질로 단백질이 특성화되는 용도.

청구항 3

제2항에 있어서, 단백질이 하이드로포빈인 용도.

청구항 4

제3항에 있어서, 단백질이 융합 하이드로포빈이고, 융합 파트너(fusion partner)는 20 내지 500개의 아미노산을 포함하는 것인 용도.

청구항 5

제3항에 있어서, 하이드로포빈은 yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20), yaad-Xa-rodA-his(서열번호 22) 또는 yaad-Xa-basf1-his(서열번호 24)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상이고, 단, 각 경우에서 yaad는 20 내지 293개의 아미노산을 갖는 절두형(truncated) yaad 융합 파트너일 수 있는 것인 용도.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질을 세척액 내 0.05 내지 50 ppm의 농도로 이용하는 것인 용도.

청구항 7

제1항 내지 제6항에 있어서, 알킬 에테르 설페이트 또는 알킬 알콕실레이트와 선형 알킬벤젠설포네이트 또는 지방 알코올 설페이트의 조합을 포함하는 음이온성 및/또는 비이온성 계면활성제와 함께 단백질을 이용하는 것인 용도.

청구항 8

1 이상의 세척 활성 물질을 포함하는 직물 세척용 세척 조성물로서, 세척 조성물이 1 이상의 계면활성 비효소 단백질을 더 포함하는 세척 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 동일한 크기의 물방울의 비코팅 유리 표면과의 접촉각에 비해, 유리 표면에 적용한 후 실온에서 물방울의 접촉각을 20° 이상 증가시키는 성질로 단백질이 특성화되는 세척 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 단백질이 하이드로포빈인 세척 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 단백질이 융합 하이드로포빈이고, 융합 파트너는 20 내지 500개의 아미노산을 포함하는 세척 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 하이드로포빈은 yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20), yaad-Xa-rodA-his(서열번호 22) 또는 yaad-Xa-basf1-his(서열번호 24)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상이고, 단, 각 경우에서 yaad는 20 내지 293개의 아미노산을 갖는 절두형 yaad 융합 파트너일 수 있는 세척 조성물.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성 비효소 단백질의 양이 세척 조성물의 모든 성분을 기준으로 0.002 내지 2.5 중량%인 세척 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

- (a) 0.01 내지 1.5 중량%의 계면활성 비효소 단백질,
- (b) 0.5 내지 40 중량%의 계면활성제, 및
- (c) 59 내지 99.45 중량%의 추가 세척 활성 첨가제 또는 배합 보조제를 포함하는 세척 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 계면활성제가 음이온성 및/또는 비이온성 계면활성제인 세척 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 계면활성제가 알킬 에테르 설페이트 또는 알킬 알콕실레이트와 선형 알킬벤젠설포네이트 또는 지방 알코올 설페이트의 조합인 세척 조성물.

청구항 17

- (a) 세척되는 식물 재료 및 수성 세척액으로 세척 기구를 채우는 단계,
- (b) 식물 재료 및 세척액의 혼합물에 기계적 에너지를 가하는 단계,
- (c) 수성 세척액을 제거하고, 선택적으로 식물 재료를 행구는 단계, 및
- (d) 식물 재료를 건조하는 단계

를 적어도 포함하는 식물 재료를 세척하는 방법으로서, 수성 세척액이 1 이상의 계면활성 비효소 단백질을 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 동일한 크기의 물방울의 비코팅 유리 표면과의 접촉각에 비해, 유리 표면에 적용한 후 실온에서 물방울의 접촉각을 20° 이상 증가시키는 성질로 단백질이 특성화되는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 단백질이 하이드로포빈인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 단백질이 융합 하이드로포빈이고, 융합 파트너는 20 내지 500개의 아미노산을 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 하이드로포빈은 yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20), yaad-Xa-rodA-his(서열번호 22) 또는 yaad-Xa-basf1-his(서열번호 24)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상이고, 단, 각 경우에서 yaad는 20 내지 293개의 아미노산을 갖는 절두형 yaad 융합 파트너일 수 있는 방법.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 알킬 에테르 설페이트 또는 알킬 알콕실레이트와 선형 알킬벤젠설포네이트 또는 지방 알코올 설페이트의 조합을 포함하는 음이온성 및/또는 비이온성 계면활성제와 함께 단백질을 이용하는 방법.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 60℃ 이하의 온도에서 세척 공정을 실시하는 방법.

청구항 24

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 5 내지 45℃의 온도에서 세척 공정을 실시하는 방법.

청구항 25

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 15 내지 35℃의 온도에서 세척 공정을 실시하는 방법.

청구항 26

제17항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질을 세척액 내 0.05 내지 50 ppm의 농도로 이용하는 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 계면활성 비효소 단백질의 직물을 세척하기 위한 용도에 관한 것이다. 또한 계면활성 비효소 단백질을 포함하는 직물 세척용 세척 조성물 및 이러한 단백질을 이용하는 세척 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 오늘날 직물 세척에서 상대적으로 높은 온도에서만 오물(soil), 특히, 소수성 얼룩의 제거를 만족스러운 정도로 성공한다. 온화한 온도 및 특히 실온에서, 세척 성능의 개선에 대한 상당한 요구가 여전히 존재한다. 종래 기술에 따르면, 특히 계면활성제 및 지방질 분해 효소를 이용하여 소수성 얼룩의 제거를 달성한다.
- <3> 세척 조성물에 대한 첨가제로서의 효소 단백질의 용도는 원칙적으로 공지되어 있다. 특히 단백질분해효소가 세척 조성물에서 이용되지만, 아밀라제, 셀룰라제 또는 리파제의 용도 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 ["Waschmittel-Enzyme"[세척 조성물 효소] in Roempp Chemie-Lexikon, Online edition, Version 2.6, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, Febr. 2005]에 더 자세한 설명이 제공되어 있다.
- <4> 세척용 보조제, 예를 들어, 고정화제, UV 차단제, 방향 물질 또는 오물 분리 보조제를 섬유에 고정하기 위해 단백질을 이용할 수 있는 것도 공지되어 있다. 이 목적을 위해 국제특허공개 제98/00500호는 셀룰라제, 셀룰라제 유도체 또는 셀룰라제 유사 단백질의 용도를 개시하고, 이 목적을 위해 국제특허공개 제01/46357호는 셀룰로스를 위한 결합 부위 및 다른 화합물을 위한 결합 부위를 갖는 융합 단백질을 개시한다.
- <5> 계면활성 단백질은 원칙적으로 공지되어 있다. 특히 강한 표면 활성을 갖는 단백질의 한 부류는 소위 "하이드로포빈"의 부류이다. 하이드로포빈은 계면에 대해 현저한 친화력을 보유하고, 따라서 표면을 코팅하는 데 적합하다. 예를 들어, 하이드로포빈으로 테플론 표면을 코팅하여 테플론을 친수성화시킬 수 있다.
- <6> 하이드로포빈은 필라멘트형 진균류, 예를 들어, 스킴조필럼 커문(*Schizophyllum commune*)의 특징인 약 100 내지 150개의 아미노산의 소형 단백질이다. 이는 일반적으로 8개의 시스테인 단위를 포함한다.
- <7> 먼저 하이드로포빈은 천연 공급원으로부터 분리할 수 있다. 그러나, 유전 공학 방법에 의해 얻을 수도 있다. 본 출원인의 이전 출원 국제출원 제EP2006/050719호는 하이드로포빈에 대한 제조 방법을 개시한다.
- <8> 종래 기술은 다양한 분야에 있어서의 하이드로포빈의 용도를 제안하였다.
- <9> 국제출원공개 제96/41882호는 소수성 표면에 친수성을 제공하기 위해, 친수성 기재의 방수성을 개선시키기 위해, 수중유 유화제 또는 유중수 유화제를 제조하기 위해 하이드로포빈을 유화제, 증점제, 표면 활성 물질로서 이용하기 위한 용도를 제안한다. 또한, 약학 분야, 예컨대, 연고 또는 크림의 제조 및 미용 분야, 예컨대, 피부 보호 또는 샴푸 또는 컨디셔너의 제조를 제안한다.
- <10> 유럽특허 제1 252 516호는 30 내지 80℃의 온도에서 하이드로포빈을 포함하는 용액으로 창문, 콘택트 렌즈, 바이오센서, 의료 장비, 분석 수행용 또는 저장용 용기 또는, 선각, 고체 입자 또는 승용차의 프레임 또는 동체를 코팅하는 방법을 개시한다.

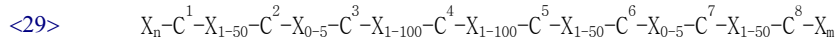
- <11> 국제공개특허 제03/53383호는 미용 분야에서 케라틴 물질을 처리하기 위한 하이드로포빈의 용도를 개시한다.
- <12> 국제공개특허 제03/10331호는 추가 물질, 예를 들어, 전기 활성 물질, 항체 또는 효소가 비공유 결합으로 결합되어 있는 하이드로포빈 코팅 센서, 예를 들어, 측정용 전극을 개시한다.
- <13> 세척 조성물에 대한 오물 분리 첨가제로서의 계면활성 비효소 단백질, 특히, 하이드로포빈의 용도는 현재까지 기술되어 있지 않다.

발명의 상세한 설명

- <14> 본 발명의 목적은 개선된 세척 조성물 및 개선된 직물을 세척하기 위한 방법을 제공하는 것이었다. 저온에서 세척하는 경우 개선된 세척 성능을 특히 주목하여야 한다.
- <15> 따라서, 직물 세척용 계면활성 비효소 단백질의 용도를 발견하였다.
- <16> 본 발명의 두 번째 측면에서, 계면활성 비효소 단백질을 포함하는 세척 조성물을 발견하였다.
- <17> 본 발명의 세 번째 측면에서, 계면활성 비효소 단백질을 포함하는 세척액으로 세척하는 방법을 발견하였다. 방법의 특히 바람직한 구체예에서, 60℃ 이하의 온도에서 세척을 수행한다.
- <18> 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 각각의 경우 계면활성 비효소 단백질은 하이드로포빈이다.
- <19> 놀랍게도, 세척액에 계면활성 비효소 단백질을 첨가하는 것이 현저히 향상된 세척 작용을 초래한다는 것이 밝혀졌다. 특히 놀라운 것은 이 효과가 낮은 세척 온도에서도 발견되고, 심지어 극히 소량의 단백질을 이용하는 경우에서도 발견된다는 것이었다. 예를 들어, 단지 25℃의 세척 온도에서 종래의 세척 조성물과 조합된 세척액 내 단백질이 대략 2.5 ppm의 농도로만 존재하는 경우에도, 최대 8%의 세척 작용의 향상이 관찰된다.
- <20> 오물 분리 작용의 향상 외에도, 착색된 유성 얼룩의 경우 회색화(graying) 억제 작용도 관찰된다. 세척의 과정에서 직물로부터 분리될 수 있는 소수성 얼룩은 미분된 형태로 세탁물에 다시 침착될 수 있고, 따라서 회색화 또는 변색을 유도한다. 이의 속성에 의해, 이 효과는 백색 또는 연한 색(pale-colored) 직물에서 특히 두드러진다. 이 문제는 특히 계면활성제 및 빌더(builder) 시스템이 저 투여량으로 존재하는 경우에 발생한다. 본 발명에 있어 계면활성 비효소 단백질의 첨가는 이 재침착을 감소시키고, 이러한 단백질의 첨가 없이 세척된 직물과 비교할 때 세척된 직물의 백색도를 개선시킨다.
- <21> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <22> 본 발명을 수행하기 위해, 계면활성 비효소 단백질을 이용한다. 용어 "비효소"는 단백질이 바람직하게는 효소 작용을 갖지 않거나 또는 적어도 현저하지 않은 효소 작용을 갖는다는 사실을 의미하고자 하는 것이다.
- <23> 용어 "계면활성"은 이용되는 단백질이 계면의 성질에 영향을 미치는 능력을 갖는다는 사실을 의미하고자 하는 것이다. 본 계면은 고체-고체, 고체-액체, 고체-기체, 액체-액체 또는 액체-기체 계면일 수 있다. 특히, 이는 고체-액체 또는 액체-액체 계면일 수 있다.
- <24> 고체-액체 계면의 경우, 성질은 예를 들어, 고체 표면의 친수성도 또는 소수성도일 수 있고, 이는 이용되는 단백질의 영향 하에서 변화한다. 친수성도 또는 소수성도의 변화는 코팅 및 비코팅 표면과 물방울의 접촉각을 측정함으로써 공지된 방식으로 측정할 수 있다. 추가 계면 성질은 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 액체의 표면 장력의 변화이다.
- <25> 본 발명을 수행하기 위해, 저 농도에서도 계면활성인 단백질을 이용하는 것이 바람직하다. 특히 0.05 내지 50 ppm의 농도에서도 상당한 계면활성 성질을 가지는 것이 적합한 단백질이다.
- <26> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 동일한 크기의 물방울의 비코팅 유리 표면과의 접촉각에 비해, 유리 표면에 적용한 후 실온에서 물방울(5 μ l)의 접촉각을 20° 이상 증가시키는 성질을 특징으로 하는 단백질을 이용한다. 접촉각을 바람직하게는 25° 이상 증가시키는, 더 바람직하게는 30° 이상 증가시키는 단백질을 이용한다. 접촉각 측정을 수행하는 방법은 원칙적으로 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 접촉각을 측정하기 위한 예로서 적합한 방법에 대한 정확한 실험 조건은 실험 부분에서 상세하게 기술한다.
- <27> 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 이용되는 단백질은 하이드로포빈이다.
- <28> 본 발명의 내용에서, 용어 "하이드로포빈"은 일반 구조식 (I)의 폴리펩타이드를 의미하는 것으로 이해되어야 한

다:

화학식 I



<30> 식 중, X는 20개의 천연 아미노산(Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile, Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) 중 어느 하나일 수 있다. 식에서, 각각의 X 라디칼은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. X 다음에 표시된 지수는 각각의 특별한 부분서열 X 내 아미노산의 수이고, C는 시스테인, 알라닌, 세린, 글리신, 메티오닌 또는 트레오닌이고, 여기서, C로 표시되는 잔기 중 4개 이상이 시스테인이고, 지수 n 및 m은 각각 독립적으로 0 내지 500, 바람직하게는 15 내지 300의 자연수이다.

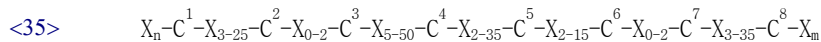
<31> 화학식 (I)의 폴리펩타이드는 또한 동일한 크기의 물방울의 비코팅 유리 표면과의 접촉각에 비해, 유리 표면에 적용한 후 실온에서 물방울의 접촉각을 20° 이상, 바람직하게는 25° 이상, 더 바람직하게는 30° 이상 증가시키는 성질에 의해 특성화된다.

<32> C¹ 내지 C⁸로 표시되는 아미노산은 시스테인이 바람직하지만, 이들은 또한 유사하게 공간을 채우는 다른 아미노산, 바람직하게는 알라닌, 세린, 트레오닌, 메티오닌 또는 글리신으로 치환될 수 있다. 그러나, C¹ 내지 C⁸의 위치 중 4개 이상, 바람직하게는 5개 이상, 더 바람직하게는 6개 이상, 특히 7개 이상이 시스테인으로 이루어져야 한다. 본 발명의 단백질에서, 시스테인은 환원형으로 존재할 수 있거나 또는 서로 다이설파이드 결합을 형성할 수 있다. 특히 1개 이상의 분자 내 다이설파이드 결합, 바람직하게는 2개, 더 바람직하게는 3개, 가장 바람직하게는 4개의 분자 내 다이설파이드 결합을 포함하는, C-C 결합의 분자 내 형성이 특히 바람직하다. 전술한 바와 같이 시스테인이 유사한 부피를 갖는 아미노산으로 치환되는 경우, 이러한 C 위치는 서로 분자 내 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 쌍으로 치환되는 것이 유리하다.

<33> 시스테인, 세린, 알라닌, 글리신, 메티오닌 또는 트레오닌 또한 X로 표시되는 위치에서 이용되는 경우, 일반식에 있어서 개별 C 위치의 넘버링은 그에 상응하도록 변경될 수 있다.

<34> 본 발명을 수행하기 위해 일반식 (II)의 하이드로포빈을 이용하는 것이 바람직하다:

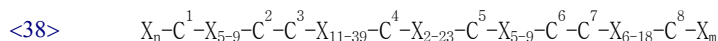
화학식 II



<36> 식 중, X, C 및 X와 C 다음에 표시된 지수는 각각 상기 정의된 바와 같고, 지수 n 및 m은 각각 0 내지 350, 바람직하게는 15 내지 300의 수이고, 상기 단백질은 전술한 접촉각의 변화를 추가 특징으로 하고, 더 나아가, C로 표시되는 잔기 중 6개 이상은 시스테인이다. C 잔기 전부가 시스테인인 것이 더 바람직하다.

<37> 일반식 (III)의 하이드로포빈을 이용하는 것이 특히 바람직하다:

화학식 III



<39> 식 중, X, C 및 X 다음에 표시된 지수는 각각 상기 정의한 바와 같고, 지수 n 및 m은 각각 0 내지 200의 수이고, 상기 단백질은 전술한 접촉각의 변화를 추가 특징으로 하고, C로 표시되는 잔기 중 6개 이상은 시스테인이다. C 잔기 전부가 시스테인인 것이 더 바람직하다.

<40> X_n 및 X_m 잔기는 하이드로포빈에 자연적으로 연결되는 펩타이드 서열일 수 있다. 그러나, 잔기 중 하나 또는 전부는 하이드로포빈에 자연적으로 연결되지 않는 펩타이드 서열일 수도 있다. 이는 또한 하이드로포빈에서 자연적으로 존재하는 펩타이드 서열이 하이드로포빈에서 자연적으로 존재하지 않는 펩타이드 서열에 의해 연장되어 있는 X_n 및/또는 X_m 잔기를 의미하는 것으로 이해된다.

<41> X_n 및/또는 X_m이 하이드로포빈에 자연적으로 결합되지 않은 펩타이드 서열인 경우, 이러한 서열의 길이는 일반적으로 20개 이상, 바람직하게는 35개 이상, 더 바람직하게는 50개 이상이고, 예를 들어, 100개 이상의 아미노산이다. 예를 들어, 서열은 20 내지 500개, 바람직하게는 30 내지 400개, 더 바람직하게는 35 내지 100개 아미노

산의 서열일 수 있다. 또한 하이드로포빈에 자연적으로 결합되지 않은 잔기는 이하 융합 파트너로서 지칭될 것이다. 이는 속성상 이러한 형태 내에 함께 존재하지 않는 1 이상의 하이드로포빈 모이어티 및 1개의 융합 파트너 모이어티로 단백질이 이루어질 수 있다는 사실을 표현하기 위한 것이다.

- <42> 융합 파트너 모이어티는 다수의 단백질로부터 선택될 수 있다. 또한 하나의 융합 파트너만을 하이드로포빈 모이어티에 연결시킬 수 있거나, 또는 복수의 융합 파트너를 하나의 하이드로포빈 모이어티, 예를 들어, 하이드로포빈 모이어티의 아미노 말단(X_n) 및 카복실 말단(X_m)에 연결시킬 수 있다. 그러나, 예를 들어, 2개의 융합 파트너를 본 발명의 단백질의 하나의 위치(X_n 또는 X_m)에 결합시킬 수도 있다.
- <43> 특히 적합한 융합 파트너는 미생물, 특히, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에 자연적으로 존재하는 단백질이다. 이러한 융합 파트너의 예는 서열 yaad(서열번호 15 및 16), yaae(서열번호 17 및 18), 티오레독신이다. 언급한 서열의 단지 일부분, 예를 들어, 70 내지 99%, 바람직하게는 5 내지 50%, 더 바람직하게는 10 내지 40%(이 경우 퍼센트는 아미노산의 수를 기준으로 함)를 포함하거나, 또는 언급한 서열과 비교하여 개별 아미노산 또는 뉴클레오티드가 변경된, 서열의 단편 또는 유도체 역시 매우 적합하다.
- <44> 더 바람직한 구체예에서, X_n 또는 X_m 기로서 또는 이러한 기의 말단 구성요소로서 언급된 융합 파트너뿐만 아니라 융합 하이드로포빈은 또한 소위 친화성 도메인(affinity domain)(친화력 태그/친화력 꼬리)을 갖는다. 원칙적으로 공지된 방식에서, 이는 특정한 상보성 기와 상호작용할 수 있고, 단백질의 더 용이한 워크업 및 정제를 위해 제공될 수 있는 앵커(anchor) 기를 포함한다. 이러한 친화성 도메인의 예는 (His)_k, (Arg)_k, (Asp)_k, (Phe)_k 또는 (Cys)_k 기(식 중, k는 일반적으로 1 내지 10의 자연수임)를 포함한다. 이는 바람직하게는 (His)_k 기(식 중, k는 4 내지 6임)일 수 있다. 이 경우에서, X_n 및/또는 X_m 기는 이러한 친화성 도메인만으로 이루어질 수 있거나 또는 하이드로포빈에 자연적으로 결합되거나 또는 자연적으로 결합되지 않는 X_n 또는 X_m 라디칼은 말단 친화성 도메인에 의해 연장된다.
- <45> 하이드로포빈 또는 이의 유도체로서 본 발명에 따라 이용되는 단백질은 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화 또는 화학적 가교 결합, 예를 들어, 글루타르알데하이드에 의한 화학적 가교 결합에 의해 이의 폴리펩타이드 서열이 변형될 수도 있다.
- <46> 본 발명에 따라 이용되는 하이드로포빈 또는 이의 유도체의 성질 중 하나는 표면을 이 단백질로 코팅하는 경우 표면 성질이 변화된다는 것이다. 표면 성질의 변화는 예를 들어, 단백질로 표면을 코팅하기 전과 후의 물방울의 접촉각을 측정하고, 두 측정값 간의 차를 결정하여 실험적으로 정의할 수 있다.
- <47> 접촉각 측정을 수행하는 방법은 원칙적으로 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 실온 및 물방울 5 μl 및 기재로서 유리판의 이용을 기준으로 측정한다. 접촉각을 측정하기 위해 적합한 방법의 예에 대한 정확한 실험 조건은 실험 부분에서 주어진다. 그 부분에서 언급된 조건 하에, 본 발명에 따라 이용되는 융합 단백질은 동일한 크기의 물방울의 비코팅 유리 표면과의 접촉각에 비해, 접촉각을 20° 이상, 바람직하게는 25° 이상, 더 바람직하게는 30° 이상만큼 증가시키는 성질을 갖는다.
- <48> 본 발명을 수행하기 위해 특히 바람직한 하이드로포빈은 dewA, rodA, hypA, hypB, sc3, basf1, basf2 유형의 하이드로포빈이고, 하기 서열 목록에서 구조적으로 특성화된다. 이는 단지 이의 일부분 또는 유도체일 수도 있다. 또한 동일하거나 또는 상이한 구조의 복수, 바람직하게는 2개 또는 3개의 하이드로포빈 모이어티를 서로 결합하는 것도 가능하고, 그리고 속성상 하이드로포빈에 결합되지 않는 적합한 해당 폴리펩타이드 서열에 결합하는 것도 가능하다.
- <49> 또한 본 발명에 따라 특히 적합한 것은 괄호에 제시된 폴리펩타이드 서열을 갖는 yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20), yaad-Xa-rodA-his(서열번호 22) 또는 yaad-Xa-basf1-his(서열번호 24) 및 이를 코딩하는 핵산 서열, 특히 서열번호 19, 21, 23에 따른 서열의 융합 단백질이고; yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20)를 이용하는 것이 더 바람직하다. 서열번호 20, 22 또는 24에 제시된 폴리펩타이드 서열로부터 출발하여, 전체 아미노산 중 1개 이상, 최대 10개, 바람직하게는 5개, 더 바람직하게는 5%가 치환, 삽입 또는 결실되어 있으나 여전히 출발 단백질의 생물학적 성질의 50% 이상의 정도를 갖는 단백질이 특히 바람직한 구체예이다. 본 명세서에서 단백질의 생물학적 성질은 전술하였던 접촉각의 변화가 20° 이상인 것을 의미하는 것으로 이해된다.
- <50> 본 발명을 수행하는 데 특히 적합한 유도체는 yaad 융합 파트너를 절두함으로써 yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20), yaad-Xa-rodA-his(서열번호 22) 또는 yaad-Xa-basf1-his(서열번호 24)로부터 유도된 잔기이다. 294개의

아미노산을 갖는 완전한 yaad 융합 파트너(서열번호 16) 대신에, 절두형 yaad 잔기를 이용하는 것이 유리할 수 있다. 하지만 절두형 잔기는 20개 이상, 더 바람직하게는 35개 이상의 아미노산을 포함하여야 한다. 예를 들어, 20 내지 293개, 바람직하게는 25 내지 250개, 더 바람직하게는 35 내지 150개, 그리고 예를 들어, 35 내지 100 개의 아미노산을 갖는 절두형 라디칼을 이용할 수 있다. 이러한 단백질의 하나의 예는 40개 아미노산으로 절두된 yaad 잔기를 갖는 yaad40-Xa-dewA-his(서열번호 26)이다.

- <51> 하이드로포빈과 융합 파트너 사이 또는 융합 파트너들 사이의 분절 부위(예를 들어, 메티오닌에서 BrCN 분절, 인자 Xa 분절, 엔테로키나제 분절, 트롬빈 분절, TEV 분절 등)를 이용하여 비유도체 형태의 순수 하이드로포빈을 방출할 수 있다.
- <52> 하나의 융합 파트너, 예를 들어, yaad 또는 yaae 및 심지어 상이한 서열의 복수의 하이드로포빈, 예를 들어, DewA-RodA 또는 Sc3-DewA, Sc3-RodA로부터 연속적으로 융합 단백질을 생성하는 것도 가능하다. 그와 동시에 최대 70% 상동성을 갖는 하이드로포빈 단편(예를 들어, N- 또는 C-말단 절두물) 또는 류테인을 이용하는 것 또한 가능하다. 각 경우에서 최적의 구성체는 특정 용도와 관련하여(즉, 액상이 분리되어야 하는 경우) 선택된다.
- <53> 식물 세척에 이용되는 본 발명에 따라 이용되는 하이드로포빈은 펩타이드 합성의 공지된 방법, 예를 들어, 메리필드 고상 합성법으로 화학적으로 제조될 수 있다.
- <54> 천연 하이드로포빈은 적절한 방법을 이용하여 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Woeten et. al., Eur. J Cell Bio. 63, 122-129 (1994)] 또는 국제공개특허 제96/41882호를 참조한다.
- <55> 타라로미세스 써모필루스(*Talaromyces thermophilus*)로부터 융합 파트너 없는 하이드로포빈을 생산하는 유전 공학 방법은 미국 특허 제2006/0040349호에 기재되어 있다.
- <56> 바람직하게는 융합 단백질은 융합 파트너를 코딩하는 1개의 핵산 서열, 특히 DNA 서열과 하이드로포빈 모이어티를 코딩하는 1개의 핵산 서열을 조합하여, 조합된 핵산 서열의 유전자 발현의 결과로서 숙주 미생물 내에 원하는 단백질이 생성되도록 하는 유전 공학 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 제조 방법은 예를 들어, 국제출원 제EP2006/050719호에 개시되어 있다.
- <57> 언급한 제조 방법에 적합한 생산 유기체(production organism)는 원핵생물(고세균 포함) 또는 진핵생물, 특히 호염성 박테리아 및 메탄생성균(methanococcia)을 포함하는 박테리아, 진균류, 곤충 세포, 식물 세포 및 포유류 세포일 수 있고, 이들 중 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 니들란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas spec.*), 락토바실러스(*Lactobacilli*), 한세누라 폴리모र्फ(*Hansenula Polymorpha*), 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*), SF9(또는 관련 세포)가 더 바람직하다.
- <58> 본 발명은 조절 핵산 서열의 유전적 제어 하에, 본 발명에 따라 이용되는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 구성체와, 또한 1 이상의 이 발현 구성체를 포함하는 벡터의 용도를 제공한다.
- <59> 이용되는 구성체는 특정 코딩 서열로부터의 5'쪽 상류의 프로모터 및 3'쪽 하류의 터미네이터 서열 및 경우에 따라 각각 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 관용적인 추가 조절 요소를 포함하는 것이 바람직하다.
- <60> 본 발명의 내용에서, "작동 가능한 연결"은 각각의 조절 요소가 코딩 서열의 발현에서 의도하는 기능을 충족할 수 있도록, 프로모터, 코딩 서열, 터미네이터 및 경우에 따라 추가 조절 요소가 연속적으로 배열되어 있는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- <61> 작동 가능하게 연결할 수 있는 서열의 예는 표적화 서열과, 또한 인핸서, 폴리아데닐화 신호 등이다. 추가 조절 요소는 선별 마커, 증폭 신호, 복제 기점 등을 포함한다. 적절한 조절 서열은 예를 들어, 문헌 [Goeddel, Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기재되어 있다.
- <62> 이 조절 서열 외에도, 실제적 구조 유전자의 상류에 이 서열의 천연 조절 요소가 여전히 존재할 수 있고, 경우에 따라 천연 조절 요소가 차단되어 유전자 발현이 증대될 수 있도록 유전적으로 변형되어 있을 수 있다.
- <63> 바람직한 핵산 구성체는 또한 프로모터에 기능적으로 연결되어 있고, 핵산 서열의 발현을 증가시킬 수 있는 1 이상의 소위 "인핸서" 서열을 포함하는 것이 유리하다. 또한 추가적인 유리한 서열, 예컨대, 추가 조절 요소 또는 터미네이터가 DNA 서열의 3' 말단에 삽입되는 것이 가능하다.

- <64> 핵산은 1 이상의 사본(copy)으로 구성체 내에 존재할 수 있다. 경우에 따라 구성체에 대한 선별을 위해, 추가 마커, 예컨대 항생제 내성 또는 영양 요구성 보완 유전자가 구성체 내에 존재하는 것도 가능하다.
- <65> 제조에 유리한 조절 서열은 예를 들어, cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq-T7, T5, T3, gal, trc, ara, rhaP(rhaPBAD) SP6, 람다-PR 또는 임람다-P 프로모터와 같은 프로모터에 존재하고, 이는 그램 음성 박테리아에서 유용한 용도가 발견된다. 추가 유용한 조절 서열은 예를 들어, 그램 양성 프로모터 amy 및 SP02, 및 효모 또는 진균류 프로모터 ADC1, MF알파, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH에 존재한다.
- <66> 조절을 위해 합성 프로모터를 이용하는 것도 가능하다.
- <67> 숙주 유기체에서의 발현을 위해, 숙주에서 최적의 유전자 발현을 가능케 하는 벡터, 예를 들어, 플라스미드 또는 파지 내로 핵산 구성체를 삽입하는 것이 유리하다. 벡터는 플라스미드 및 파지 외에도, 또한 통상의 기술자에게 공지되어 있는 다른 모든 벡터, 예를 들어, 바이러스, 예컨대, SV40, CMV, 배콜로바이러스 및 아데노바이러스, 트랜스포존, IS 엘리먼트, 파지미드, 코스미드, 및 선형 또는 원형 DNA, 또한 아그로박테리아 시스템을 의미하는 것으로 이해된다.
- <68> 이 벡터는 숙주 유기체에서 자발적으로 또는 염색체를 통해 복제될 수 있다. 적합한 플라스미드는 예를 들어, 이.콜라이(*E. coli*)용 pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III"3-B1, tgt11 또는 pBdCI, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)용 pIJ101, pIJ364, pIJ702 또는 pIJ361, 바실러스(*Bacillus*)용 pUB110, pC194 또는 pBD214, 코리네박테리아(*Corynebacterium*)용 pSA77 또는 pAJ667, 진균류용 pALS1, pIL2 또는 pBB116, 효모용 2알파, pAG-1, YEp6, YEp13 또는 pEMBLyE23 또는 식물용 pLGV23, pGHIac+, pBIN19, pAK2004 또는 pDH51이다. 언급된 플라스미드는 이용가능한 플라스미드의 소규모 선별부로 구성된다. 추가 플라스미드는 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 문헌 [Cloning Vectors(Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018)]에서 찾아볼 수 있다.
- <69> 존재하는 추가 유전자를 발현시키기 위해, 핵산 구성체는 발현을 향상시키기 위한 3'- 및/또는 5'-말단 조절 서열을 추가적으로 포함하는 것이 유리하고, 이는 선택되는 숙주 유기체 및 유전자 또는 유전자들에 따라 최적의 발현을 위해 선택된다.
- <70> 이 조절 서열은 유전자 및 단백질의 발현을 제어할 수 있게 하는 것으로 의도한다. 숙주 유기체에 따라, 이는 예를 들어, 유전자가 도입 후에만 발현되거나 또는 과발현되거나, 또는 즉시 발현 및/또는 과발현되는 것을 의미할 수 있다.
- <71> 조절 서열 또는 인자는 바람직하게는 긍정적으로 영향을 미칠 수 있고, 따라서 도입된 유전자의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, 조절 요소의 증폭은 프로모터 및/또는 인헨서와 같은 강한 전사 신호를 이용함으로써 전사 수준에서 유리하게 이루어질 수 있다. 또한, 예를 들어, mRNA의 안정성을 개선하여 전사를 향상시키는 것도 가능하다.
- <72> 벡터의 추가 구체예에서, 핵산 구성체 또는 핵산을 포함하는 벡터는 유리하게는 선형 DNA의 형태로 미생물에 도입될 수 있고, 이중성 또는 상동성 재조합에 의해 숙주 유기체의 게놈 내로 통합될 수 있다. 이 선형 DNA는 선형화된 벡터, 예컨대, 플라스미드로 이루어질 수 있거나, 또는 핵산 구성체 또는 핵산으로만 이루어질 수 있다.
- <73> 유기체에서 이중성 유전자를 최적으로 발현시키기 위해, 유기체에서 이용되는 특정한 "코돈 이용 방식(codon usage)"에 따라 핵산 서열을 변경시키는 것이 유리하다. "코돈 이용 방식"은 해당 유기체의 다른 공지된 유전자의 컴퓨터 분석을 참고하여 용이하게 결정할 수 있다.
- <74> 적절한 코딩 뉴클레오티드 서열 및 터미네이터 신호 또는 폴리아데닐화 신호와 적합한 프로모터를 융합하여 발현 카세트 제조한다. 이를 위해, 예를 들어, 문헌 [T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)] 및 문헌 [T. J. Silhavy, M. L. Berman and L. W. Enquist, Experiments with Gene fusion, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)] 및 문헌 [Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987)]에 기재된 바와 같은 통상적인 재조합 및 클로닝 기술을 이용한다.
- <75> 적절한 숙주 유기체에서의 발현을 위해, 숙주에서 유전자를 최적으로 발현시킬 수 있는 숙주 특이적 벡터 내로 재조합 핵산 구성체 또는 유전자 구성체를 삽입하는 것이 유리하다. 벡터는 통상의 기술자에게 널리 공지되어

있고, 예를 들어, 문헌 ["Cloning Vectors"(Pouwels P. H. et al., eds., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985)]로부터 선택될 수 있다.

<76> 벡터를 이용하여, 예를 들어, 1 이상의 벡터로 형질전환되고, 본 발명에 따라 이용되는 하이드로포빈 또는 이의 유도체의 생산에 이용될 수 있는 재조합 미생물을 제조하는 것이 가능하다. 전술한 재조합 구성체를 적절한 숙주 시스템에 도입하고, 발현시키는 것이 유리하다. 특정한 발현 시스템에서 언급한 핵산이 발현되도록 하기 위해, 통상의 기술자에게 친숙한 클로닝 및 형질감염법, 예를 들어, 공침전법, 원형질 융합법, 전기천공법, 레트로바이러스 형질감염법 등을 이용하는 것이 바람직하다. 적절한 시스템은 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., ed., Wiley Interscience, New York 1997], 또는 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에서 기재되어 있다.

<77> 상동성 재조합 미생물을 제조하는 것도 가능하다. 이를 위해, 이용되는 유전자의 적어도 일부분 또는 서열을 변형시키기 위해, 예를 들어, 기능을 파괴하기 위해, 경우에 따라 1 이상의 아미노산 결실, 추가 또는 치환이 도입된 코딩 서열을 포함하는 벡터를 제조한다("넉아웃(knockout)" 벡터). 도입된 서열은 예를 들어, 관련 미생물 유래의 상동체이거나 또는 포유류, 효모 또는 곤충 기원에서 유래한 것일 수 있다. 대안적으로 상동성 재조합에 이용되는 벡터는, 상동성 재조합의 경우, 내생 유전자가 돌연변이되거나 또는 다른 방법으로 변경되었지만 여전히 기능성 단백질을 코딩하도록 설정될 수 있다(예를 들어, 내인성 단백질의 발현이 변화되도록 상류 조절 영역이 변경될 수 있다). 본 발명에 따라 이용되는 유전자의 변경 구역은 상동성 재조합 벡터 내이다. 상동성 재조합에 적합한 벡터의 구성은 예를 들어, 문헌 [Thomas, K. R. 및 Capecchi, M. R. (1987) Cell 51: 503]에 기재되어 있다.

<78> 원칙적으로, 모든 원핵 또는 진핵 유기체가 이러한 핵산 또는 이러한 핵산 구성체에 대한 재조합 숙주 유기체로서 유용하다. 이용되는 숙주 유기체는 박테리아, 진균류 또는 효모와 같은 미생물이 유리하다. 그람 양성 또는 그람 음성 박테리아를 이용하는 것이 유리하고, 장내세균(*Enterobacteriaceae*) 과, 슈도모나스(*Pseudomonadaceae*) 과, 리조비아(*Rhizobiaceae*) 과, 스트렙토마이세스(*Streptomycetaceae*) 과 또는 노카디아(*Nocardiaceae*) 과의 박테리아가 바람직하고, 에스케리키아(*Escherichia*) 속, 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속, 노카디아(*Nocardia*) 속, 부르크홀더리아(*Burkholderia*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 아그로박테리아(*agrobacterium*) 속 또는 로도코쿠스(*Rhodococcus*) 속의 박테리아가 더 바람직하다.

<79> 방금 기술한 융합 단백질의 제조 방법에서 이용되는 유기체는 숙주 유기체에 따라 통상의 기술자에게 공지된 방식으로 성장 또는 배양된다. 미생물은 일반적으로 보통 당의 형태인 탄소원, 보통 유기 질소원 형태인 질소원, 예컨대, 효모 추출물 또는 염(예컨대, 황산 암모늄염, 철염, 망간염 및 마그네슘염과 같은 미량의 원소의 염) 및 경우에 따라 비타민을 포함하는 액상 배지에서 0 내지 100℃, 바람직하게는 10 내지 60℃의 온도에서 산소를 공급하면서 성장된다. 영양 배지액의 pH는 고정값으로 유지할 수 있으며, 즉, 성장 도중에 조절하거나 또는 조절하지 않는다. 성장은 회분식, 반회분식 또는 연속식으로 실시할 수 있다. 영양분은 발효의 초반부에서 공급하거나 또는 반연속식 또는 연속식으로 보충할 수 있다. 효소는 실시예에 기재된 방법으로 유기체로부터 분리하거나 또는 미정제 추출물로서 반응에 이용될 수 있다.

<80> 본 발명에 따라 이용되는 하이드로포빈, 또는 이의 기능적, 생물학적 활성 단편은 폴리펩타이드 생산 미생물을 배양하고, 경우에 따라 단백질의 발현을 유도하고, 배양액으로부터 분리하는 재조합 제조 방법에 의해 제조될 수 있다. 단백질은 필요에 따라 이 방법으로 산업적 규모로 생산될 수도 있다. 재조합 미생물을 공지된 방법으로 배양하고 발효시킬 수 있다. 박테리아는 예를 들어, TB 또는 LB 배지에서 20 내지 40℃의 온도 및 6 내지 9의 pH에서 증식시킬 수 있다. 적절한 배양 조건은 예를 들어, 문헌 [T. Maniatis, E. F. Fritsch 및 J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)]에 구체적으로 기재되어 있다.

<81> 융합 파트너는 하이드로포빈의 제조를 상당히 용이하게 한다. 융합 하이드로포빈은 융합 파트너가 없는 하이드로포빈보다 현저하게 더 나은 수율로 생산된다.

<82> 단백질이 배양 배지로 분비되지 않는다면, 세포는 파괴되고, 생성물은 공지된 단백질 분리 방법으로 용해물로부터 얻는다. 경우에 따라, 세포는 고주파 초음파, 프렌치 압력 셀과 같은 고압, 삼투압 분해, 세제, 용해제 효소 또는 유기 용매의 작용, 균질화기 또는 열거한 방법의 복수의 조합으로 파괴될 수 있다.

- <83> 분자체 크로마토그래피(겔 여과), 예컨대, Q 세파로즈 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피와 같은 공지된 크로마토그래피 방법으로, 또한 한외여과, 결정화, 염석, 투석 및 네이티브(native) 겔 전기영동과 같은 관용적인 다른 방법으로 단백질을 정제할 수 있다. 적절한 방법은 예를 들어, 문헌 [Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden[생화학 기술], Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York], 또는 문헌 [Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin]에 기재되어 있다.
- <84> 고체 지지체, 특히 적합한 중합체 상에서 해당 상보성 기에 결합될 수 있는 특이적 앵커 기를 이에 제공하여 융합 하이드로포빈의 분리 및 정제를 용이하게 하는 것이 특히 유리할 수 있다. 예를 들어, 이러한 고체 지지체는 크로마토그래피 컬럼의 충전물로서 이용될 수 있고, 일반적으로 이 방식으로 분리의 효율이 현저하게 증가될 수 있다. 이러한 분리 방법 또한 친화 크로마토그래피로서 공지되어 있다. 앵커 기의 혼입을 위해, 단백질의 제조 시 cDNA를 특정한 뉴클레오티드 서열만큼 연장하여 변경된 단백질 또는 융합 단백질을 코팅하는 벡터 시스템 또는 올리고뉴클레오티드를 이용하는 것도 가능하다. 용이한 정제를 위해, 변경된 단백질은 앵커로서 기능하는 소위 "태그"를 포함하고, 예를 들어, 헥사-히스타딘 앵커로서 공지된 변성물이다. 히스타딘 앵커로 변성된 융합 하이드로포빈은 예를 들어, 컬럼 충전물로서 니켈-세파로즈를 이용하는 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. 후속적으로 융합 하이드로포빈은 용액으로 적합한 제제, 예를 들어, 이미다졸 용액을 이용하여 컬럼으로부터 다시 용출시킬 수 있다.
- <85> 간소화 정제 방법에서는 크로마토그래피 정제를 생략하는 것이 가능하다. 이를 위해, 먼저 적합한 방법, 예를 들어, 정밀여과 또는 원심분리에 의해 세포를 발효 배양액으로부터 제거한다. 후속적으로, 적합한 방법, 예를 들어, 이미 전술한 방법에 의해 세포를 파괴할 수 있고, 세포 잔해를 봉입체로부터 분리할 수 있다. 유리하게는 원심분리에 의해 후자를 실시할 수 있다. 최종적으로, 융합 하이드로포빈을 배출하기 위해 원칙적으로 공지된 방식으로 봉입체를 파괴할 수 있다. 이는 예를 들어, 산, 염기 및/또는 세제에 의해 실시될 수 있다. 본 발명에 따라 이용되는 융합 하이드로포빈을 갖는 봉입체는 대략 1시간 이내에 심지어 0.1 M NaOH를 이용하여 완전하게 용해시킬 수 있다. 이 간소화 정제 방법에 의해 얻은 융합 하이드로포빈의 순도는 모든 단백질의 양을 기준으로 일반적으로 60 내지 80 중량%이다.
- <86> 기술한 간소화 정제 방법에 의해 얻은 용액을 이용하여 추가 정제 없이 이 발명을 수행할 수 있다. 그러나, 융합 하이드로포빈은 또한 용액으로부터 고체로서 분리될 수 있다. 예를 들어, 이는 동결 건조 또는 분무 건조에 의한 원칙적으로 공지된 방식으로 실시될 수 있다.
- <87> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 분리는 분무 건조에 의해 실시될 수 있다. 분무 건조는 크로마토그래피 정제된 용액을 이용하여 수행될 수 있지만, 바람직하게는 봉입체 제조에 의한 간소화 정제 방법 후 얻은 용액을 이용하는 것이 가능하다.
- <88> 분무 건조를 수행하기 위해, 경우에 따라 용액을 증화시킬 수 있다. 7 내지 9 범위의 pH가 특히 유리한 것으로 밝혀졌다.
- <89> 일반적으로 출발 용액을 약간 농축시키는 것을 추천한다. 출발 용액에서 유용한 고체 농도는 최대 30 중량%로 밝혀졌다. > 5%의 고체 함량은 일반적으로 미세한 생성물 분말을 유도한다. 후속적으로, 용액은 원칙적으로 공지된 방식으로 분무 건조될 수 있다. 분무 건조에 적합한 장치는 상업적으로 입수 가능하다. 최적의 분무 건조 조건은 유닛 유형 및 원하는 작업 처리량에 따라 변화한다. 130 내지 180℃의 입력 온도 및 50 내지 80℃의 출력 온도가 하이드로포빈 용액에 선호되는 것으로 밝혀졌다. 선택적으로, 분무 건조를 위해 보조제, 예를 들어, 당, 만니톨, 텍스트란 또는 말토텍스트린을 이용하는 것이 가능하다. 유용한 양은 하이드로포빈을 기준으로 이러한 보조제 0 내지 30 중량%, 바람직하게는 5 내지 20 중량%인 것으로 밝혀졌다.
- <90> 기술한 바와 같이 제조되는 하이드로포빈은 융합 단백질로서 바로 이용될 수 있거나, 또는 융합 파트너를 분리 및 제거한 후 "순수한" 하이드로포빈으로서 이용될 수 있다.
- <91> 융합 파트너를 제거하고자 하는 경우, 하이드로포빈 모이어티와 융합 파트너 모이어티 사이의 융합 단백질 내로 잠재적인 분절 부위(단백질분해효소에 대한 특이적 인식 부위)를 혼입시키는 것을 추천한다. 적합한 분절 부위는 특히 생물정보학적 도구를 이용하여 용이하게 결정할 수 있는, 하이드로포빈 모이어티에도 또는 융합 파트너 모이어티에도 존재하지 않는 펩타이드 서열이다. 특히 적합한 예는 메티오닌에서의 BrCN 분절, 또는 인자 Xa 분절, 엔테로키나제 분절, 트롬빈 분절 또는 TEV 분절(담배 식각 바이러스 단백질분해효소)을 이용하는 단백질분해효소-매개 분절이다.

- <92> 식물 세척을 위한 본 발명의 용도를 위해, 먼저 계면활성 비효소 단백질을 세척 조성물의 성분으로서 이용하고, 세척액에 이 형태로 첨가할 수 있다. 그러나, 개별적으로 계면활성 비효소 단백질을 세척액에 첨가하는 것도 가능하고, 계면활성 비효소 단백질이 없는 세척 조성물을 이용하는 것 또한 가능하다. 개별적인 첨가는 고체 형태로, 용액으로서 또는 적합한 배합물로서 단백질을 첨가함으로써 실시될 수 있다. 또한 2개의 첨가 방법이 조합될 수 있음을 이해할 것이다.
- <93> 세척액 내 계면활성 비효소 단백질의 양은 목적하는 효과에 따라 통상의 기술자에 의해 결정된다. 유용한 양은 일반적으로 0.05 내지 50 ppm, 바람직하게는 0.1 내지 30 ppm, 더 바람직하게는 0.2 내지 20 ppm, 훨씬 더 바람직하게는 0.5 내지 10 ppm, 예를 들어, 1 내지 6 ppm인 것으로 밝혀졌다.
- <94> 본 발명의 세척 조성물은 1 이상의 세척 활성 물질 및 1 이상의 계면활성 비효소 단백질을 포함한다.
- <95> 1 이상의 계면활성 비효소 단백질은 초반에서 언급한 접촉각의 변화를 초래하는 단백질이 바람직하고, 1 이상의 하이드로포빈이 더 바람직하다. 상이한 단백질의 혼합물을 이용하는 것 또한 가능성을 이해할 것이다.
- <96> 하이드로포빈을 이용하는 경우, "순수한" 하이드로포빈으로서 또는 전술한 융합 단백질의 형태로 이용할 수 있다. 본 발명을 수행하는 데 유용한 예는 yaad-Xa-dewA-his 유형(서열번호 20), yaad-Xa-rodA-his 유형(서열번호 22) 또는 yaad-Xa-basf1-his 유형(서열번호 24)의 융합 단백질인 것으로 밝혀졌다. 특히 유용한 예는 완전한 yaad 융합 파트너 또는 절두형 융합 파트너를 갖는 yaad-Xa-dewA-his(서열번호 20), 예를 들어, yaad40-Xa-dewA-his(서열번호 26)인 것으로 밝혀졌다.
- <97> 용어 "식물 세척용 세척 조성물"은 내재적이지만 동시에 한정적이기도 하다. 식물을 세척하기 위한 세척 조성물은 예를 들어, 분말, 과립, 펠렛, 페이스트, 정, 겔의 형태, 또는 액체, 일반적으로 수용액(세척액)으로 이용된다. 이의 작용은 화학적 및 물리화학적 방법의 상대적으로 복잡한 상호작용으로 이루어진다. 세척 조성물은 1 이상의 세척 활성 물질을 포함하지만, 최적의 세척 결과를 제공하도록 상호작용하는 일반적으로 복수의 상이한 세척 활성 물질을 포함한다. 세척 조성물의 중요한 세척 활성 성분은 특히 계면활성제, 또한 빌더, 코빌더, 표백제 시스템 및 세척 조성물 효소이다. 추가적으로 세척 조성물의 성분으로서 전형적인 첨가제, 예를 들어, 방향제, 부식 억제제, 염료 이동 억제제, 소포제 또는 광택제를 이용하는 것이 가능하다.
- <98> 계면활성제는 음이온성, 비이온성, 양이온성 또는 양쪽성 계면활성제일 수 있다.
- <99> 적합한 비이온성 계면활성제는 특히 다음과 같다:
- <100> - 알콕실화 C₈-C₂₂-알코올, 예컨대, 지방 알코올 알콕실레이트, 옥소 알코올 알콕실레이트 및 게르베(Guerbet) 알코올 에톡실레이트: 알콕실화는 에틸렌 옥사이드, 프로필렌 옥사이드 및/또는 부틸렌 옥사이드로 실시될 수 있다. 블록 공중합체 또는 랜덤 공중합체가 존재할 수 있다. 알코올 몰당, 이는 전형적으로 2 내지 50 몰, 바람직하게는 3 내지 20 몰의 1 이상의 알킬렌 옥사이드를 포함한다. 바람직한 알킬렌 옥사이드는 에틸렌 옥사이드이다. 알코올은 10 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 것이 바람직하다.
- <101> - C₆-C₁₄-알킬 설페 및 몰당 5 내지 30 몰의 알킬렌 옥사이드를 포함하는 알킬페놀 알콕실레이트, 특히, 알킬페놀 에톡실레이트.
- <102> - C₈-C₂₂-, 바람직하게는 C₁₀-C₁₈-알킬 설페 및 일반적으로 1 내지 20개, 바람직하게는 1.1 내지 5개의 글루코사이드 단위를 포함하는 알킬 폴리글루코사이드.
- <103> - N-알킬글루카마이드, 지방산 아마이드 알콕실레이트, 지방산 알칸올아마이드 알콕실레이트, 및 에틸렌 옥사이드, 프로필렌 옥사이드 및/또는 부틸렌 옥사이드의 블록 공중합체.
- <104> 적합한 음이온성 계면활성제는 예를 들어, 다음과 같다:
- <105> - 8 내지 22개, 바람직하게는 10 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 (지방) 알코올의 설페이트, 특히 C₉-C₁₁-알코올 설페이트, C₁₂-C₁₄-알코올 설페이트, C₁₂-C₁₈-알코올 설페이트, 라우릴 설페이트, 세틸 설페이트, 미리스틸 설페이트, 팔미틸 설페이트, 스테아릴 설페이트 및 수지(tallow) 지방 알코올 설페이트.
- <106> - 설페이트화 알콕실레이트화 C₈-C₂₂-알코올(알킬 에테르 설페이트): 이 유형의 화합물은 예를 들어, C₈-C₂₂-, 바람직하게는 C₁₀-C₁₈-알코올, 예를 들어, 지방 알코올을 먼저 알콕실화하고, 알콕실화 생성물을 설페이트화함으로써 제조한다. 알콕실화를 위해, 에틸렌 옥사이드를 이용하는 것이 바람직하다.

<107> - 선형 C₈-C₂₀-알킬벤젠설포네이트(LAS), 바람직하게는 선형 C₉-C₁₃-알킬벤젠설포네이트 및 C₉-C₁₃-알킬톨루엔설포네이트.

<108> - 알칸설포네이트, 특히 C₈-C₂₄-, 바람직하게는 C₁₀-C₁₈-알칸설포네이트.

<109> - 비누, 예컨대, C₈-C₂₄-카복실산의 나트륨염 및 칼륨염.

<110> 음이온성 계면활성제는 바람직하게는 염의 형태로 세척 조성물에 첨가된다. 적합한 염은 예를 들어, 알칼리 금속염, 예컨대, 나트륨염, 칼륨염 및 리튬염, 및 암모늄염, 예컨대, 하이드록시에틸암모늄염, 다이(하이드록시에틸)암모늄염 및 트라이(하이드록시에틸)암모늄염이다.

<111> 적합한 양이온성 계면활성제는 다음과 같다:

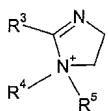
<112> - C₇-C₂₅-알킬아민;

<113> - N,N-다이메틸-N-(C₂-C₄-하이드록시알킬) (C₇-C₂₅-알킬)암모늄염;

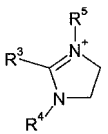
<114> - 알킬화제로 4차화된 모노- 및 다이(C₇-C₂₅-알킬)다이메틸암모늄 화합물;

<115> - 에스테르 쿼트(quat), 특히 C₈-C₂₂-카복실산과 에스테르화된 4차 에스테르화 모노-, 다이- 및 트라이알칸올아민;

<116> - 이미다졸린 쿼트, 특히 화학식 II 또는 III의 1-알킬이미다졸리늄 염



II



III

<119> 식 중, 변수는 하기와 같이 정의된다:

<120> R³은 C₁-C₂₅-알킬 또는 C₂-C₂₅-알케닐이고;

<121> R⁴는 C₁-C₄-알킬 또는 하이드록시-C₁-C₄-알킬이고;

<122> R⁵는 C₁-C₄-알킬, 하이드록시-C₁-C₄-알킬 또는 R¹-(CO)-X-(CH₂)_m- 라디칼(X: -O- 또는 -NH-; m: 2 또는 3)이고,

<123> 여기서 적어도 하나의 R³ 라디칼은 C₇-C₂₂-알킬이다.

<124> 적합한 양쪽성 계면활성제는 예를 들어, 알킬 베타인, 알킬아미도 베타인, 아미노프로피오네이트, 아미노글리시네이트 및 양쪽성 이미다졸륨 화합물이다.

<125> 세척 공정에서, 빌더(이중성 무기 빌더로서도 공지됨, HIB)는 물을 연화시키도록 작용한다. 이는 이의 알칼리성과, 오물 및 섬유 연결부에서 칼슘 이온 및 마그네슘 이온을 걸러내는 성질에 의하여 세척 작용을 지원하고, 세척액 내 색소를 분비하는 오물의 분산을 촉진시킨다.

<126> 적합한 무기 빌더는 특히 다음과 같다:

<127> - 이온 교환 성질을 갖는 결정질 및 무정질 알루미늄실리케이트, 특히 제올라이트: 다양한 유형의 제올라이트가 적합하고, 특히 Na 형태 또는 Na이 Li, K, Ca, Mg 또는 암모늄과 같은 다른 양이온으로 부분적으로 치환된 형태의 제올라이트 A, X, B, P, MAP 및 HS이다.

- <128> - 결정질 실리케이트, 특히 다이실리케이트 및 시트 실리케이트, 예를 들어 δ - 및 β - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$. 실리케이트는 이의 알칼리 금속염, 알칼리 토금속염 또는 암모늄염의 형태로 이용될 수 있고, 나트륨, 리튬 및 마그네슘 실리케이트가 바람직하다.
- <129> - 무정질 실리케이트, 예컨대, 나트륨 메타실리케이트 및 무정질 다이실리케이트.
- <130> - 카보네이트 및 수소카보네이트: 이는 이의 알칼리 금속염, 알칼리 토금속염 또는 암모늄염의 형태로 이용될 수 있다. 나트륨, 리튬 및 마그네슘 카보네이트 및 수소카보네이트, 특히 나트륨 카보네이트 및/또는 나트륨 수소카보네이트가 바람직하다.
- <131> - 폴리포스페이트, 예컨대, 펜타나트륨 트라이포스페이트.
- <132> 코빌더는 예를 들어, 일종의 저장기로서 빌더보다 더 빠르게 칼슘 또는 마그네슘 이온을 흡수하고, 빌더에 이를 통과시킴으로써 빌더와 시너지 작용한다. 또한, 이는 결정 시드(crystal seed)에 의해 이의 성장을 방지할 수 있다.
- <133> 적합한 유기 코빌더는 특히 다음과 같다:
- <134> - 저 분자량 카복실산, 예컨대, 시트르산, 소수성으로 변성된 시트르산, 예를 들어, 아가르산, 말산, 타르타르산, 글루콘산, 글루타르산, 숙신산, 이미도다이숙신산, 옥시다이숙신산, 프로판트라이카복실산, 부탄테트라카복실산, 사이클로펜탄테트라카복실산, 알킬- 및 알케닐숙신산 및 아미노폴리카복실산, 예를 들어, 나이트릴로트라이아세트산, β -알라닌다이아세트산, 에틸렌다이아민테트라아세트산, 세린다이아세트산, 아이소세린다이아세트산, N-(2-하이드록시에틸)이미노아세트산, 에틸렌다이아민다이숙신산 및 메틸- 및 에틸글리신다이아세트산.
- <135> - 올리고머 및 중합체 카복실산, 예컨대, 아크릴산 및 아스파르트산의 단독중합체, 올리고말레산, 말레산과 아크릴산, 메타크릴산 또는 C_2 - C_{22} -올레핀, 예를 들어, 아이소부텐 또는 장쇄 α -올레핀, 비닐 C_1 - C_8 -알킬 에테르, 비닐 아세테이트, 비닐 프로피오네이트, C_1 - C_8 -알코올의 (메트)아크릴 에스테르 및 스티렌과의 공중합체. 아크릴산의 단독중합체 및 말레산과 아크릴산의 공중합체가 바람직하다. 올리고머 및 중합체 카복실산은 산 형태로 또는 나트륨염으로서 이용된다.
- <136> 적합한 표백제는 예를 들어, 무기 염에 대한 수소 퍼옥사이드의 부가물, 예컨대, 나트륨 퍼보레이트 모노하이드레이트, 나트륨 퍼보레이트 테트라하이드레이트 및 나트륨 카보네이트 퍼하이드레이트, 및 퍼카복실산, 예컨대, 프탈이미도퍼카프로산이다.
- <137> 적합한 표백제 활성체는 예를 들어, N,N,N',N'-테트라아세틸에틸렌다이아민(TAED), 나트륨 p-노난오일옥시벤젠 설포네이트 및 N-메틸모폴리니오아세토나이트릴 메틸설페이트이다.
- <138> 세척 조성물에서 바람직하게 이용되는 효소는 단백질분해효소, 리파제, 아밀라제, 셀룰라제, 산화효소 및 과산화효소이다.
- <139> 적합한 염료 이동 억제제는 1-비닐피롤리돈, 1-비닐이미다졸, 4-비닐피리딘 N-옥사이드의 단독중합체, 공중합체 및 그래프트 중합체, 또는 클로로아세트산과 반응한 4-비닐피리딘의 단독중합체 및 공중합체이다.
- <140> 이용되는 성분의 유형 및 양은 세척 조성물의 목적하는 최종 용도에 따라 통상의 기술자에 의해 결정된다. 예를 들어, 표백제는 경질(light-duty) 세척 조성물이 아니라 중질(heavy-duty) 세척 조성물에서 전형적으로 이용된다. 세척 조성물의 조성 및 세척 조성물의 성분은 예를 들어, 문헌 ["Waschmittel"[세척 조성물] in Roeppe Chemie-Lexikon, Online edition, Version 2.6, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, Febr. 2005], 또는 문헌 ["Detergents" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th Edt., 2000, Electronic Release, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, 2000]에서 더 자세하게 알 수 있다.
- <141> 본 발명을 수행하는 데 바람직한 계면활성제는 음이온성 계면활성제 및/또는 비이온성 계면활성제이다.
- <142> 본 발명에 따라 이용되는 계면활성 비효소 단백질, 특히 하이드로포빈은 알킬 에테르 설페이트 또는 알킬 알콕실레이트와 선형 알킬벤젠설포네이트 또는 지방 알코올 설페이트를 조합하여 이용하는 것이 특히 유리할 수 있다.
- <143> 특히 유리하게는 C_8 - C_{18} -알코올 및/또는 이의 알콕실화 생성물을 기반으로 하는 음이온성 및/또는 비이온성 계면활성제, 선택적으로 추가 계면활성제와의 혼합물로 이용하는 것이 가능하다. 알콕시 라디칼은 본질적으로 에틸

렌 옥사이드 단위 및/또는 프로필렌 옥사이드 단위, 바람직하게는 에틸렌 옥사이드 단위를 포함하는 것이 바람직하다. 이는 예를 들어, 1 내지 25개, 바람직하게는 3 내지 20개, 더 바람직하게는 5 내지 15개의 에틸렌 옥사이드 단위의 라디칼, 또는 에틸렌 옥사이드 및 프로필렌 옥사이드 단위를 포함하는 라디칼일 수 있고, 이 경우, 후자는 각 경우에서 모든 알콕시 단위의 총 수를 기준으로 50 몰% 이상, 바람직하게는 60 몰%의 에틸렌 옥사이드 단위를 포함하여야 한다.

- <144> 바람직한 계면활성제의 예는 알콕실화 C_8-C_{18} -알코올, 에컨대, 지방 알코올 알콕실레이트, 옥소 알코올 알콕실레이트, 게르베 알코올 알콕실레이트, C_8-C_{18} -알코올의 설페이트, 설페이트화 알콕실화 C_8-C_{18} -알코올(알킬 에테르 설페이트) 또는 선형 C_8-C_{18} -알킬벤젠설포네이트(LAS), 바람직하게는 선형 C_9-C_{13} -알킬벤젠설포네이트 및 C_9-C_{13} -알킬톨루엔설포네이트를 포함한다.
- <145> 2-프로필헵탄올 및 트라이데칸올의 알콕실화 생성물 및 이의 설페이트가 특히 바람직하다.
- <146> 세척 조성물 내 계면활성 비효소 단백질의 양은 세척 조성물의 원하는 성질에 따라 통상의 기술자에 의해 판단된다. 이 내용에서, 지시에 따라 세척 조성물을 투여하는 경우, 전술한 농도의 계면활성 비효소 단백질이 얻어지도록 양을 선택하는 것이 유리하다.
- <147> 세척 조성물의 모든 성분의 총량을 기준으로 0.002 내지 2.5 중량%의 계면활성 비효소 단백질이 유용한 양으로 밝혀졌다. 그 양은 바람직하게는 0.01 내지 1.5 중량%, 더 바람직하게는 0.025 내지 1.0 중량%, 훨씬 더 바람직하게는 0.05 내지 0.5 중량%이고, 예를 들어, 0.1 내지 0.3 중량%이다.
- <148> 바람직한 구체예에서, 본 발명의 세척 조성물은
- <149> 0.01 내지 1.5 중량%의 계면활성 비효소 단백질,
- <150> 0.5 내지 40 중량%의 계면활성제, 바람직하게는 음이온성 및/또는 비이온성 계면활성제,
- <151> 59 내지 99.45 중량%의 추가 세척 활성 첨가제 또는 배합 보조제
- <152> 를 포함한다.
- <153> 이용되는 성분 (c)은 바람직하게는 리파제 및/또는 양친성 중합체, 예를 들어, 에틸렌 옥사이드-프로필렌 옥사이드 블록 공중합체일 수 있다.
- <154> 본 발명의 세척 조성물은 원칙적으로 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 세척 조성물의 생산 방법에 대한 자세한 설명은 예를 들어, 상기 인용된 문헌 ["Roempp Chemie-Lexikon" 또는 "Ullmann's"]에서 제공된다.
- <155> 계면활성 비효소 단백질을 이용하여 세척 조성물을 용액으로서 또는 고체로서 생산할 수 있다. 고체 단백질은 통상의 기술자에게 공지된 방법, 예를 들어, 분무 건조 또는 동결 건조에 의해 단백질의 용액으로부터 시작하여 얻을 수 있다.
- <156> 세척 조성물의 생산에서, 계면활성 비효소 단백질에 대한 온도 응력(thermal stress)은 너무 높지 않도록 보장되어야 한다. 물론 그 한계는 단백질의 유형에 의해 제시된다. 하이드로포빈을 이용하는 경우, 120℃의 생성 온도를 초과하지 않는 것이 유용한 것으로 밝혀졌다. 생성 온도가 임계 기준을 초과하지 않는다면 공정 온도, 즉, 예를 들어, 분무 건조기 내 기체 스트림의 온도가 더 높게 제공될 수 있다.
- <157> 세척 조성물 내로 성분의 온화한 혼입을 위한 기술은 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 가루 세척 조성물은 예를 들어, 제1 단계에서, 분무 건조에 의해 세척 조성물의 열적으로 안정한 성분의 수성 슬러리로부터 미정제 생성물을 생성하고, 제2 단계에서 이 미정제 생성물을 열적으로 민감한 성분과 온화한 조건 하에서 혼합함으로써 생성될 수 있다. 본 발명을 이에 제한하고자 하는 어떠한 의도 없이, 일반적으로 이 제2 단계에서 본 발명에 따라 이용되는 계면활성 비효소 단백질을 도입하는 것을 추천한다.
- <158> 식물 재료를 세척하기 위한 본 발명에 따른 공정은 1 이상의 다음 단계를 포함한다:
- <159> 세척되는 식물 재료 및 수성 세척액으로 세척 기구를 채우는 단계,
- <160> 식물 재료 및 세척액의 혼합물에 기계적 에너지를 가하는 단계,
- <161> 수성 세척액을 제거하고, 선택적으로 식물 재료를 행구는 단계, 및

- <162> 식물 재료를 건조하는 단계.
- <163> 이용되는 세척 기구는 임의의 유형의 세척기일 수 있다. 그러나, 이 용어는 또는 손 세척, 예를 들어, 세탁조 또는 세면기에서 전형적으로 이용되는 용기를 포함하여야 한다. 단계 (a)에서, 세척 기구는 먼저 식물 및 수성 세척액으로 채워지고, 순서는 중요하지 않다.
- <164> 세척액은 원칙적으로 공지된 방식으로 1 이상의 세척 활성 물질을 포함한다. 본 발명에 따르면, 수성 세척액은 1 이상의 계면활성 비효소 단백질을 더 포함한다. 바람직한 단백질은 이미 언급하였다. 계면활성 비효소 단백질의 첨가는 세척 조성물을 통해 수행될 수 있거나, 또는 개별적으로 실시될 수 있다. 세척 주기의 초반부에서 실시되는 것이 바람직하나, 물론 더 늦은 시간에서도 수행될 수도 있다.
- <165> 방법 단계 (b)에서 세척 공정은 식물 재료 및 세척액의 혼합물에 기계적 에너지를 가함으로써 공지된 방식으로 촉진된다. 기계적 에너지는 예를 들어, 회전 드럼에 의해 세척 기계에 도입될 수 있거나, 또는 손세척의 경우에는 손 및/또는 다른 보조에 의해 세척 기계에 도입될 수 있다.
- <166> 세척 공정의 과정에서 온도는 환경에 따라 통상의 기술자에 의해 선택된다. 예를 들어, 온도는 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100℃일 수 있다. 본 발명의 특정한 장점은 온화한 또는 낮은 온도에서 세척하는 경우에 매우 특히 증명된다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 세척 공정은 60℃ 이하, 특히 50℃ 이하의 온도에서 수행된다. 본 발명에 따른 세척 방법을 수행하는 데 특히 유리한 온도 범위는 5 내지 45℃, 매우 특히 바람직하게는 15 내지 35℃, 예를 들어, 20 내지 30℃이다.
- <167> 세척 공정의 과정에서 계면활성 비효소 단백질의 농도는 통상의 기술자에 의해 선택된다. 바람직한 농도 범위는 위에서 이미 언급하였다.
- <168> 본 발명의 세척 조성물을 통해 첨가가 이루어지는 경우, 이는 각 경우에서 세척액을 기준으로 전형적으로 0.05 내지 25 g/l, 바람직하게는 0.25 내지 15 g/l, 더 바람직하게는 0.5 내지 10 g/l, 훨씬 더 바람직하게는 1 내지 6 g/l, 그리고 예를 들어, 1.5 내지 4 g/l의 양으로 이용된다.
- <169> 실제 세척 공정 후, 세척액은 원칙적으로 공지된 방식으로 제거된다. 일반적으로 식물 재료는 후속적으로 1 이상의 행균 공정에 의해 행귀지고, 최종적으로 건조된다(방법 단계 (d) 및 (e)). 행균 과정에서, 섬유 유연제를 첨가제로서 이용할 수 있다.
- <170> 본 발명에 따른 방법은 모든 유형의 식물 재료를 세정하는 데 적합하다. 이는 식물 섬유, 반가공 및 가공 식물 섬유 및 이로부터 생산된 가공 의류일 수 있다. 이는 의류 상업용 식물 또는 가정용 식물, 예를 들어, 카펫, 커튼, 테이블보 및 공예 목적용 식물 구조체이다. 이는 또한 비성형 구조, 예를 들어, 양털, 선형 구조, 예컨대, 트와인, 울실(thread), 양, 라인, 스트링, 레이스, 니트, 코디지, 및 또한 3차원 구조체, 예를 들어, 펠트, 직포, 부직포 및 안감을 포함한다. 식물 재료는 천연 재료, 예를 들어, 면, 양모 또는 아마로 이루어질 수 있거나 또는 합성 재료, 예컨대, 폴리아크릴로나이트릴, 폴리아마이드 또는 폴리에스테르로 이루어질 수 있다. 이는 또한 혼성 식물, 예를 들어, 면/폴리에스테르 또는 면/폴리아마이드일 수 있음을 이해할 것이다.
- <171> 하기 실시예를 통해 본 발명을 더 예시하고자 한다.

실시예

- <172> 파트 A:
- <173> 본 발명에 따라 이용되는 하이드로포빈의 제조 및 테스트
- <174> 실시예 1
- <175> yaaD-His₆ /yaaE-His₆의 클로닝을 위한 제조
- <176> 올리고뉴클레오타이드 Hal570 및 Hal571(Hal 572/Hal 573)를 이용하여 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하였다. 이용되는 주형 DNA는 박테리아 바실러스 서브틸리스의 게놈 DNA였다. 얻어지는 PCR 단편은 바실러스 서브틸리스 yaaD/yaaE 유전자의 코딩 서열, 및 각각의 경우 각 말단에 위치한 NcoI 및 BgIII 제한 분절 부위를 포함하였다. PCR 단편을 정제하였고, 제한 엔도뉴클레아제 NcoI 및 BgIII로 절단하였다. 이 DNA 단편을 삽입체로서 이용하였고, 제한 엔도뉴클레아제 NcoI 및 BgIII로 사전에 선형화된 Qiagen으로부터의 벡터 pQE60로 클로닝하였다. 이렇게 형성된 벡터 pQE60YAAD#2/pQE60YaaE#5를 YAAD::HIS₆ 또는 YAAE::HIS₆로 이루어지는 단백질을 발현시키는

데 이용할 수 있다.

<177> Hal570: gcgcgcccattggctcaaacaggtactga

<178> Hal571: gcagatctccagccgcgttcttgcatac

<179> Hal572: ggccatgggattaacaataggtgtactagg

<180> Hal573: gcagatcttacaagtgccttttgccttatattcc

<181> 실시예 2

<182> yaad 하이드로포빈 DewA-His₆의 클로닝

<183> 올리고뉴클레오타이드 KaM 416 및 KaM 417을 이용하여 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하였다. 이용되는 주형 DNA는 사상균 아스퍼질러스 니둘란스의 게놈 DNA였다. 얻어지는 PCR 단편은 하이드로포빈 유전자 dewA의 코딩 서열 및 N-말단의 인자 Xa 프로테이나제 분절 부위를 포함하였다. PCR 단편을 정제하였고, 제한 엔도뉴클레아제 BamHI로 절단하였다. 이 DNA 단편을 삽입체로서 이용하였고, 제한 엔도뉴클레아제 BgIII로 사전에 선형화된 벡터 pQE60YAAD#2으로 클로닝하였다.

<184> 이렇게 형성된 벡터 #508을 YAAD::Xa::dewA::His₆로 이루어지는 융합 단백질을 발현시키는 데 이용할 수 있다.

<185> KaM416: GCAGCCCATCAGGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGC

<186> KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

<187> 실시예 3

<188> yaad 하이드로포빈 RodA-His₆의 클로닝

<189> 올리고뉴클레오타이드 KaM 434 및 KaM 435를 이용하여 플라스미드 #513를 플라스미드 #508과 유사하게 클로닝하였다.

<190> KaM434: GCTAAGCGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCATTGCTGC

<191> KaM435: CCAATGGGGATCCGAGGATGGAGCCAAGGG

<192> 실시예 4

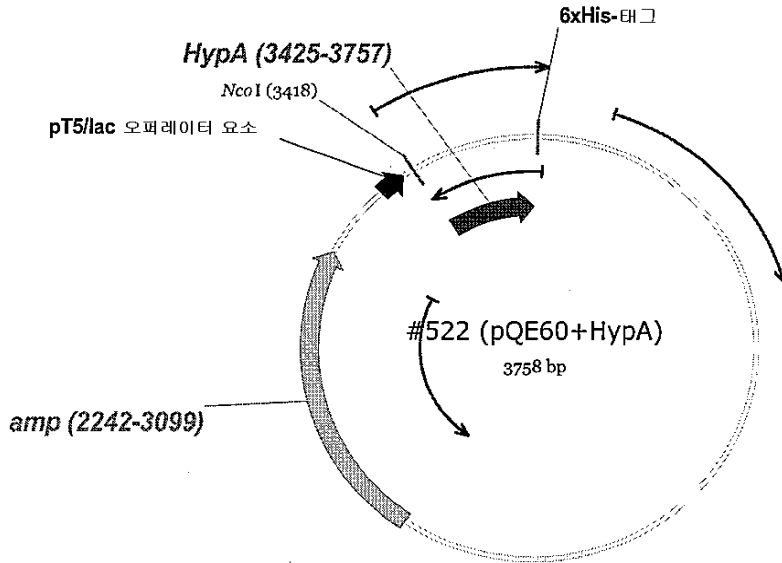
<193> yaad 하이드로포빈 HypA-His₆의 클로닝

<194> pQE60(#522)에서 HypA의 클로닝

<195> 올리고뉴클레오타이드 KaM449/KaM450를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이용되는 주형 DNA는 Nadicom에 의해 생산된 pCR2.1 내 플라스미드 HypA이었다. 얻어지는 단편은 시작 및 정지 코돈이 없는 하이드로포빈 HypA 유전자의 코딩 서열을 포함하였다. PCR 단편을 겔 전기영동으로 정제하였고, 제한 엔도뉴클레아제 NcoI 및 BamHI로 절단하였다. 이 단편을 삽입체로서 이용하였고, NcoI 및 BgIII로 사전에 절단된 벡터 pQE60으로 결찰시켰다.

<196> KaM449: GTTACCCCATGGCGATCTCTCGCGTCTTGTGCGT

<197> KaM450: GCCTGAGGATCCGAGGTTGACATTGACAGGAGAGC



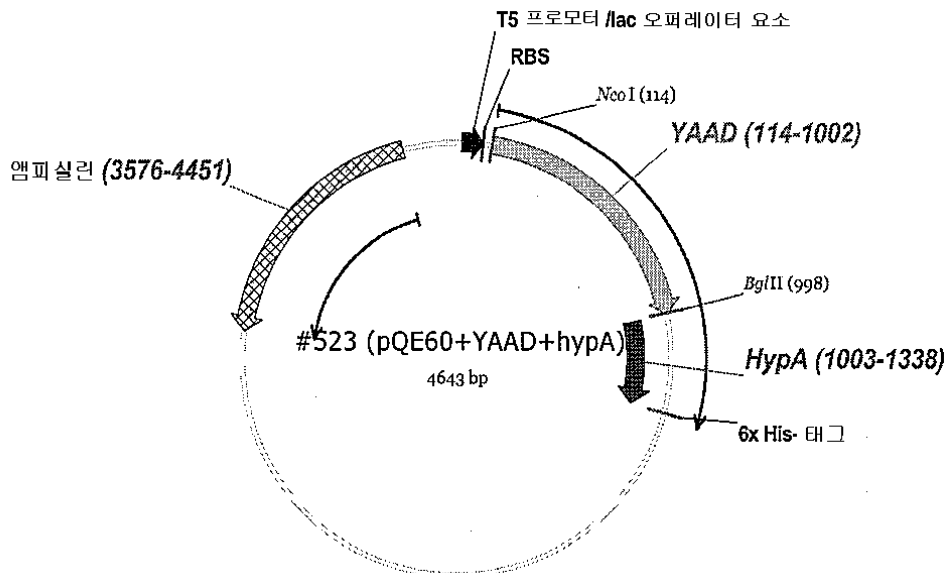
<198>

<199> pQE60+YAAD (#523)에서 HypA의 클로닝

<200> 올리고뉴클레오타이드 KaM451/KaM452를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이용되는 주형 DNA는 Nadicom에 의해 생산된 pCR2.1 내 플라스미드 HypA였다. 얻어지는 단편은 시작 및 정지 코돈 없는 하이드로포빈 HypA 유전자의 코딩 서열을 포함하였다. PCR 단편을 겔 전기영동으로 정제하였고, 제한 엔도뉴클레아제 BgIII 및 BamHI로 절단하였다. 이 단편을 삽입체로서 이용하였고, BgIII로 사전에 절단된 벡터 pQE60+YAAD로 결찰시켰다.

<201> KaM451: CGTAGTAGATCTATGATCTCTCGCGTCTTGTCGCTGC

<202> KaM452: CGACTAGGATCCGAGGTTGACATTGACAGGAGAGC



<203>

<204> 실시예 5

<205> yaad 하이드로포빈 HypA-His₆의 클로닝

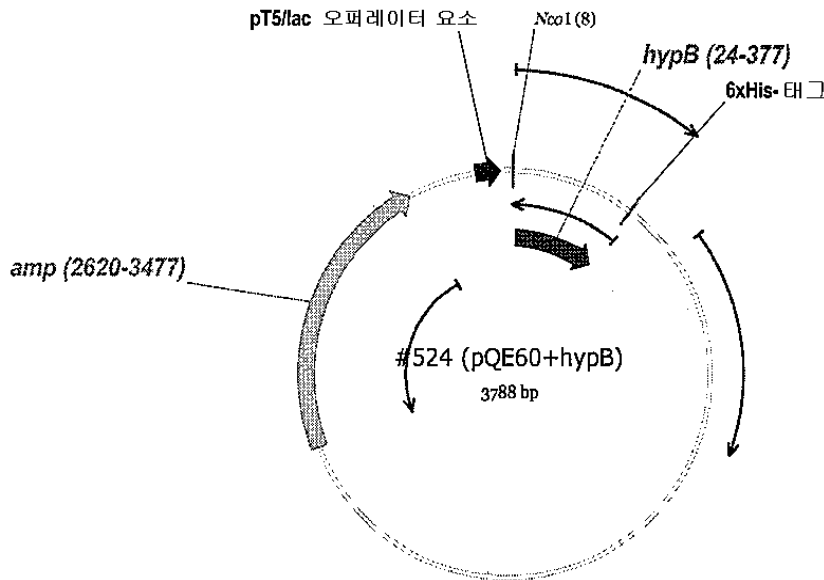
<206> pQE60 (#524)에서 HypB의 클로닝

<207> 올리고뉴클레오타이드 KaM453/KaM454을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이용되는 주형 DNA는 Nadicom에 의해 생산된 puC19 내 플라스미드 HypB였다. 얻어지는 단편은 시작 및 정지 코돈 없는 하이드로포빈 HypB 유전자의 코딩 서열을 포함하였다. PCR 단편을 겔 전기영동으로 정제하였고, 제한 엔도뉴클레아제 NcoI 및 BamHI로 절단하였다.

이 단편을 삽입체로서 이용하였고, NcoI 및 BgIII로 사전에 절단된 벡터 pQE60 내로 결찰시켰다.

KaM453: GCTTATCCATGGCGGTCAGCACGTTTCATCACTGTGC

KaM454: GCTATAGGATCCACATTGGCATTAAATGGGAGTGC

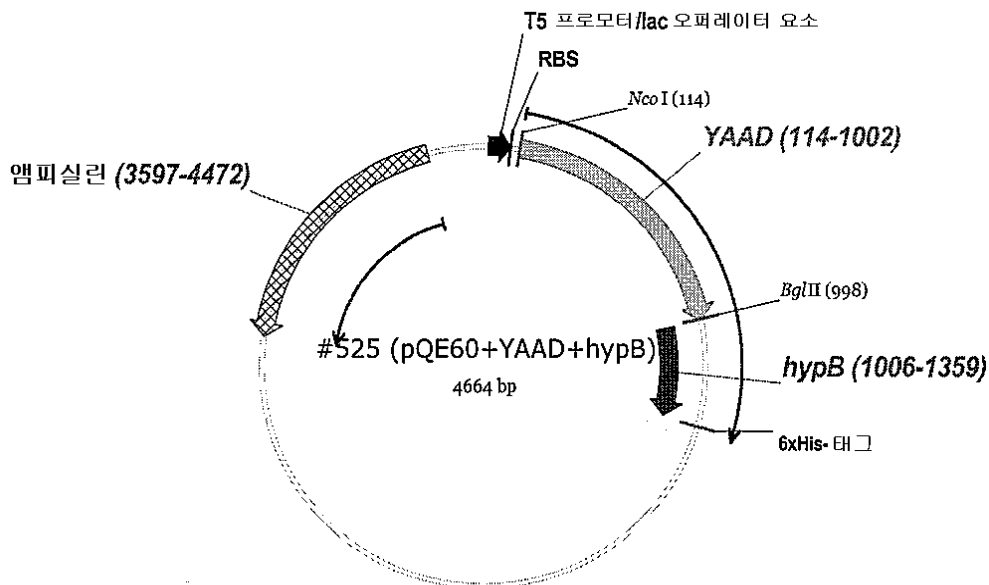


pQE60+YAAD(#525)에서 HypB의 클로닝

올리고뉴클레오타이드 KaM455/KaM456을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이용되는 주형 DNA는 Nadicom에 의해 생산된 puC19 내 플라스미드 HypB였다. 얻어지는 단편은 시작 및 정지 코돈 없는 하이드로포빈 HypB 유전자의 코딩 서열을 포함하였다. PCR 단편을 겔 전기영동으로 정제하였고, 제한 엔도뉴클레아제 BgIII 및 BamHI로 절단하였다. 이 단편을 삽입체로서 이용하였고, BgIII로 사전에 절단된 벡터 pQE60+YAAD로 결찰시켰다.

KaM455: GCTAACAGATCTATGGTCAGCACGTTTCATCACTGTC

KaM456: CTATGAGGATCCACATTGGCATTAAATGGGAGTGC



실시예 6

yaad 하이드로포빈 BASF1-His₆의 클로닝

올리고뉴클레오타이드 KaM 417 및 KaM 418를 이용하여 플라스미드 #507을 플라스미드 #508와 유사하게 클로닝하

였다.

<219> 이용되는 주형 DNA는 합성 DNA 서열 - 하이드로포빈 BASF1이었다(첨부물 참조).

<220> KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

<221> KaM418: CTGCCATTTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

<222> 실시예 7

<223> yaad 하이드로포빈 BASF2-His₆의 클로닝

<224> 올리고뉴클레오타이드 KaM 417 및 KaM 418를 이용하여 플라스미드 #506을 플라스미드 #508와 유사하게 클로닝하였다.

<225> 이용되는 주형 DNA는 합성 DNA 서열 - 하이드로포빈 BASF2이었다(첨부물 참조).

<226> KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

<227> KaM418: CTGCCATTTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

<228> 실시예 8

<229> yaad 하이드로포빈 SC3-His₆의 클로닝

<230> 올리고뉴클레오타이드 KaM464 및 KaM465를 이용하여 플라스미드 #526을 플라스미드 #508와 유사하게 클로닝하였다..

<231> 이용되는 주형 DNA는 스키포빌린 커몬으로부터의 cDNA였다(첨부물 참조).

<232> KaM464: CGTTAAGGATCCGAGGATGTTGATGGGGGTGC

<233> KaM465: GCTAACAGATCTATGTTGCGCCGCTCTCCCGTCGT

<234> 실시예 9

<235> 재조합 이. 콜라이 균주 yaad 하이드로포빈 DewA-His₆의 발효

<236> 15 ml 그라이너 튜브에서 LB 액체 배지 3 ml에 yaad 하이드로포빈 DewA-His₆를 발현하는 이. 콜라이 균주를 접종하였다. 200 rpm의 셰이커 상에서 8시간 동안 37℃에서 배양하였다. 각 경우 배플 및 LB 배지 250 ml(+ 앰피실린 100 µl/ml)를 구비한 2개의 1 l 에rlenmeyer(Erlenmeyer) 플라스크에서 사전 배양물 1 ml로 접종하였고, 180 rpm의 셰이커 상에서 9시간 동안 37℃에서 배양하였다.

<237> 20 l 발효기에서, 사전 배양물 0.5 l (OD_{600nm} 1:10, H₂O에 대해 측정)와 LB 배지(+ 앰피실린 100 µl/ml) 13.5 l를 접종하였다. ~ 3.5의 OD_{600nm}에서, 100 mM IPTG 140 ml를 첨가하였다. 3시간 후, 발효기를 10℃로 냉각시키고, 원심분리로 발효 배양액을 제거하였다. 세포 펠렛을 추가 정제에 이용하였다.

<238> 실시예 10

<239> 재조합 하이드로포빈 융합 단백질의 정제(C-말단 His₆ 태그를 갖는 하이드로포빈 융합 단백질의 정제)

<240> 세포 펠렛 100 g(100~500 mg)에 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.5)를 총 부피 200 ml가 되도록 첨가하여 재현탁시켰다. 이 현탁액을 울트라투락스(Ultraturrax) 타입 T25(Janke and Kunkel; IKA-Labortechnik)로 10분 동안 처리하고, 이어서 핵산을 분해시키기 위해 벤조나제(Merck, Darmstadt; 주문 번호 1.01697.0001) 500 단위와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세포 파괴 전에, 유리 카트리지(P1)로 여과를 실시하였다. 세포 파괴 및 잔류 게놈 DNA의 전단을 위해, 1500 bar에서 2회의 균질화 주기를 실시하였다(Microfluidizer M-110EH; Microfluidics Corp.). 균질물을 원심분리하고(Sorvall RC-5B, GSA 로터, 250 ml 원심분리용 비커, 60분, 4℃, 12,000 rpm, 23,000 g). 상청액을 얼음 위에 놓고, 펠렛을 인산나트륨 완충액(pH 7.5) 100 ml에 재현탁시켰다. 원심분리 및 재현탁을 3회 반복하였고, 3회째 반복 시 인산나트륨 완충액은 1% SDS를 포함하였다. 재현탁 후, 혼합물을 1시간 동안 교반하였고, 최종 원심분리를 수행하였다(Sorvall RC-5B, GSA 로터, 250 ml 원심분리용 비커, 60분, 4℃, 12,000 rpm, 23,000 g). SDS-PAGE 분석에 따르면, 최종 원심 분리 후 하이드로포빈은 상청액에 존재하였다(도 1). 이 실험은 하이드로포빈이 해당 이.콜라이 세포 내에 아마도 봉입체(inclusion body)

형태로 존재함을 보여준다. 하이드로포빈-포함 상층액 50 ml을 50 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 50 ml 니켈 세파로즈 고성능 17-5268-02 컬럼(Amersham)에 적용하였다. 이 컬럼을 50 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0)으로 세척하고, 후속적으로 하이드로포빈을 200 mM 이미다졸을 포함하는 50 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0)으로 용출하였다. 이미다졸을 제거하기 위해, 용액을 50 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0)으로 투석하였다.

도 1은 제조되는 하이드로포빈의 정제 상태를 보여준다:

레인 1: 니켈-세파로즈(Sepharose) 컬럼에 대한 적용(1:10 희석)

레인 2: 통과액 = 세척 단계의 용출액

레인 3-5: 용출 분획의 OD 280 최대값

도 1의 하이드로포빈의 분자량은 대략 53 kD이었다. 작은 밴드 중 몇몇은 하이드로포빈의 분해 생성물을 나타낸다.

실시예 11

성능 테스트: 유리 위 물방울의 접촉각의 변화에 의한 하이드로포빈의 특성화

기재:

유리(창문 유리, 만하임의 Sueddeutsche Glas)

실시예 10으로부터의 융합 하이드로포빈을 이용하였다.

하이드로포빈 농도: 수용액에서 100 µg/ml; 첨가제: 50 mM 나트륨 아세테이트 pH 4 + 0.1% 폴리옥시에틸렌(20)-소르비탄 모노라우레이트(Tween® 20).

- 하룻밤 동안(온도 80°C) 유리 판의 배양 후 증류수로 코팅의 세척,

- 배양 10분/80°C/증류수 내 1% 나트륨 도데실설페이트(SDS) 용액,

- 증류수로 세척

시료를 공기 하 건조시켰고, 실온에서 5 µl의 물방울의 접촉각(°)을 결정하였다.

Dataphysics OCA 15+ 접촉각 시스템, 소프트웨어 SCA 20.2.0.(2002년 11월)으로 접촉각을 측정하였다. 제조업자의 설명서에 따라 측정을 실시하였다.

미처리 유리의 접촉각은 $30 \pm 5^\circ$ 였고, 실시예 8에 따른 기능성 하이드로포빈(yaad-dewA-his₆)으로 코팅된 유리의 접촉각은 $75 \pm 5^\circ$ 였다.

Part B

계면활성 비효소 단백질의 직물 세척을 위한 용도

일반적인 테스트 설명

작용을 테스트하기 위해, 상업적으로 입수 가능한 테스트 장치(미국 아틀라스의 Launder-o-meter)로 세척 테스트를 수행하였다. 세척액에 단백질을 첨가한 경우 및 첨가하지 않은 경우 각각의 테스트를 수행하였다.

테스트를 위해, 상업적으로 입수 가능한 테스트 직물 및 가정에서 생산된 테스트 직물을 이용하였다.

번호	유형	설명	공급원
1	WFK 10 D	면 상 피지-안료 오물	독일 브루젠브라흐트의 WfK Testgewebe GmbH
2	WFK 10 PF	면 상 식물성 지방-안료 오물	독일 브루젠브라흐트의 WfK Testgewebe GmbH
3	CFT-CS 32	면 상 피지 오물	네덜란드 블라아르딩겐의 Center for Testmaterials B.V.
4	EPMA 118	면 상 피지-안료 오물	스위스 갈런의 EMPA Testmaterials, St.
5	CFT-CS10	면 상 염색된 유지방	네덜란드 블라아르딩겐의 Center for Testmaterials B.V

6	CFT-CS62	면 상 염색된 돼지 기름	네덜란드 블라아르딘겐의 Center for Testmaterials B.V
7	-	면 상 염색된 트리올레인	인하우스 제품
8	-	면 상 염색된 올리브유	인하우스 제품

<264> 세척 테스트의 수행

<265> 언급된 테스트 직물을 각각 30×30 mm의 조각으로 잘랐고, 직조된(knitted) 비염색 표백 면 상에서 재봉하였다.

<266> 상업적 테스트 직물의 경우, 각 경우 2개 스트립(50 mm × 200 mm)을 주어진 조건 하에서 각 4개의 경우(직물 1-4의 경우) 백색 면/폴리에스테르 혼성 직물 5 g 또는 각 2개의 경우(직물 5 및 6) 여러 가지 재봉된 테스트 직물과 함께 세척하였다.

<267> 자가 생산된 테스트 직물의 경우, 염색된 지방 또는 오일 0.1 g 각각 2개의 스폿을 면 스트립(50 mm × 200 mm 직조된 비염색된 표백 면)에 적하하였고, 50℃에서 30분 동안 처리하였다. 염색을 위해 수단레드(Sudan red)를 이용하였다.

<268> 세척 후, 직물을 5분 동안 250 ml의 수돗물로 행궜고, 건조하였다.

<269> 세척 이전 및 세척 후 반사율을 측정하여 세척 작용을 평가하였다.

<270> 각 경우에서 계면활성 비효소 단백질을 첨가하는 하나의 테스트를 수행하였고, 비교 조건 하에 다른 조건은 정확하게 동일하지만 첨가제만 없는 테스트를 수행하였다.

<271> 결과 표에 열거되는 퍼센트는 단백질의 첨가가 없는 테스트와 비교하여 단백질을 포함하는 테스트에서의 세척 작용의 증가를 기록하고, 하기식에 따라 계산하였다:

<272> 세척 작용의 증가[%] = $(I_E - I_{OE}) / (I_{\text{백색}} - I_A) * 100$

<273> 각 경우 I_E 는 테스트 세척 후 반사율을 의미하고, I_A 는 테스트 세척의 수행 전 반사율을 의미한다. 0은 발명의 단백질의 첨가가 없는 비교 테스트를 의미한다. $I_{\text{백색}}$ 은 얼룩 없는 깨끗한 직물의 반사율을 나타낸다.

<274> 따라서 단백질의 첨가가 없는 경우 및 단백질을 첨가하는 경우 각각에 대한 테스트에 대해 세척 이전 및 세척 이후 얼룩 없는 깨끗한 백색 직물의 반사를 비교함으로써 오물의 재침착을 평가하였다.

<275> 실시예 12

<276> 테스트 변수

<277> 이용되는 단백질 하이드로포빈 융합 단백질 yaad-Xa-dew A-his

<278> (서열번호 19)

<279> 단백질의 농도 표 1 참조

<280> 세척 조성물 상업적으로 입수 가능한 가루 세척 조성물

<281> (White Cat, 중국, 2003)

<282> 세척액의 양 캔당 250 ml

<283> 세척 조성물의 투여량 2.0 g/ℓ

<284> 액 비 20:1

<285> 수 경도 2.5 mmol/ℓ (몰비 Ca: Mg = 3:1)

<286> 세척 온도 25℃

<287> 세척 시간 30분

<288> 묽은 수용액으로서 단백질을 첨가하였다. 테스트 세척을 상기 주어진 일반적인 설명에 따라 수행 및 평가하였다. 결과를 표 1에 기록한다.

- <289> 실시예 13
- <290> 테스트 변수
- <291> 이용되는 단백질 하이드로포빈 융합 단백질 yaad-Xa-dew A-his
- <292> (서열번호 19)
- <293> 단백질의 농도 표 1 참조
- <294> 세척 조성물 상업적으로 입수 가능한 가루 세척 조성물
- <295> (Procter & Gamble로부터의 Ariel, 중국, 2004)
- <296> 세척액의 양 캔 당 250 ml
- <297> 세척 조성물의 투여량 2.0 g/ℓ
- <298> 액 비 20:1
- <299> 수 경도 2.5 mmol/ℓ (몰비 Ca: Mg = 3:1)
- <300> 세척 온도 25℃
- <301> 세척 시간 30분
- <302> 테스트 세척을 상기 주어진 일반적인 설명에 따라 수행 및 평가하였다. 결과를 표 1에 기록한다.

표 1

- <303> 테스트 세척의 결과

실시예	테스트 식물 번호	단백질 투여량 [mg/ℓ]	세척 작용의 향상 [%]
12-1	1	2.3	1.2
12-2	1	5.3	3.8
12-3	2	2.3	4.9
12-4	2	5.3	0.9
12-5	3	2.3	1.2
12-6	3	5.3	2.0
12-7	4	2.3	2.7
12-8	4	5.3	1.5
13-1	1	2.5	2.9
13-2	1	5.0	5.5
13-3	2	2.5	4.9
13-4	2	5.0	4.8
13-5	3	2.5	1.6
13-6	3	5.0	0.9
13-7	4	2.5	2.2
13-8	4	5.0	2.2

- <304> 모든 테스트에서, 세척 작용의 현저한 향상을 달성하였다.

- <305> 실시예 14

- <306> 하기 테스트 세척을 위해, 각 경우 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 및 빌더로 구성되는 세척 조성물 용 모델 배합물을 이용하였다.

- <307> 테스트 변수

- <308> 이용되는 단백질 하이드로포빈 융합 단백질 yaad40-Xa-dew A-his

- <309> (서열번호 26)
- <310> 단백질의 농도 표 2 참조
- <311> 음이온성 계면활성제 나트륨 C_{12/14} 지방 알코올 설페이트 400 ppm
- <312> 비이온성 공계면활성제 각 경우 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트 30 ppm,
- <313> 알콕실레이트 라디칼의 유형의 경우 표 2 참조
- <314> 빌더 나트륨 카보네이트 250 ppm
- <315> 세척액의 양 캔당 250 ml
- <316> 액 비 20:1
- <317> 수 정도 2.5 mmol/l (물 비 Ca: Mg = 3:1)
- <318> 세척 온도 25℃
- <319> 세척 시간 30분
- <320> 테스트 세척을 상기 주어진 일반적인 설명에 따라 수행 및 평가하였다. 결과를 표 2에 요약한다.

표 2

- <321> 테스트 세척의 결과

실시예	테스트 직물 번호	공계면활성제	단백질 투여량 [ppm]	세척 작용의 향상
14-1	5	7개의 EO를 갖는 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트	5.0	0.6 %
14-2	6	7개의 EO를 갖는 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트	5.0	1.1 %
14-3	5	14개의 EO/6개의 PO를 갖는 C13/15-옥 소 알코올 에톡실레이트	5.0	4.1 %
14-4	6	14개의 EO/6개의 PO를 갖는 C13/15-옥 소 알코올 에톡실레이트	5.0	1.7%

- <322> EO = 에틸렌 옥사이드, PO = 프로필렌 옥사이드

- <323> 실시예 15

- <324> 하기 세척 테스트를 위해, 각 경우 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 및 빌더로 구성되는 세척 조성물
용 모델 배합물을 이용하였다.

- <325> 테스트 변수

- <326> 이용되는 단백질 단백질 A:
- <327> 하이드로포빈 융합 단백질 yaad-Xa-dew A-his
- <328> (서열번호 19)
- <329> 단백질 B:
- <330> 하이드로포빈 융합 단백질 yaad40-Xa-dew A-his
- <331> (서열번호 26)

- <332> 단백질의 농도 표 3 참조

- <333> 음이온성 계면활성제 나트륨 N-도데실벤젠설포네이트 400 ppm

<334> 공계면활성제 각 경우 30 ppm, 유형의 경우 표 3 참조

<335> 빌더 나트륨 카보네이트 250 ppm

<336> 세척액의 양 캔당 250 ml

<337> 액 비 20:1

<338> 수 경도 2.5 mmol/l (몰 비 Ca: Mg = 3:1)

<339> 세척 온도 25℃

<340> 세척 시간 30분

<341> 테스트 세척을 수행하였고, 상기 주어진 일반 설명에 따라 평가하였다. 결과를 표 3에 요약한다.

표 3

<342> 테스트 세척의 결과

실시예	테스트 직물 번호	공계면활성제	단백질		세척 작용의 향상	재침착의 감소
			유형	양 [ppm]		
15-1	7	7개의 EO를 갖는 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트	A	5	1.5%	15%
15-2	7	알킬 에테르 설페이트: 7개의 EO를 갖는 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트, 설페이트화, 나트륨 염	B	5	2.1%	54%
15-3	8	7개의 EO를 갖는 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트	A	5	0.9%	0%
15-4	8	알킬 에테르 설페이트: 7개의 EO를 갖는 C13/15-옥소 알코올 에톡실레이트, 설페이트화, 나트륨 염	B	5	3.6%	40%

<343> EO = 에틸렌 옥사이드, PO = 프로필렌 옥사이드

<344> 모든 테스트에서, 각 경우 세척 작용의 향상을 달성하였다. 절두형 yaad 융합 파트너(40개의 아미노산)와의 융합 하이드로포빈 (B)는 완전한 yaad 융합 파트너(294개의 아미노산)와의 융합 하이드로포빈 (A)보다 각 경우에 더 나은 결과를 달성하였다.

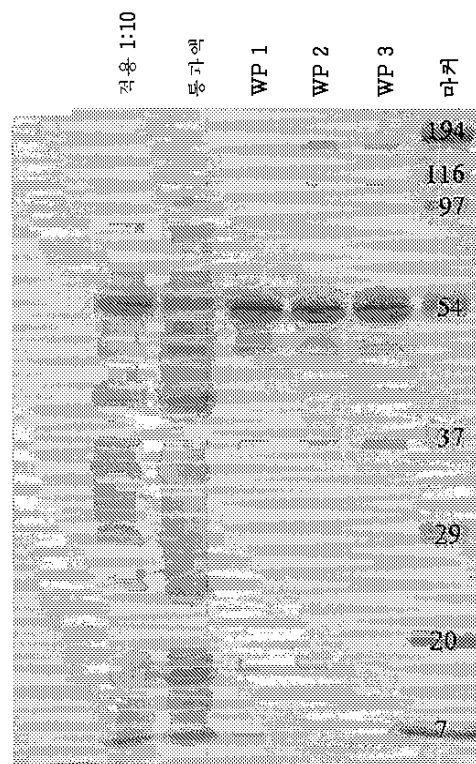
<345> 서열 목록 내 DNA 및 폴리펩타이드 서열 번호의 할당

dewA DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 1
dewA 폴리펩타이드 서열	서열번호 2
rodA DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 3
rodA 폴리펩타이드 서열	서열번호 4
hypA DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 5
hypA 폴리펩타이드 서열	서열번호 6
hypB DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 7
hypB 폴리펩타이드 서열	서열번호 8
sc3 DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 9
sc3 폴리펩타이드 서열	서열번호 10
basf1 DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 11
basf1 폴리펩타이드 서열	서열번호 12
basf2 DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 13
basf2 폴리펩타이드 서열	서열번호 14
yaad DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 15
yaad 폴리펩타이드 서열	서열번호 16
yaae DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 17

yaae 폴리펩타이드 서열	서열번호 18
yaad-Xa-dewA-his DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 19
yaad-Xa-dewA-his 폴리펩타이드 서열	서열번호 20
yaad-Xa-rodA-his DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 21
yaad-Xa-rodA-his 폴리펩타이드 서열	서열번호 22
yaad-Xa-basf1-his DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 23
yaad-Xa-basf1-his 폴리펩타이드 서열	서열번호 24
yaad40-Xa-dewA-his DNA 및 폴리펩타이드 서열	서열번호 25
yaad40-Xa-dewA-his 폴리펩타이드 서열	서열번호 26

도면

도면1



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Use of enzymatic interface-inactive proteins for textile washing

<130> PF 56973

<150> DE 10 2005 036 586.8

<151> 01/08/2005

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 405

<212> DNA

<213> *Aspergillus nidulans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(405)

<223>

<400> 1

atg cgc ttc atc gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gcg	48
Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala	
1 5 10 15	

acc gcc ctc ccg gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg	96
Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser	
20 25 30	

gcg gcc ttc gcc aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg	144
Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser	
35 40 45	

atc gct tgc tgc aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg	192
Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu	
50 55 60	

agc ggt ctg ctc ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg ggc aac act 240
Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr
65 70 75 80

ggc agc gcc tgc gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc 288
Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu
85 90 95

gct ctc gtc gac cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc 336
Ala Leu Val Asp His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val
100 105 110

gct tgc tgc cct gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct 384
Ala Cys Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala
115 120 125

ggc gct ggt acc aag gct gag 405
Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu
130 135

<210> SEQ ID NO:2

<211> 135

<212> PRT

<213> Aspergillus nidulans

<400> 2

Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala
1 5 10 15

Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser
20 25 30

Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser
35 40 45

Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu
50 55 60

Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr
65 70 75 80

Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu
85 90 95

Ala Leu Val Asp His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val
100 105 110

Ala Cys Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala
115 120 125

Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu
130 135

<210> SEQ ID NO:3

<211> 471

<212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(471)

<223>

<400> 3

atg aag ttc tcc att gct gcc gct gtc gtt gct ttc gcc gcc tcc gtc 48

Met	Lys	Phe	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Val	
1				5					10					15		
gcg	gcc	ctc	cct	cct	gcc	cat	gat	tcc	cag	ttc	gct	ggc	aat	ggg	gtt	96
Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	His	Asp	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	Val	
			20					25					30			
ggc	aac	aag	ggc	aac	agc	aac	gtc	aag	ttc	cct	gtc	ccc	gaa	aac	gtg	144
Gly	Asn	Lys	Gly	Asn	Ser	Asn	Val	Lys	Phe	Pro	Val	Pro	Glu	Asn	Val	
		35					40					45				
acc	gtc	aag	cag	gcc	tcc	gac	aag	tgc	ggg	gac	cag	gcc	cag	ctc	tct	192
Thr	Val	Lys	Gln	Ala	Ser	Asp	Lys	Cys	Gly	Asp	Gln	Ala	Gln	Leu	Ser	
	50					55					60					
tgc	tgc	aac	aag	gcc	acg	tac	gcc	ggg	gac	acc	aca	acc	gtt	gat	gag	240
Cys	Cys	Asn	Lys	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gly	Asp	Thr	Thr	Thr	Val	Asp	Glu	
65					70				75					80		
ggg	ctt	ctg	tct	ggg	gcc	ctc	agc	ggc	ctc	atc	ggc	gcc	ggg	tct	ggg	288
Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	
				85				90					95			
gcc	gaa	ggg	ctt	ggg	ctc	ttc	gat	cag	tgc	tcc	aag	ctt	gat	gtt	gct	336
Ala	Glu	Gly	Leu	Gly	Leu	Phe	Asp	Gln	Cys	Ser	Lys	Leu	Asp	Val	Ala	
			100					105					110			
gtc	ctc	att	ggc	atc	caa	gat	ctt	gtc	aac	cag	aag	tgc	aag	caa	aac	384
Val	Leu	Ile	Gly	Ile	Gln	Asp	Leu	Val	Asn	Gln	Lys	Cys	Lys	Gln	Asn	
		115					120					125				
att	gcc	tgc	tgc	cag	aac	tcc	ccc	tcc	agc	gcg	gat	ggc	aac	ctt	att	432
Ile	Ala	Cys	Cys	Gln	Asn	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ile	
	130					135					140					
ggg	gtc	ggg	ctc	cct	tgc	gtt	gcc	ctt	ggc	tcc	atc	ctc				471
Gly	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Ile	Leu				
145					150				155							

<210> SEQ ID NO:4

<211> 157

<212> PRT

<213> Aspergillus nidulans

<400> 4

Met Lys Phe Ser Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val
20 25 30

Gly Asn Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val
35 40 45

Thr Val Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser
50 55 60

Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu
65 70 75 80

Gly Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly
85 90 95

Ala Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala
100 105 110

Val Leu Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn
115 120 125

Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile
130 135 140

Gly Val Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu
145 150 155

<210> SEQ ID NO:5

<211> 336

<212> DNA

<213> Agaricus bisporus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<223>

<400> 5

atg atc tct cgc gtc ctt gtc gct gct ctc gtc gct ctc ccc gct ctt	48
Met Ile Ser Arg Val Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Pro Ala Leu	
1 5 10 15	

gtt act gca act cct gct ccc gga aag cct aaa gcc agc agt cag tgc	96
Val Thr Ala Thr Pro Ala Pro Gly Lys Pro Lys Ala Ser Ser Gln Cys	
20 25 30	

gac gtc ggt gaa atc cat tgc tgt gac act cag cag act ccc gac cac	144
Asp Val Gly Glu Ile His Cys Cys Asp Thr Gln Gln Thr Pro Asp His	
35 40 45	

acc agc gcc gcc gcg tct ggt ttg ctt ggt gtt ccc atc aac ctt ggt	192
Thr Ser Ala Ala Ala Ser Gly Leu Leu Gly Val Pro Ile Asn Leu Gly	
50 55 60	

gct ttc ctc ggt ttc gac tgt acc ccc att tcc gtc ctt ggc gtc ggt	240
Ala Phe Leu Gly Phe Asp Cys Thr Pro Ile Ser Val Leu Gly Val Gly	
65 70 75 80	

ggc aac aac tgt gct gct cag cct gtc tgc tgc aca gga aat caa ttc	288
Gly Asn Asn Cys Ala Ala Gln Pro Val Cys Cys Thr Gly Asn Gln Phe	
85 90 95	

acc gca ttg att aac gct ctt gac tgc tct cct gtc aat gtc aac ctc	336
---	-----

Thr Ala Leu Ile Asn Ala Leu Asp Cys Ser Pro Val Asn Val Asn Leu
100 105 110

<210> SEQ ID NO:6

<211> 112

<212> PRT

<213> Agaricus bisporus

<400> 6

Met Ile Ser Arg Val Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Pro Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Ala Thr Pro Ala Pro Gly Lys Pro Lys Ala Ser Ser Gln Cys
20 25 30

Asp Val Gly Glu Ile His Cys Cys Asp Thr Gln Gln Thr Pro Asp His
35 40 45

Thr Ser Ala Ala Ala Ser Gly Leu Leu Gly Val Pro Ile Asn Leu Gly
50 55 60

Ala Phe Leu Gly Phe Asp Cys Thr Pro Ile Ser Val Leu Gly Val Gly
65 70 75 80

Gly Asn Asn Cys Ala Ala Gln Pro Val Cys Cys Thr Gly Asn Gln Phe
85 90 95

Thr Ala Leu Ile Asn Ala Leu Asp Cys Ser Pro Val Asn Val Asn Leu
100 105 110

<210> SEQ ID NO:7

<211> 357

<212> DNA

<213> Agaricus bisporus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223>

<400> 7

atg gtc agc acg ttc atc act gtc gca aag acc ctt ctc gtc gcg ctc	48
Met Val Ser Thr Phe Ile Thr Val Ala Lys Thr Leu Leu Val Ala Leu	
1 5 10 15	

ctc ttc gtc aat atc aat atc gtc gtt ggt act gca act acc ggc aag	96
Leu Phe Val Asn Ile Asn Ile Val Val Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys	
20 25 30	

cat tgt agc acc ggt cct atc gag tgc tgc aag cag gtc atg gat tct	144
His Cys Ser Thr Gly Pro Ile Glu Cys Cys Lys Gln Val Met Asp Ser	
35 40 45	

aag agc cct cag gct acg gag ctt ctt acg aag aat ggc ctt ggc ctg	192
Lys Ser Pro Gln Ala Thr Glu Leu Leu Thr Lys Asn Gly Leu Gly Leu	
50 55 60	

ggt gtc ctt gct ggc gtg aag ggt ctt gtt ggc gcg aat tgc agc cct	240
Gly Val Leu Ala Gly Val Lys Gly Leu Val Gly Ala Asn Cys Ser Pro	
65 70 75 80	

atc acg gca att ggt att ggc tcc ggc agc caa tgc tct ggc cag acc	288
Ile Thr Ala Ile Gly Ile Gly Ser Gly Ser Gln Cys Ser Gly Gln Thr	
85 90 95	

gtt tgc tgc cag aat aat aat ttc aac ggt gtt gtc gct att ggt tgc	336
Val Cys Cys Gln Asn Asn Asn Phe Asn Gly Val Val Ala Ile Gly Cys	

100	105	110	
act ccc att aat gcc aat gtg			
Thr	Pro	Ile	Asn Ala Asn Val
115			
			357

<210> SEQ ID NO:8

<211> 119

<212> PRT

<213> Agaricus bisporus

<400> 8

Met	Val	Ser	Thr	Phe	Ile	Thr	Val	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Val	Ala	Leu
1				5					10					15	

Leu	Phe	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Val	Val	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr	Gly	Lys
			20					25						30	

His	Cys	Ser	Thr	Gly	Pro	Ile	Glu	Cys	Cys	Lys	Gln	Val	Met	Asp	Ser
		35					40					45			

Lys	Ser	Pro	Gln	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gly	Leu	Gly	Leu
	50					55					60				

Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Val	Lys	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Asn	Cys	Ser	Pro
65					70				75						80

Ile	Thr	Ala	Ile	Gly	Ile	Gly	Ser	Gly	Ser	Gln	Cys	Ser	Gly	Gln	Thr
				85				90						95	

Val	Cys	Cys	Gln	Asn	Asn	Asn	Phe	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Ile	Gly	Cys
			100					105					110		

Thr Pro Ile Asn Ala Asn Val
115

<210> SEQ ID NO:9

<211> 408

<212> DNA

<213> Schizophyllum commune

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(408)

<223>

<400> 9
atg ttc gcc cgt ctc ccc gtc gtg ttc ctc tac gcc ttc gtc gcg ttc 48
Met Phe Ala Arg Leu Pro Val Val Phe Leu Tyr Ala Phe Val Ala Phe
1 5 10 15

ggc gcc ctc gtc gct gcc ctc cca ggt ggc cac ccg ggc acg acc acg 96
Gly Ala Leu Val Ala Ala Leu Pro Gly Gly His Pro Gly Thr Thr Thr
20 25 30

ccg ccg gtt acg acg acg gtg acg gtg acc acg ccg ccc tcg acg acg 144
Pro Pro Val Thr Thr Thr Val Thr Val Thr Thr Pro Pro Ser Thr Thr
35 40 45

acc atc gcc gcc ggt ggc acg tgt act acg ggg tcg ctc tct tgc tgc 192
Thr Ile Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ser Leu Ser Cys Cys
50 55 60

aac cag gtt caa tcg gcg agc agc agc cct gtt acc gcc ctc ctc ggc 240
Asn Gln Val Gln Ser Ala Ser Ser Ser Pro Val Thr Ala Leu Leu Gly

65	70	75	80	
ctg ctc ggc att gtc ctc agc gac ctc aac gtt ctc gtt ggc atc agc Leu Leu Gly Ile Val Leu Ser Asp Leu Asn Val Leu Val Gly Ile Ser				288
	85	90	95	
tgc tct ccc ctc act gtc atc ggt gtc gga ggc agc ggc tgt tcg gcg Cys Ser Pro Leu Thr Val Ile Gly Val Gly Gly Ser Gly Cys Ser Ala				336
	100	105	110	
cag acc gtc tgc tgc gaa aac acc caa ttc aac ggg ctg atc aac atc Gln Thr Val Cys Cys Glu Asn Thr Gln Phe Asn Gly Leu Ile Asn Ile				384
	115	120	125	
ggt tgc acc ccc atc aac atc ctc Gly Cys Thr Pro Ile Asn Ile Leu				408
	130	135		
<210> SEQ ID NO:10				
<211> 136				
<212> PRT				
<213> Schizophyllum communeae				
<400> 10				
Met Phe Ala Arg Leu Pro Val Val Phe Leu Tyr Ala Phe Val Ala Phe				
1	5	10	15	
Gly Ala Leu Val Ala Ala Leu Pro Gly Gly His Pro Gly Thr Thr Thr				
	20	25	30	
Pro Pro Val Thr Thr Thr Val Thr Val Thr Thr Pro Pro Ser Thr Thr				
	35	40	45	
Thr Ile Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ser Leu Ser Cys Cys				

50

55

60

Asn Gln Val Gln Ser Ala Ser Ser Ser Pro Val Thr Ala Leu Leu Gly
65 70 75 80

Leu Leu Gly Ile Val Leu Ser Asp Leu Asn Val Leu Val Gly Ile Ser
85 90 95

Cys Ser Pro Leu Thr Val Ile Gly Val Gly Gly Ser Gly Cys Ser Ala
100 105 110

Gln Thr Val Cys Cys Glu Asn Thr Gln Phe Asn Gly Leu Ile Asn Ile
115 120 125

Gly Cys Thr Pro Ile Asn Ile Leu
130 135

<210> SEQ ID NO:11

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220> CDS

<221> CDS

<222> (1)..(483)

<223> Artificial hydrophobin sequence with characteristic
cysteine-pattern

<400> 11

atg aag ttc tcc gtc tcc gcc gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcc tcc gtc 48
Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val

1	5	10	15	
gcc gcc ctc cct cag cac gac tcc gcc gcc ggc aac ggc aac ggc gtc				96
Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val				
20	25	30		
ggc aac aag ttc cct gtc cct gac gac gtc acc gtc aag cag gcc acc				144
Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr				
35	40	45		
gac aag tgc ggc gac cag gcc cag ctc tcc tgc tgc aac aag gcc acc				192
Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr				
50	55	60		
tac gcc ggc gac gtc ctc acc gac atc gac gag ggc atc ctc gcc ggc				240
Tyr Ala Gly Asp Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly				
65	70	75	80	
ctc ctc aag aac ctc atc ggc ggc ggc tcc ggc tcc gag ggc ctc ggc				288
Leu Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly				
85	90	95		
ctc ttc gac cag tgc gtc aag ctc gac ctc cag atc tcc gtc atc ggc				336
Leu Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly				
100	105	110		
atc cct atc cag gac ctc ctc aac cag gtc aac aag cag tgc aag cag				384
Ile Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln				
115	120	125		
aac atc gcc tgc tgc cag aac tcc cct tcc gac gcc acc ggc tcc ctc				432
Asn Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu				
130	135	140		
gtc aac ctc ggc ctc ggc aac cct tgc atc cct gtc tcc ctc ctc cat				480
Val Asn Leu Gly Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His				
145	150	155	160	
atg				483
Met				

<210> SEQ ID NO:12

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial hydrophobin sequence with characteristic
cysteine-pattern

<400> 12

Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val
20 25 30

Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr
35 40 45

Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr
50 55 60

Tyr Ala Gly Asp Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly
65 70 75 80

Leu Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly
85 90 95

Leu Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly
100 105 110

Ile Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln
115 120 125

Asn Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu
130 135 140

Val Asn Leu Gly Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His
145 150 155 160

Met

<210> SEQ ID NO:13

<211> 465

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220> CDS

<221> CDS

<222> (1)..(465)

<223> Artificial hydrophobin sequence with characteristic
cysteine-pattern

<400> 13
atg aag ttc tcc gtc tcc gcc gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcc tcc gtc 48
Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val
1 5 10 15

gcc gcc ctc cct cag cac gac tcc gcc gcc ggc aac ggc aac ggc gtc 96
Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val
20 25 30

ggc aac aag ttc cct gtc cct gac gac gtc acc gtc aag cag gcc acc 144
Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr
35 40 45

gac aag tgc ggc gac cag gcc cag ctc tcc tgc tgc aac aag gcc acc 192
 Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr
 50 55 60

tac gcc ggc gac gtc acc gac atc gac gag ggc atc ctc gcc ggc ctc 240
 Tyr Ala Gly Asp Val Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu
 65 70 75 80

ctc aag aac ctc atc ggc ggc ggc tcc ggc tcc gag ggc ctc ggc ctc 288
 Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu
 85 90 95

ttc gac cag tgc gtc aag ctc gac ctc cag atc tcc gtc atc ggc atc 336

Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile
 100 105 110

cct atc cag gac ctc ctc aac cag cag tgc aag cag aac atc gcc tgc 384
 Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys
 115 120 125

tgc cag aac tcc cct tcc gac gcc acc ggc tcc ctc gtc aac ctc ggc 432
 Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly
 130 135 140

aac cct tgc atc cct gtc tcc ctc ctc cat atg 465
 Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met
 145 150 155

<210> SEQ ID NO:14

<211> 155

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial hydrophobin sequence with characteristic
 cysteine-pattern

<400> 14

Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val
20 25 30

Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr
35 40 45

Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr
50 55 60

Tyr Ala Gly Asp Val Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu
65 70 75 80

Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu
85 90 95

Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile
100 105 110

Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys
115 120 125

Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly
130 135 140

Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met
145 150 155

<210> SEQ ID NO:15

<211> 882

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(882)

<223>

<400> 15

atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
1 5 10 15	

caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
20 25 30	

atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg	144
Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
35 40 45	

cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct	192
Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
50 55 60	

aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca	240
Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala	
65 70 75 80	

aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg	288
Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met	
85 90 95	

ggt gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa	336
Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu	

100	105	110	
gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc			384
Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly			
115	120	125	
tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct			432
Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser			
130	135	140	
atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct			480
Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala			
145	150	155	160
gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg			528
Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala			
165	170	175	
atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct			576
Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro			
180	185	190	
tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt			624
Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val			
195	200	205	
aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg			672
Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met			
210	215	220	
atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa			720
Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys			
225	230	235	240
tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act			768
Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr			
245	250	255	
cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt			816
His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly			
260	265	270	
act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt			864
Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg			

275 280 285

atg caa gaa cgc ggc tgg 882
Met Gln Glu Arg Gly Trp
290

<210> SEQ ID NO:16

<211> 294

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 16

Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met
1 5 10 15

Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys
20 25 30

Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val
35 40 45

Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro
50 55 60

Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala
65 70 75 80

Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met
85 90 95

Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu
100 105 110

Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly
115 120 125

Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser
130 135 140

Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala
145 150 155 160

Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala
165 170 175

Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro
180 185 190

Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val
195 200 205

Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met
210 215 220

Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys
225 230 235 240

Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr
245 250 255

His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly
260 265 270

Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg
275 280 285

Met Gln Glu Arg Gly Trp
290

<210> SEQ ID NO:17

<211> 591

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(591)

<223>

<400> 17

atg gga tta aca ata ggt gta cta gga ctt caa gga gca gtt aga gag	48
Met Gly Leu Thr Ile Gly Val Leu Gly Leu Gln Gly Ala Val Arg Glu	
1 5 10 15	

cac atc cat gcg att gaa gca tgc ggc gcg gct ggt ctt gtc gta aaa	96
His Ile His Ala Ile Glu Ala Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Val Lys	
20 25 30	

cgt ccg gag cag ctg aac gaa gtt gac ggg ttg att ttg ccg ggc ggt	144
Arg Pro Glu Gln Leu Asn Glu Val Asp Gly Leu Ile Leu Pro Gly Gly	
35 40 45	

gag agc acg acg atg cgc cgt ttg atc gat acg tat caa ttc atg gag	192
Glu Ser Thr Thr Met Arg Arg Leu Ile Asp Thr Tyr Gln Phe Met Glu	
50 55 60	

ccg ctt cgt gaa ttc gct gct cag ggc aaa ccg atg ttt gga aca tgt	240
Pro Leu Arg Glu Phe Ala Ala Gln Gly Lys Pro Met Phe Gly Thr Cys	
65 70 75 80	

gcc gga tta att ata tta gca aaa gaa att gcc ggt tca gat aat cct	288
---	-----

Ala Gly Leu Ile Ile Leu Ala Lys Glu Ile Ala Gly Ser Asp Asn Pro	
85 90 95	
cat tta ggt ctt ctg aat gtg gtt gta gaa cgt aat tca ttt ggc cgg	336
His Leu Gly Leu Leu Asn Val Val Val Glu Arg Asn Ser Phe Gly Arg	
100 105 110	
cag gtt gac agc ttt gaa gct gat tta aca att aaa ggc ttg gac gag	384
Gln Val Asp Ser Phe Glu Ala Asp Leu Thr Ile Lys Gly Leu Asp Glu	
115 120 125	
cct ttt act ggg gta ttc atc cgt gct ccg cat att tta gaa gct ggt	432
Pro Phe Thr Gly Val Phe Ile Arg Ala Pro His Ile Leu Glu Ala Gly	
130 135 140	
gaa aat gtt gaa gtt cta tcg gag cat aat ggt cgt att gta gcc gcg	480
Glu Asn Val Glu Val Leu Ser Glu His Asn Gly Arg Ile Val Ala Ala	
145 150 155 160	
aaa cag ggg caa ttc ctt ggc tgc tca ttc cat ccg gag ctg aca gaa	528
Lys Gln Gly Gln Phe Leu Gly Cys Ser Phe His Pro Glu Leu Thr Glu	
165 170 175	
gat cac cga gtg acg cag ctg ttt gtt gaa atg gtt gag gaa tat aag	576
Asp His Arg Val Thr Gln Leu Phe Val Glu Met Val Glu Glu Tyr Lys	
180 185 190	
caa aag gca ctt gta	591
Gln Lys Ala Leu Val	
195	

<210> SEQ ID NO:18

<211> 197

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 18

Met Gly Leu Thr Ile Gly Val Leu Gly Leu Gln Gly Ala Val Arg Glu
1 5 10 15

His Ile His Ala Ile Glu Ala Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Val Lys
20 25 30

Arg Pro Glu Gln Leu Asn Glu Val Asp Gly Leu Ile Leu Pro Gly Gly
35 40 45

Glu Ser Thr Thr Met Arg Arg Leu Ile Asp Thr Tyr Gln Phe Met Glu
50 55 60

Pro Leu Arg Glu Phe Ala Ala Gln Gly Lys Pro Met Phe Gly Thr Cys
65 70 75 80

Ala Gly Leu Ile Ile Leu Ala Lys Glu Ile Ala Gly Ser Asp Asn Pro
85 90 95

His Leu Gly Leu Leu Asn Val Val Val Glu Arg Asn Ser Phe Gly Arg
100 105 110

Gln Val Asp Ser Phe Glu Ala Asp Leu Thr Ile Lys Gly Leu Asp Glu
115 120 125

Pro Phe Thr Gly Val Phe Ile Arg Ala Pro His Ile Leu Glu Ala Gly
130 135 140

Glu Asn Val Glu Val Leu Ser Glu His Asn Gly Arg Ile Val Ala Ala
145 150 155 160

Lys Gln Gly Gln Phe Leu Gly Cys Ser Phe His Pro Glu Leu Thr Glu
165 170 175

Asp His Arg Val Thr Gln Leu Phe Val Glu Met Val Glu Glu Tyr Lys
180 185 190

Gln Lys Ala Leu Val
195

<210> SEQ ID NO:19

<211> 1329

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220> CDS

<221> CDS

<222> (1)..(1329)

<223> fusion protein

<400> 19
atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg 48
Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met
1 5 10 15

caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa 96
Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys
20 25 30

atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg 144
Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val
35 40 45

cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct 192
Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro
50 55 60

aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca 240
Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala
65 70 75 80

aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met 85 90 95	288
ggt gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu 100 105 110	336
gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly 115 120 125	384
tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser 130 135 140	432
atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala 145 150 155 160	480
gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala 165 170 175	528
atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro 180 185 190	576
tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val 195 200 205	624
aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met 210 215 220	672
atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys 225 230 235 240	720
tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr 245 250 255	768

cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly 260 265 270	816
act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg 275 280 285	864
atg caa gaa cgc ggc tgg aga tcc att gaa ggc cgc atg cgc ttc atc Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Arg Phe Ile 290 295 300	912
gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gcg acc gcc ctc ccg Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Pro 305 310 315 320	960
gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg gcg gcc ttc gcc Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala 325 330 335	1008
aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg atc gct tgc tgc Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys 340 345 350	1056
aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg agc ggt ctg ctc Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu 355 360 365	1104
ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg gcc aac act ggc agc gcc tgc Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys 370 375 380	1152
gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc gct ctc gtc gac Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp 385 390 395 400	1200
cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc gct tgc tgc cct His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro 405 410 415	1248
gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct ggc gct ggt acc Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr 420 425 430	1296

aag gct gag gga tct cat cac cat cac cat cac 1329
 Lys Ala Glu Gly Ser His His His His His His
 435 440

<210> SEQ ID NO:20

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> fusion protein

<400> 20

Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met
 1 5 10 15

Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys
 20 25 30

Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val
 35 40 45

Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro
 50 55 60

Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala
 65 70 75 80

Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu
100 105 110

Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly
115 120 125

Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser
130 135 140

Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala
145 150 155 160

Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala
165 170 175

Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro
180 185 190

Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val
195 200 205

Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met
210 215 220

Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys
225 230 235 240

Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr
245 250 255

His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly
260 265 270

Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg
275 280 285

Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Arg Phe Ile

290 295 300

Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Pro
305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala
325 330 335

Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys
340 345 350

Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
355 360 365

Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys
370 375 380

Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp
385 390 395 400

His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro
405 410 415

Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr
420 425 430

Lys Ala Glu Gly Ser His His His His His His
435 440

<210> SEQ ID NO:21

<211> 1395

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220> CDS

<221> CDS

<222> (1)..(1395)

<223> fusion protein

<400> 21

atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
1 5 10 15	

caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
20 25 30	

atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg	144
Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
35 40 45	

cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct	192
Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
50 55 60	

aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca	240
Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala	
65 70 75 80	

aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg	288
Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met	
85 90 95	

ggt gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa	336
Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu	
100 105 110	

gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc	384
Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly	
115 120 125	

tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser 130 135 140	432
atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala 145 150 155 160	480
gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala 165 170 175	528
atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro 180 185 190	576
tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val 195 200 205	624
aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met 210 215 220	672
atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys 225 230 235 240	720
tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr 245 250 255	768
cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly 260 265 270	816
act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg 275 280 285	864
atg caa gaa cgc ggc tgg aga tct att gaa ggc cgc atg aag ttc tcc Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Lys Phe Ser 290 295 300	912

att gct gcc gct gtc gtt gct ttc gcc gcc tcc gtc gcg gcc ctc cct 960
Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val Ala Ala Leu Pro
305 310 315 320

cct gcc cat gat tcc cag ttc gct ggc aat ggt gtt ggc aac aag ggc 1008
Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val Gly Asn Lys Gly
325 330 335

aac agc aac gtc aag ttc cct gtc ccc gaa aac gtg acc gtc aag cag 1056
Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val Thr Val Lys Gln
340 345 350

gcc tcc gac aag tgc ggt gac cag gcc cag ctc tct tgc tgc aac aag 1104
Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys
355 360 365

gcc acg tac gcc ggt gac acc aca acc gtt gat gag ggt ctt ctg tct 1152
Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu Gly Leu Leu Ser
370 375 380

ggt gcc ctc agc ggc ctc atc ggc gcc ggg tct ggt gcc gaa ggt ctt 1200
 Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly Ala Glu Gly Leu
 385 390 395 400

ggt ctc ttc gat cag tgc tcc aag ctt gat gtt gct gtc ctc att ggc 1248
 Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala Val Leu Ile Gly
 405 410 415

atc caa gat ctt gtc aac cag aag tgc aag caa aac att gcc tgc tgc 1296
Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys Cys
420 425 430

cag aac tcc ccc tcc agc gcg gat ggc aac ctt att ggt gtc ggt ctc 1344
Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile Gly Val Gly Leu
435 440 445

cct tgc gtt gcc ctt ggc tcc atc ctc gga tct cat cac cat cac cat 1392
Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu Gly Ser His His His His His
450 455 460

cac 1395
His
465

<210> SEQ ID NO:22

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> fusion protein

<400> 22

Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met
1 5 10 15

Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys
20 25 30

Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val
35 40 45

Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro
50 55 60

Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala
65 70 75 80

Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met
85 90 95

Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu
100 105 110

Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly
115 120 125

Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser
130 135 140

Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala
145 150 155 160

Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala
165 170 175

Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro
180 185 190

Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val
195 200 205

Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met
210 215 220

Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys
225 230 235 240

Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr
245 250 255

His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly
260 265 270

Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg
275 280 285

Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Lys Phe Ser
290 295 300

Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val Ala Ala Leu Pro
305 310 315 320

Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val Gly Asn Lys Gly
325 330 335

Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val Thr Val Lys Gln
340 345 350

Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys
355 360 365

Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu Gly Leu Leu Ser
370 375 380

Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly Ala Glu Gly Leu
385 390 395 400

Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala Val Leu Ile Gly
405 410 415

Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys Cys
420 425 430

Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile Gly Val Gly Leu
435 440 445

Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu Gly Ser His His His His His
450 455 460

His
465

<210> SEQ ID NO:23

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220> CDS

<221> CDS

<222> (1)..(1407)

<223> fusion protein

<400> 23

atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
1 5 10 15	

caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
20 25 30	

atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg	144
Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
35 40 45	

cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct	192
Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
50 55 60	

aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca	240
Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala	
65 70 75 80	

aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg	288
Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met	
85 90 95	

ggt gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa	336
Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu	
100 105 110	

gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc	384
---	-----

Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly	
115 120 125	
tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct	432
Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser	
130 135 140	
atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct	480
Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala	
145 150 155 160	
gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg	528
Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala	
165 170 175	
atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct	576
Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro	
180 185 190	
tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt	624
Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val	
195 200 205	
aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg	672
Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met	
210 215 220	
atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa	720
Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys	
225 230 235 240	
tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act	768
Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr	
245 250 255	
cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt	816
His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly	
260 265 270	
act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt	864
Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg	
275 280 285	
atg caa gaa cgc ggc tgg aga tct att gaa ggc cgc atg aag ttc tcc	912
Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Lys Phe Ser	

290	295	300	
gtc tcc gcc gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcc tcc gtc gcc gcc ctc cct			960
Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val Ala Ala Leu Pro			
305	310	315	320
cag cac gac tcc gcc gcc ggc aac ggc aac ggc gtc ggc aac aag ttc			1008
Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val Gly Asn Lys Phe			
	325	330	335
cct gtc cct gac gac gtc acc gtc aag cag gcc acc gac aag tgc ggc			1056
Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr Asp Lys Cys Gly			
	340	345	350
gac cag gcc cag ctc tcc tgc tgc aac aag gcc acc tac gcc ggc gac			1104
Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp			
	355	360	365
gtc ctc acc gac atc gac gag ggc atc ctc gcc ggc ctc ctc aag aac			1152
Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu Leu Lys Asn			
	370	375	380
ctc atc ggc ggc ggc tcc ggc tcc gag ggc ctc ggc ctc ttc gac cag			1200
Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln			
385	390	395	400
tgc gtc aag ctc gac ctc cag atc tcc gtc atc ggc atc cct atc cag			1248
Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile Pro Ile Gln			
	405	410	415
gac ctc ctc aac cag gtc aac aag cag tgc aag cag aac atc gcc tgc			1296
Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys			
	420	425	430
tgc cag aac tcc cct tcc gac gcc acc ggc tcc ctc gtc aac ctc ggc			1344
Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly			
	435	440	445
ctc ggc aac cct tgc atc cct gtc tcc ctc ctc cat atg gga tct cat			1392
Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met Gly Ser His			
	450	455	460
cac cat cac cat cac			1407
His His His His His			

465

<210> SEQ ID NO:24

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> fusion protein

<400> 24

Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met
1 5 10 15

Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys
20 25 30

Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val
35 40 45

Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro
50 55 60

Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala
65 70 75 80

Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met
85 90 95

Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu
100 105 110

Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly
115 120 125

Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser
130 135 140

Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala
145 150 155 160

Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala
165 170 175

Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro
180 185 190

Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val
195 200 205

Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met
210 215 220

Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys
225 230 235 240

Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr
245 250 255

His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly
260 265 270

Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg
275 280 285

Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Lys Phe Ser
290 295 300

Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val Ala Ala Leu Pro

305 310 315 320

Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val Gly Asn Lys Phe
325 330 335

Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr Asp Lys Cys Gly
340 345 350

Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp
355 360 365

Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu Leu Lys Asn
370 375 380

Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln
385 390 395 400

Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile Pro Ile Gln
405 410 415

Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys
420 425 430

Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly
435 440 445

Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met Gly Ser His
450 455 460

His His His His His
465

<210> SEQ ID NO:25

<211> 561

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220> CDS

<221> CDS

<222> (1)..(561)

<223> fusion protein

<400> 25

atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
1 5 10 15	

caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
20 25 30	

atc gct gaa gaa gct gga gct gtc att gaa ggc cgc atg cgc ttc atc	144
Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ile Glu Gly Arg Met Arg Phe Ile	
35 40 45	

gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gcg acc gcc ctc ccg	192
Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Pro	
50 55 60	

gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg gcg gcc ttc gcc	240
Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala	
65 70 75 80	

aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg atc gct tgc tgc	288
Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys	
85 90 95	

aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg agc ggt ctg ctc	336
Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu	
100 105 110	

ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg ggc aac act ggc agc gcc tgc 384
Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys
115 120 125

gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc gct ctc gtc gac 432
Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp
130 135 140

cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc gct tgc tgc cct 480
His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro
145 150 155 160

gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct ggc gct ggt acc 528
Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr
165 170 175

aag gct gag gga tct cat cac cat cac cat cac 561
Lys Ala Glu Gly Ser His His His His His His
180 185

<210> SEQ ID NO:26

<211> 187

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> fusion protein

<400> 26

Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met
1 5 10 15

Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys
20 25 30

Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ile Glu Gly Arg Met Arg Phe Ile

35

40

45

Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Pro
50 55 60

Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala
65 70 75 80

Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys
85 90 95

Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
100 105 110

Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys
115 120 125

Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp
130 135 140

His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro
145 150 155 160

Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr
165 170 175

Lys Ala Glu Gly Ser His His His His His His
180 185