(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[7]
C07K 14/00

(11) 공개번호 특2001-0052736
(43) 공개일자 2001년06월25일

(21) 출원번호 10-2000-7014021
(22) 출원일자 2000년12월09일
번역문제출일자 2000년12월09일
(86) 국제출원번호 PCT/DK1999/00314 (87) 국제공개번호 WO 1999/64619
(86) 국제출원출원일자 1999년06월10일 (87) 국제공개일자 1999년12월16일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 시에라리온 스와질랜드 우간다 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 기네비쏘 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 아랍에미리트 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀랜드 영국 그레나다 그루지야 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이스라엘 인도 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아 남아프리카 짐바브웨

(30) 우선권주장 09/111,256 1998년06월10일 미국(US)

PA199801341 1998년10월20일 덴마크(DK)

PA199801340 1998년10월20일 덴마크(DK)

PA199801725 1998년12월23일 덴마크(DK)

PA199900308 1999년03월05일 덴마크(DK)

PA199900307 1999년03월05일 덴마크(DK)

PA199900306 1999년03월05일 덴마크(DK)

PA199900309 1999년03월05일 덴마크(DK)

(71) 출원인 노보자임스 에이 / 에스 피아 스타르

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 크록쇼이베이 36

(72) 발명자 카우피넨마르쿠스사카리

덴마크디케이-2200코펜하겐엔.5에게가데10

슈레인마르틴

덴마크디케이-2100코펜하겐외비에데벨츠가데51

슈노르커크

덴마크디케이-2200코펜하겐엔.1.티브이.뇌레브로가데44에이

안데르센레네논보에

덴마크디케이-3450알레뢰드락세베이11

브죄른바드마즈에켈룬트

덴마크디케이-1955프레데릭스베르크써드닥터아빌드가아즈알레8

(74) 대리인 장용식, 박종혁, 장두현

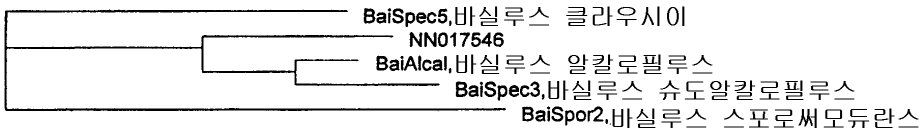
심사청구 : 없음

(54) 신규한 만난나제

요약

SEQ ID NO: 2의 위치 31에서 330에 제시된 아미노산 서열 또는 그것의 상동체를 포함하는 본 발명의 신규한 만난나제는 예컨대 바실루스 sp. I633으로부터 유도되거나, 또는 SEQ ID NO:1의 뉴클레오티드 91에서 뉴클레오티드 990의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 31에서 아미노산 잔기 330까지의 아미노산 서열과 최소한 65 % 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 그것의 축퇴성 뉴클레오티드 서열에 의해 코드화될 수 있다. 만난나제는 알칼리성이며, 예컨대 클리닝 조성물에, 지하층의 균열에 유용한 균열 유체에, 식물 물질의 변형에, 및 셀룰로스성 섬유의 처리에 유용하다.

대표도



색인어

만난나제, 바실루스, 폴리뉴클레오티드, 클리닝, 세제

명세서

기술분야

본 발명은 미생물 만난나제, 보다 구체적으로는 중성 및 알칼리성 pH 범위에서 그것들의 주요 효소 활성으로서 만난나제 활성을 나타내는 미생물 효소; 및 그러한 효소를 종이 및 펄프, 섬유, 오일 드릴링(drilling), 클리닝, 세탁, 세제 및 셀룰로스 섬유 가공처리 산업에 사용하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

만난 함유 다당류는 나무 및 많은 콩과 식물 종자의 내배유 및 비-콩과 식물의 성숙한 종자의 헤미셀룰로스 부분의 주요 성분이다. 본질적으로 치환되지 않은 선형 베타-1,4-만난이 일부의 비-콩과 식물에서 발견된다. 예를 들어 상아야자 열매에 존재하는 치환되지 않은 베타-1,4-만난은 개별적인 다당 사슬의 형태로 존재하는 셀룰로스를 닮고 있으며, 물에 녹지 않는다. 콩과식물 종자에서, 수용성 갈락토만난은 총 건조 중량의 20 % 까지를 차지하는 주요 저장 탄수화물이다. 갈락토만난은 단일한 알파-1,6-갈락토스로 치환된, 임의로 아세틸기로 치환된 선형 베타-1,4-만난 골격을 가지고 있다. 만난은 또한 여러 가지의 단자엽 식물에서 발견되며, 팜 카르넬 밀의 세포벽 물질에서 가장 풍부한 다당이다. 글루코만난은 베타-1,4-결합된 만노스와 글루코스가 다소 규칙적인 방식으로 교대로 배열되어 있는 골격을 가지고 있는 선형 다당이며, 상기 골격은 임의로 갈락토스 및/또는 아세틸기로 치환된다. 만난, 갈락토만난, 글루코만난 및 갈락토글루코만난 (즉 분지된 갈락토스를 가지고 있는 글루코만난 골격)은 연질 목재의 헤미셀룰로스의 50 % 이상을 차지한다. 더욱이, 많은 적색 조류 (algae)의 셀룰로스는 상당량의 만노스를 함유하고 있다.

만난나제는 여러개의 바실루스 유기체에서 확인되었다. 예를 들어 탈보트 등 [Talbot et al., Appl. Environ. Microbiol., Vol.56, No.11, pp. 3505-3510 (1990)]은 바실루스 스테아로써모필루스로부터 유도된, 분자량이 162 kDa이고 최적 pH가 5.5 내지 7.5 인 이량체 형태의 베타-만난나제를 설명하였다. 멘도자 등은 분자량이 38 kDa이고, pH 5.0 및 55 ℃에서 최적 활성을 나타내며, pI가 4.8 인, 바실루스 서브틸리스로부터 유도된 베타-만난나제를 설명하였다 [Mendoza et al., World J. Microbiol. Biotech., Vol. 10, No.5, pp. 551-555 (1994)]. JP-A-03047076 에는 겔 여과에 의해 측정되는 바 분자량이 37 ± 3 kDa이고, 최적 pH가 8 내지 10 이며, pI가 5.3 내지 5.4 인, 바실루스 sp.로부터 유도된 베타-만난나제가 개시되어 있다. JP-A-63056289에는 예컨대 만난의 베타-1,4-D-만노피라노시드 결합을 가수분해하여 만노-올리고당을 생성하는 알칼리성, 열안정성 베타-만난나제의 제조가 개시되어 있다. JP-A-63036775는 알칼리성 pH에서 베타-만난나제와 베타-만노시다제를 생성하는 바실루스 미생물 FERM P-8856에 관한 것이다. JP-A-08051975에는 친알칼리성 바실루스 sp. AM-001로부터 유도된, 분자량이 43±3 kDa 및 57±3 kDa이고 최적 pH가 8 내지 10 인 알칼리성 베타-만난나제가 개시되어 있다. 바실루스 아밀로리쿠에파시엔스로부터 정제된 만난나제는 펄프와 종이의 표백에 유용하며, 그것의 제조 방법이 WO 97/11164에 공개되어 있다. WO 91/18974에는 글루카나제, 크실라나제 또는 만난나제와 같은 헤미셀룰라제가 극한 pH 및 온도에서 활성적이라고 기재되어 있다. WO 94/25576에는 식물 또는 조류 (algae) 세포벽 물질의 분해 또는 변형에 유용할 수 있는 만난나제 활성을 나타내는, 아스페르길루스 아큘레아투스, CBS 101.43으로부터 유도되는 효소가 설명되어 있다. WO 93/24622에는 리그노셀룰로스 펄프를 표백하기에 유용한, 트리코더마 레쎄이로부터 단리된 만난나제가 개시되어 있다.

WO 95/35362에는 식물 기원의 얼룩을 제거하기 위하여 펙티나제 및/또는 헤미셀룰라제 및 임의로 셀룰라제 활성을 가지고 있는 식물 세포벽 분해 효소를 함유하고 있는 클리닝 조성물이 개시되어 있으며, 또한

스트레인 C11SB.G17로부터 유도되는 알칼리성 만난나제가 개시되어 있다.

본 발명의 목적은 알칼리성 pH 범위, 예컨대 클리닝 조성물 또는 상이한 산업용 과정에 적용될 때 만난나제 활성을 나타내는 신규하고 효과적인 효소를 제공하는 것이다.

발명의 개요

본 발명자들은 현재 실질적인 만난나제 활성을 가지고 있는 신규한 효소, 즉 바실루스 속의 박테리아 스트레인으로부터 얻어질 수 있는 만난나제 활성을 나타내는 효소들을 발견하였고, 그러한 효소들을 코드화하는 DNA 서열을 확인하는데 성공하였다. DNA 서열은 서열 목록에서 SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 및 31 로서 나열되며; 추론된 아미노산 서열은 서열 목록에 SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 및 32로서 각각 열거된다. 신규한 효소들은 효소 부류 EC 3.2.1.78로 효소 명명법에 따라 분류될 수 있을 것으로 여겨진다.

첫 번째 측면으로, 본 발명은 i) 바실루스 sp. I633에 의해 생성되는 폴리펩티드, ii) SEQ ID NO:2의 위치 31-330에 도시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 iii) 상기 폴리펩티드와 최소한 65 % 상동하고, 하나 또는 둘 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 상기 폴리펩티드로부터 유도되거나 또는 정제된 형태의 상기 폴리펩티드에 대하여 발생된 다클론성 항체와 면역학적으로 반응하는 상기 i) 또는 ii)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체인 만난나제에 관한 것이다.

이 측면에 따르면, 본 발명은 (a) 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하고 SEQ ID NO:1에 도시된 뉴클레오티드 서열을 뉴클레오티드 91부터 뉴클레오티드 990 까지 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; (b) (a)의 종 상동체; (c) SEQ ID NO:2의 아미노산 잔기 31부터 아미노산 잔기 330 까지의 아미노산 서열에 최소한 65 % 동일한 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; (d) (a), (b) 또는 (c)에 상보하는 분자; 및 (e) (a), (b), (c) 또는 (d)의 축퇴성 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 단리된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

본 발명의 만난나제를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자 (DNA 서열)를 포함하고 있는 플라스미드 pBXM3은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그것은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1998년 5월 29일에 기탁번호 DSM 12197 로 기탁되었다.

본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명에는 다음의 작동가능하게 연결되어 있는 엘레먼트들을 포함하고 있는 발현 벡터가 제공된다: 전사 프로모터; (a) 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하고 SEQ ID NO:1에 도시된 뉴클레오티드 서열을 뉴클레오티드 91부터 뉴클레오티드 990 까지 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; (b) (a)의 종 상동체; (c) SEQ ID NO:2의 아미노산 잔기 31부터 아미노산 잔기 330 까지의 아미노산 서열에 최소한 65 % 동일한 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 (d) (a), (b) 또는 (c)의 축퇴성 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 DNA 절편; 및 전사 터미네이터.

본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명에는 상기에서 설명된 발현 벡터가 도입되는 배양된 세포가 제공되며, 이 세포는 DNA 절편에 의하여 코드된 폴리펩티드를 발현한다.

본 발명의 추가의 측면은 (a) SEQ ID NO:2의 아미노산 잔기 31부터 아미노산 잔기 330 까지의 아미노산 잔기 서열을 포함하는 폴리펩티드 분자; (b) (a)의 종 상동체; 및 (c) 만난나제 활성을 나타내는 첫 번째 폴리펩티드 부분과 셀룰로스 결합 기능을 나타내는 두 번째 폴리펩티드 부분을 포함하며, 두 번째 폴리펩티드는 바람직하게도 셀룰로스 결합 도메인 (CBD)인 만난나제 활성을 가지고 있는 융합 단백질, 예컨대 SEQ ID NO:4 에 의해 표시되는 융합 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택된, 만난나제 활성을 가지고 있는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명에는 본 발명에 따르는 정제된 폴리펩티드와 다른 폴리펩티드들과의 조합을 포함하는 조성물이 제공된다.

본 발명의 또 다른 측면으로는, 상기에서 설명된 것과 같은 발현 벡터가 도입된 세포를 배양하고, 그로써 상기 세포가 DNA 절편에 의해 코드화된 폴리펩티드를 발현하는 단계와, 그 폴리펩티드를 회수하는 단계로 이루어지는, 본 발명에 따르는 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공된다.

본 발명의 신규한 효소는 셀룰로스성 물질, 특히, 셀룰로스-함유 섬유, 실, 제직된 또는 부직 직물의 처리, 기계식 종이 제조 펄프, 크래프트 펄프 또는 재순환된 폐지의 처리, 및 섬유의 침수과정에 유용하다. 처리는 셀룰로스성 물질의 종이 제조를 위해 또는 예컨대 디사이징 또는 연마 단계에서 의류 또는 직물의 제조를 위해 준비된 물질로의 가공처리중에; 또는 그러한 직물 또는 의류의 산업용 또는 가정용 세탁중에 수행될 수 있다.

따라서 본 발명은 추가의 측면으로, 본 발명의 효소를 포함하는 클리닝 또는 세제 조성물; 및 본 발명의 효소를 예컨대 셀룰로스-함유 섬유, 실, 제직된 또는 부직 직물, 및 합성 또는 부분 합성 직물의 클리닝과 같은 처리에 사용하는 것에 관한 것이다.

본 발명의 효소는 효소적 연마 과정 및/또는 셀룰로스성 물질의 제조에, 예컨대 후속되는 염색 조작에서의 적절한 반응을 위한 디사이징 (만난 크기의 제거)에 유용하다. 효소는 또한 만난을 함유하고 있는 프린트 페이스트의 제거에도 유용하다. 나아가, 신규 효소를 포함하고 있는 세제 조성물은 세탁물에 존재하는 특정 오염 또는 얼룩, 특히 만난 함유 식품, 식물 등으로부터 묻은 얼룩 및 반점을 제거 또는 표백할 수 있다. 또한, 신규한 효소를 포함하고 있는 클리닝 또는 세제 조성물을 사용한 처리는 특정 얼룩이 셀룰로스성 물질에 결합하는 것을 방지할 뿐만 아니라 순백도를 개선시킬 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한 세탁, 접시세척, 경질 포면 클리너, 개인용 세정 및 구강용/치아용 조성물을 포함한, 본 발명의 만난나제를 포함하는 클리닝 조성물에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 만난나제와, 셀룰라제, 프로테아제, 리파제, 아밀라제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로부터 선택된 효소를 포함하는 클리닝 조성물에 관한 것으로, 그러한 조성물은 월등한 클리닝 성능, 즉 월등한 얼룩 제거, 더러움

세정 또는 순백도 유지와 같은 성능을 제공한다.

정의

본 발명을 상세하게 논의하기에 앞서, 다음의 용어들을 먼저 규정하기로 한다.

용어 "오르토로그 (또는 종 상동체)" 는 상이한 종으로부터 얻어지는 유사한 폴리펩티드 또는 단백질에 대하여 상동성을 가지고 있는 한 종으로부터 얻어지는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다.

용어 "파라로그" 는 동일한 종으로부터 얻어지는 구별되는 폴리펩티드 또는 단백질에 대해 상동성을 가지고 있는 주어진 종으로부터 얻어지는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다.

용어 "발현 벡터" 는 그것의 전사를 제공하는 추가의 절편에 작동가능하게 연결되어 있는 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 절편을 포함하고 있는 선형 또는 원형의 DNA 분자를 나타낸다. 그러한 추가의 절편으로는 프로모터 및 터미네이터 서열이 있으며, 임의로 하나 또는 둘 이상의 복제 기원, 하나 또는 둘 이상의 선택가능한 마아커, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 등을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA 로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 엘레먼트를 함유할 수 있다. 본 발명의 발현 벡터는 재조합 DNA 과정을 편리하게 수행받을 수 있는 것이면 어떠한 발현 벡터도 될 수 있으며, 선택된 벡터는 때로 그 안에 벡터가 도입될 숙주 세포에 따라 좌우될 것이다. 그러므로, 벡터는 자동적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체외에 존재하는 벡터일 수 있고, 그것의 복제가 염색체와는 무관한 것, 예컨대 플라스미드이다. 또는 달리, 벡터는 숙주 세포에 도입되었을 때, 숙주 세포 게놈안에 통합되어 그것이 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

용어 "재조합 발현된" 또는 "재조합적으로 발현된" 은 폴리펩티드 또는 단백질의 발현과 관련하여 당해 기술분야에 공지된 표준 정의에 따라 규정된다. 단백질의 재조합적인 발현은 일반적으로 바로 전술된 바와 같은 발현 벡터를 사용함으로써 수행된다.

용어 "단리된" 은 폴리뉴클레오티드 분자에 적용되었을 때에는, 폴리뉴클레오티드가 그것의 천연적인 유전자 환경으로부터 제거되었고, 따라서 다른 외래성 또는 원하지 않는 코딩 서열이 없으며, 유전공학적으로 처리된 단백질 제조 시스템내에서 사용하기에 적당한 형태인 것을 말한다. 그러한 단리된 분자들은 그것들의 천연 환경으로부터 단리되는 것들이며 cDNA 및 게놈 클론이 포함된다. 본 발명의 단리된 DNA 분자는 그것들이 원래 결합되었던 다른 유전자들이 없지만, 자연적으로 발생하는 5' 및 3' 미번역 영역, 예컨대 프로모터 및 터미네이터를 포함할 수 있다. 결합된 영역의 확인은 당업자에게는 명백할 것이다 (Dynan and Tijan, Nature 316:774-778, 1985). 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드" 는 다르게는 "클론된 폴리뉴클레오티드" 로 사용될 수도 있다.

단백질/폴리펩티드에 적용되었을 때 용어 "단리된" 은 그것의 천연 환경 이외의 조건에서 단백질이 발견되는 것을 가리킨다. 바람직한 형태에서, 단리된 단백질은 실질적으로는 다른 단백질, 특히 다른 상동하는 단백질 (즉 "동종성 불순물")이 없다. 단백질은 40 % 이상 순수한 형태로, 보다 바람직하게는 60 % 이상 순수한 형태로 제공되는 것이 바람직하다.

보다 바람직하게는, 단백질은 고도로 정제된 형태로, 즉 SDS-PAGE 에 의해 측정되는 바, 80 % 이상 순수한 형태로, 보다 바람직하게는 95 % 이상 순수한 형태로, 가장 바람직하게는 99 % 이상 순수한 형태로 제공되는 것이 바람직하다.

용어 "단리된 단백질/폴리펩티드" 는 용어 "정제된 단백질/폴리펩티드" 로도 교체 사용될 수 있다.

용어 "동종성 불순물" 은 본 발명의 폴리펩티드가 원래 기원하는 동종성 세포로부터 기원하는 어떠한 불순물 (예컨대 본 발명의 폴리펩티드 이외의 다른 폴리펩티드)을 의미한다.

용어 "으로부터 얻어진" 은 특정 미생물 공급원과 관련하여 사용되는 바, 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드가 특정 공급원에 의해 (동종성 발현), 또는 공급원으로부터의 유전자가 삽입되어 있는 세포에 의해 (이종성 발현) 생성되는 것을 의미한다.

용어 "작동가능하게 연결된" 은 DNA 절편을 언급할 때, 절편들이 그것들의 의도된 목적을 위해 조화롭게 기능하도록, 예컨대 전사가 프로모터에서 개시되고, 코딩 서열을 통하여 터미네이터까지 진행되도록 배열되는 것을 나타낸다.

용어 "폴리뉴클레오티드" 는 5' 단부에서 3' 단부쪽으로 판독되는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 염기의 단일- 또는 이중-가닥 중합체를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드는 RNA 및 DNA 를 포함하며, 천연 공급원으로부터 단리될 수 있고, 시험관내에서 합성될 수도 있으며, 천연 및 합성 분자의 조합으로부터 제조될 수도 있다.

용어 "폴리뉴클레오티드 분자의 상보물" 은 상보하는 염기 서열 및 참조 서열과 비교하여 역 배향을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드 분자를 나타낸다. 예를 들어, 서열 5' ATGCACGGG 3' 은 5' CCCGTGCAT 3' 에 상보한다.

용어 "축퇴성 뉴클레오티드 서열" 은 (폴리펩티드를 코드화하는 참조용 폴리뉴클레오티드 분자와 비교하여) 하나 또는 둘 이상의 축퇴성 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 축퇴성 코돈은 뉴클레오티드의 상이한 트리플렛을 함유하지만, 동일한 아미노산 잔기를 코드화한다 (즉 GAU 와 GAC 트리플렛은 각각 Asp 를 코드화한다).

용어 "프로모터" 는 RNA 중합효소의 결합 및 전사의 개시를 제공하는 DNA 서열을 함유하고 있는 유전자 부분을 나타낸다. 프로모터 서열은 반드시 그런 것은 아니지만 통상적으로 유전자의 5' 비-코딩 영역에서 발견된다.

용어 "분비 신호 서열" 은 보다 큰 폴리펩티드의 성분으로서, 그것이 합성되는 세포의 분비 경로를 통하여 보다 큰 폴리펩티드를 지정하는 폴리펩티드 ("분비 펩티드")를 코드화하는 DNA 서열을 의미한다. 보다 큰 펩티드는 통상 일시적으로 분비 경로를 통과하는 중에 분비 펩티드가 제거되도록 절단된다.

용어 "효소 코아"는 변형 또는 변경될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는, 그러나 그것의 원래 활성을 보유하고 있는 단일한 도메인 효소를 나타낸다; 당해 기술분야에 공지되어 있는 것과 같은 촉매적 도메인은 무상 및 기능적인 채로 남아있다.

용어 "링커" 또는 "스페이서"는 다중 도메인 단백질, 예를 들면 효소 코아와 셀룰로스 결합 도메인 (CBD) 또는 어떠한 다른 효소 혼성체와 같은 결합 도메인을 포함하고 있는 효소의 도메인들 사이에, 또는 두 개의 단백질 또는 융합 폴리펩티드로서 발현된 폴리펩티드, 예를 들면 두 개의 코아 효소를 포함하고 있는 융합 단백질사이에 존재할 수 있는 최소한 두 개의 아미노산을 포함하고 있는 폴리펩티드를 의미한다. 예를 들어, CBD를 가지고 있는 효소 코아의 융합 단백질은 효소 코아를 코드화하는 DNA 서열, 링커를 코드화하는 DNA 서열 및 CBD를 코드화하는 DNA 서열을 차례로 하나의 오픈 리딩 프레임내에 융합시키고, 이 구성물을 발현시킴으로써 얻어진다.

용어 "만난나제" 또는 "갈락토만난나제"는 당업계에서 공식적으로는 만난 엔도-1,4-베타-만노시다제로 규정되고, 베타-만난나제 및 엔도-1,4-만난나제라는 다른 이름을 가지고 있는 만난나제 효소를 가리키며, 만난, 갈락토만난, 글루코만난, 및 갈락토글루코만난의 1,4-베타-D-만노시드 결합의 가수분해를 촉매하며, 이 효소는 효소 명명법에 따라 EC 3.2.1.78 로 분류된다 (http://www.expasy.ch/enzyme).

발명의 상세한 설명

다른 관련 서열을 얻기 위하여 본 발명의 서열을 사용하는 방법: 본 발명의 만난나제를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 관련하여 본원에 개시된 서열 정보는 다른 상동성 만난나제를 확인하기 위한 도구로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)이 다양한 미생물 공급원, 특히 상이한 바실루스 종으로부터 다른 상동성 만난나제를 코드화하는 서열을 증폭시키기 위하여 사용될 수 있다.

활성 시험을 위한 검정

만난나제 활성을 가지고 있는 본 발명의 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있는 표준 시험 과정에 따라, 예컨대 시험하고자 하는 용액을 0.2 % 의 AZCL 갈락토만난 (carob), 즉 메가자임 (Megazyme)사 (Megazyme 사의 인터넷 주소: http://www.megazyme.com/Purchase/index.html)로부터 CatNo.I-AZGMA로 구입할 수 있는 엔도-1,4-베타-D-만난나제의 검정용 기질을 함유하고 있는 아가 플레이트에 천공되어 있는 4 mm 직경의 구멍에 적용됨으로써 만난나제 활성에 대해 시험될 수 있다.

폴리뉴클레오티드

본 발명의 바람직한 구체예내에서 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:1 의 유사한 크기의 영역, 또는 그것에 상보하는 서열에, 최소한 중간의 엄격한 조건하에서 혼성화할 것이다.

발명의 특별한 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:1에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드하는 절편인 SEQ ID NO:1의 위치 91에서 990 까지의 절편을 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간 정도의 엄격한 조건에서, 그러나 바람직하게는 하기에서 상세하게 설명되는 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지는 하위서열인 SEQ ID NO:1의 위치 91에서 990까지의 하위서열을 포함하는 어떠한 프로브에 혼성화할 것이다. 엄격도가 중간, 또는 높은 조건에서 뉴클레오티드 프로브와 상동하는 DNA 또는 RNA 사이의 혼성화를 측정하기에 적절한 실험 조건은 DNA 단편 또는 RNA를 함유하고 있는 필터를 5×SSC (염화 나트륨/시트르산 나트륨, Sambrook et al., 1989)에 10 분동안 혼성화를 위하여 예비침지하고, 5×SSC, 5× 덴하르드트 용액 (Sambrook et al., 1989), 0.5 % SDS 및 100 ㎍/ml의 변성되고 초음파처리된 연어 정자 DNA (Sambrook et al., 1989)의 용액중에서 필터를 예비혼성화한 후, 10 ng/ml의 무작위-프라임된 (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132:6-13), 32P-dCTP-표지된 (비활성이 1×10^9 cpm/㎍보다 더 큼)프로브가 함유되어 있는 동일한 용액중에서 12 시간동안 45 ℃에서 혼성화하는 것을 포함한다. 그런 다음 필터는 30 분동안 2×SSC, 0.5 % 의 SDS 중에서 최소한 60 ℃ (엄격도 중간)에서, 바람직하게는 최소한 65 ℃ (중간/높은 엄격도)에서, 더 바람직하게는 최소한 70 ℃ (높은 엄격도)에서, 가장 바람직하게는 최소한 75 ℃ (매우 높은 엄격도)에서 두 번 세척된다.

이들 조건하에서 올리고뉴클레오티드 프로브에 혼성화하는 분자들은 X-선 필름을 사용하여 검출된다.

다른 유용한 단리된 폴리뉴클레오티드들은 SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29 또는 SEQ ID NO:31의 각각의 유사한 크기의 영역에, 또는 그것에 상보하는 서열에, 최소한 중간의 엄격한 조건하에서 혼성화할 것들이다.

특히 유용한 것은 SEQ ID NO:5에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:5 의 위치 94에서 1032 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:5의 위치 94 에서 1032 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:9에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:9 의 위치 94에서 1086 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:9의 위치 94 에서 1086 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:11에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:11 의 위치 97에서 993 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를

가지고 있는 SEQ ID NO:11의 위치 97 에서 993 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:13에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:13 의 위치 498에서 1464 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:13의 위치 498 에서 1464 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:15에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:15 의 위치 204에서 1107 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:15의 위치 204 에서 1107 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:17에 도시된 서열을 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:17 의 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:19에 도시된 서열을 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:19 의 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:21에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:21 의 위치 88에서 960 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:21의 위치 88 에서 960 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:23에 도시된 서열을 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:23 의 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:25에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:25 의 위치 904에서 1874 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:25의 위치 904 에서 1874 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:27에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:27 의 위치 498에서 1488 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:27 의 위치 498 에서 1488 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:29에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:29 의 위치 79에서 1083 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:29의 위치 79 에서 1083 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드; SEQ ID NO:31에 도시된 전체 서열 또는 본 발명의 만난나제의 촉매적으로 활성을 나타내는 도메인 또는 효소 코아를 코드화하는 절편인 SEQ ID NO:31 의 위치 1779에서 2709 까지의 절편을 포함하고 있는 부분 서열중 하나를 포함하고 있는 변성된 이중-가닥의 DNA 프로브, 또는 최소한 중간의 엄격한 조건하에서, 그러나 바람직하게는 상기에서 상세하게 설명된 바와 같이 엄격도가 높은 조건에서 최소한 약 100 염기쌍의 길이를 가지고 있는 SEQ ID NO:31의 위치 1779 에서 2709 까지에 도시된 하위서열을 포함하고 있는 어떠한 프로브에 혼성화할 폴리뉴클레오티드이다.

앞서 주지된 바와 같이, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드는 DNA 및 RNA를 포함한다. DNA 및 RNA를 단리하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 관심의 유전자를 코드화하는 DNA 및 RNA는 당업계에 공지되어 있는 방법에 의하여 Gene Bank 또는 DNA 라이브러리에서 클론될 수 있다.

그런 다음 본 발명의 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드가 확인되고, 예컨대 혼성화 또는 PCR에 의하여 단리된다.

본 발명은 또한 상이한 박테리아 스트레인으로부터 유도되는 대응 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 (오르토로그 또는 파라로그)를 제공한다. 그 중에서도 특히 관심의 대상이 되는 것은 그람-포지티브 친알칼리성 스트레인, 예를 들면 바실루스 sp., 바실루스 아가라드해렌스, 바실루스 할로듀란스, 바실루스 클라우시이 및 바실루스 리케니포르미스와 같은 바실루스 종으로부터 얻어지는 만난나제 폴리펩티드; 및 칼디셀룰로시룹터의 종을 포함하여 써모안에어로박터 군으로부터 얻어지는 만난나제 폴리펩티드이다. 또한 진균류인 휴미콜라 또는 시탈리듐, 특히 휴미콜라 인솔렌스 또는 시탈리듐 써모필룸으로부터 유도되는 만난나제 폴리펩티드가 관심의 대상이다.

본 발명의 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드의 종 상동체는 본 발명에 의해 제공되는 정보 및 조성을 종래의 클로닝 기법과 조합 사용함으로써 클론될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 DNA 서열은 단백질을 발현하는 세포 타입으로부터 얻어진 염색체 DNA를 사용하여 클론될 수 있다. DNA의 적당한 공급원은 노던 또는 서던 블롯을 본원에 개시된 서열로부터 디자인된 프로브로 프로빙함으로써 확인될 수 있다. 그런 다음 라이브러리가 포지티브 셀라인의 염색체 DNA로부터 제조된다. 그런 다음 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 본 발명의 DNA 서열이 다양한 방법에 의해, 예를 들면 본 명세서 및 청구범위에서 개시된 서열로부터 디자인된 프로브로 또는 개시된 서열을 토대로 한 축퇴성 프로브의 하나 또는 둘 이상의 세트로 프로브함으로써 단리될 수 있다. 본 발명의 DNA 서열은 또한 중합효소 연쇄 반응,

또는 PCR (Mullis, 미국 특허 제 4,683,202 호)을 사용하여, 본원에 개시된 서열로부터 디자인된 프라이머들을 사용하여 클론될 수 있다. 추가의 방법으로, DNA 라이브러리가 숙주 세포의 형질전환을 위하여 사용될 수 있고, 관심의 DNA의 발현은 하기의 재료 및 방법 단원과 실시예 1에서 설명된 바와 같이 발현되고 정제된, 바실루스 sp.로부터 클론된 만난나제에 대하여 발생된 항체 (단클론성 또는 다클론성)를 사용하여, 또는 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드에 관련된 활성 시험에 의하여 검출될 수 있다.

대장균 DSM 12197에 존재하는 플라스미드 pBXM3안에 클론된 DNA 서열 (SEQ ID NO:1)의 만난나제 코드화 부분 및/또는 본 발명의 유사한 DNA는 박테리아 종 바실루스 sp. I633의 스트레인, 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체 스트레인으로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:5의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1998년 5월 18일에 기탁번호 DSM 12180 으로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:5 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 아가라드해렌스의 스트레인으로부터, 예를 들면 타입 스트레인 DSM 8721로부터, 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:9의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1998년 10월 7일에 기탁번호 DSM 12433 으로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:9 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp. AAI12의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:11의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1998년 10월 9일에 기탁번호 DSM 12441로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:11 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 할로듀란스의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:13의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1995년 5월 11일에 기탁번호 DSM 9984로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:13 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 진균 종 휴미콜라 인솔렌스의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:15의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1998년 10월 5일에 기탁번호 DSM 12432로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:15 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp. AA349의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:17의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12847로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:17 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp.의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:19의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12848로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:19 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp.의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:21의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12849로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:21 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 클라우시이의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:23의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조

약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12850 으로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:23 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp.의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:25의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12846으로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:25 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp.의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:27의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12851로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:27 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 sp.의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:29의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1999년 6월 4일에 기탁번호 DSM 12852로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:29 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 바실루스 리케니포르미스의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:31의 DNA 서열)의 만난나제 코드화 부분은 대장균 스트레인안에 형질전환되었고, 그 대장균은 특허상의 절차를 목적으로 하는 미생물 기탁의 국제 협약에 따른 부다페스트 조약에 따라 본 발명자들에 의해 독일 D-38124 브라운쉬바이크 마쉐로더 베그 1b 도이췌 잠룽 폰 미크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하에 1998년 10월 5일에 기탁번호 DSM 12436 으로 기탁되었다; 폴리뉴클레오티드 분자 (SEQ ID NO:31 의 DNA 서열)의 이 만난나제 코드화 부분 및/또는 그것의 유사한 DNA 서열은 박테리아 종 칼디셀룰로시룹터 sp.의 스트레인으로부터 또는 본원에서 기술되는 다른 또는 관련된 유기체로부터 클론될 수 있다.

또는 달리, 유사한 서열은 대장균 DSM 12197에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:1 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12180에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:5 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12433에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:9 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12441에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:11 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 9984에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:13 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12432에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:15 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12847에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:17 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12848에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:19 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12849에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:21 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12850에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:23 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12846에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:25 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12851에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:27 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 대장균 DSM 12852에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:29 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열, 또는 대장균 DSM 12436에 존재하는 플라스미드 (첨부되는 SEQ ID NO:31 에 동일한 것으로 여겨짐)로부터 얻을 수 있는 DNA 서열을 토대로 하여 구성될 수 있으며, 예컨대 그것의 하위서열일 수 있고, 및/또는 DNA 서열에 의하여 코드화된 만난나제의 다른 아미노산 서열을 발생시키지는 않지만, 효소의 생성을 위해 의도된 숙주 유기체의 코돈 용도에 상응하는 뉴클레오티드 치환의 도입에 의해, 또는 상이한 아미노산 서열 (즉 본 발명의 만난 분해 효소의 변이체)을 발생시킬 수 있는 뉴클레오티드 치환의 도입에 의하여 구성될 수도 있다.

폴리펩티드

SEQ ID NO:2의 위치 31에서 490까지의 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:2의 아미노산 번호 1에서 30까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:2의 위치 31에서 330까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 331부터 342에 링커를 포함하고 위치 343부터 490에 기능이 알려져 있지 않은 최소한 하나의 C-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:2의 아미노산 번호 31에서 330 까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다. SEQ ID NO:2의 아미노산 번호 343부터 490까지의 하위서열을 가지고 있는 도메인은 기능이 미지인 만난나제 효소의 도메인이며, 이 도메인은 공지의 만난나제의 유사한 도메인과 매우 상동적이다 (실시예 1 참조).

SEQ ID NO:6의 위치 32에서 494에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:6의 아미노산 번호 1에서 31까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:6의 위치 32에서 344까지에 있는 아미노산

하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 345부터 494에 기능이 알려져 있지 않은 최소한 하나의 C-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:6의 아미노산 번호 32에서 344 까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:10의 위치 32에서 586에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:10의 아미노산 번호 1에서 31까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:10의 위치 32에서 362까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 363부터 586에 기능이 알려져 있지 않은 최소한 하나의 C-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:10의 아미노산 번호 32에서 362까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:12의 위치 33에서 331에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:12의 아미노산 번호 1에서 312까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:12의 위치 33에서 331까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인인 것으로 여겨진다. SEQ ID NO:12 의 아미노산 번호 33에서 331까지의 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 이 만난나제 효소 코아는 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인, 즉 융합 단백질의 부분이 되는 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결될 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다.

SEQ ID NO:14의 위치 22에서 488에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:14의 아미노산 번호 1에서 21까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:14의 위치 166에서 488까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 22부터 164에 기능이 알려져 있지 않은 최소한 하나의 N-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:14의 아미노산 번호 166에서 488까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:16의 위치 26에서 369에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:16의 아미노산 번호 1에서 25까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:16의 위치 68에서 369까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 26부터 67에 기능이 알려져 있지 않은 최소한 하나의 N-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:16의 아미노산 번호 68에서 369까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:18의 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열의 부분을 형성하는 부분 서열이다. 본 발명은 SEQ ID NO:18의 아미노산 번호 1부터 305의 서열을 포함하는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:20의 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열의 일부를 형성하는 부분 서열이다. 본 발명은 SEQ ID NO:20의 아미노산 번호 1부터 132의 서열을 포함하는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:22의 위치 29에서 320에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:22의 아미노산 번호 1에서 28까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:22의 위치 29에서 320까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인인 것으로 여겨진다. SEQ ID NO:22 의 아미노산 번호 29에서 320까지의 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 이 만난나제 효소 코아는 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인, 즉 융합 단백질의 부분이 되는 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결될 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다.

SEQ ID NO:24의 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열의 일부를 형성하는 부분 서열이다. 본 발명은 SEQ ID NO:24의 아미노산 번호 29부터 188의 서열을 포함하는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:26의 위치 30에서 815에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:26의 아미노산 번호 1에서 29까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:26의 위치 301에서 625까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 44부터 166 및 195부터 300에 각각 기능이 알려져 있지 않은 최소한 두개의 N-말단 도메인과, 위치 626부터 815에 기능이 알려져 있지 않은 C-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:26의 아미노산 번호 301에서 625까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:28의 위치 38에서 496에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:28의 아미노산 번호 1에서 37까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:28의 위치 166에서 496까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 38부터 165에 기능이 알려져 있지 않은 최소한 하나의 N-말단 도메인을 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:28의 아미노산 번호 166에서 496까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

SEQ ID NO:30의 위치 26에서 361에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:30의 아미노산 번호 1에서 25까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:30의 위치 26에서 361까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인인 것으로 여겨진다. SEQ ID NO:30의 아미노산 번호 26에서 361까지의 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 이 만난나제 효소 코아는 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결될 수도 또는 그렇지 않을 수도 있다.

SEQ ID NO:32의 위치 23에서 903에 있는 아미노산 서열은 성숙한 만난나제 서열이다. SEQ ID NO:32의 아미노산 번호 1에서 22까지의 서열은 신호 펩티드이다. SEQ ID NO:32의 위치 593에서 903까지에 있는 아미노산 하위서열은 만난나제 효소의 촉매활성 도메인이며 성숙한 효소는 추가적으로 위치 23부터 214, 224부터 424 및 434부터 592에 각각 기능이 알려져 있지 않은 N-말단 도메인을 최소한 세 개 포함하고 있는 것으로 여겨진다. 본 발명의 목적이 만난나제 활성을 나타내는 폴리펩티드를 얻는 것이기 때문에, 본 발명은 하나 또는 둘 또는 그 이상의 상이한 기능성을 나타내는 다른 도메인에 N-말단쪽으로 또는 C-말단쪽으로 임의로 작동가능하게 연결되어 있는, SEQ ID NO:32의 아미노산 번호 593에서 903까지의 아미노산 서열, 즉 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 어떠한 만난나제 효소에 관한 것이다.

본 발명은 또한 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ IDNO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30 및 SEQ ID NO:32 각각의 폴리펩티드, 및 그것의 종 상동체 (파라로그 또는 오르토로그)에 실질적으로 상동하는 만난나제 폴리펩티드를 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로 상동하는"은 SEQ ID NO:2의 아미노산 번호 33에서 340 또는 33에서 490에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:6의 아미노산 번호 32에서 344 또는 32에서 494에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:10의 아미노산 번호 32에서 362 또는 32에서 586에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:12의 아미노산 번호 33에서 331에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 번호 166에서 488 또는 22에서 488에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:16의 아미노산 번호 68에서 369 또는 32에서 369에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:18의 아미노산 번호 1에서 305에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:20의 아미노산 번호 1에서 132에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:22의 아미노산 번호 29에서 320에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:24의 아미노산 번호 29에서 188에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:26의 아미노산 번호 301에서 625 또는 30에서 625에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:28의 아미노산 번호 166에서 496 또는 38에서 496에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:30의 아미노산 번호 26에서 361에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:32의 아미노산 번호 593에서 903 또는 23에서 903에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그에 대하여 65 %, 바람직하게는 최소한 70 %, 보다 바람직하게는 최소한 75 %, 보다 더 바람직하게는 최소한 80 %, 보다 더 바람직하게는 최소한 85 %, 한층 더 바람직하게는 최소한 90 %의 서열 동일성을 가지는 폴리펩티드를 의미한다.

그러한 폴리펩티드들은 보다 더 바람직하게는 SEQ ID NO:2의 아미노산 번호 31에서 330 또는 31에서 490에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:6의 아미노산 번호 32에서 344 또는 32에서 494에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:10의 아미노산 번호 32에서 362 또는 32에서 586에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:12의 아미노산 번호 33에서 331에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:14의 아미노산 번호 166에서 488 또는 22에서 488에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:16의 아미노산 번호 68에서 369 또는 32에서 369에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:18의 아미노산 번호 1에서 305에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:20의 아미노산 번호 1에서 132에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:22의 아미노산 번호 29에서 320에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:24의 아미노산 번호 29에서 188에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:26의 아미노산 번호 301에서 625 또는 30에서 625에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:28의 아미노산 번호 166에서 496 또는 38에서 496에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:30의 아미노산 번호 26에서 361에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그; 또는 SEQ ID NO:32의 아미노산 번호 593에서 903 또는 23에서 903에 도시된 서열 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그에 대하여 최소한 95 %, 가장 바람직하게는 98 % 이상 동일할 것이다.

% 서열 동일성은 문헌에서 설명된 바와 같이 [Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453], GCG 프로그램 팩키지에서 제공된 GAP (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)와 같은 당업계에 공지되어 있는 컴퓨터 프로그램에 의하여 종래 방법으로 측정된다. GAP은 폴리펩티드 서열 비교를 위하여 다음의 세팅으로 사용된다: 3.0의 GAP 크리에이션 페널티 및 0.1의 GAP 익스텐젼 페널티.

폴리뉴클레오티드 분자의 서열 동일성은 DNA 서열 비교를 위한 다음의 세팅을 사용한 GAP을 사용하는 유사한 방법에 의하여 측정된다: 5.0의 GAP 크리에이션 페널티 및 0.3의 GAP 익스텐젼 페널티.

본 발명의 효소 제제는 바람직하게는 미생물로부터, 바람직하게는 박테리아, 아르치아 (archea) 또는 진균으로부터, 특히 바실루스, 바람직하게는 바실루스 sp.종과, 배열된 16S rDNA 서열을 토대로 하여 바실루스 sp. I633, 바실루스 할로듀란스 또는 바실루스 sp. AAI12에 대하여 모든 종이 바람직하게는 최소한 95 %, 보다 바람직하게는 최소한 98 % 상동하는 매우 관련된 바실루스 종들로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있는 바실루스 스트레인에 속하는 박테리아와 같은 박테리아로부터 유도된다.

이들 종은 RDP (리보좀성 데이터베이스 프로젝트)로부터 얻어지는 배열된 16S rDNA 서열로부터 확인된 계

통발생 관계를 토대로 주장된다 [Bonne L. Maidak, Neils Larson, Michael J. McCaughey, Ross Overbeek, Gary J. Olsen, Karl Fogel, James Blandy, and Carl R. Woese, Nucleic Acids Resesrch, 1994, Vol. 22, No.17, p.3485-3487, The Ribosomal Database Project]. 배열은 이차 구조를 토대로 하였다. 서열 유사성의 계산은 ARB 프로그램 팩키지에 통합된 인접한 결합 방법의 잘못된 세팅을 포함한 "전체 매트릭스 계산 (Full matrix calculation)"을 사용하여 수립되었다 (Oliver Strunk and Wolfgang Ludwig, Technical University of Munich, Germany).

하기 표 II로부터 유도된 정보는 바실루스 sp. I633에 대하여 93 % 이상 상동하는 모든 종이 청구되는 고도로 관련된 바실루스 종으로부터 유도되는 패밀리 5의 모든 만난나제에 대한 청구의 토대가 된다. 이들 종은 다음과 같다: 바실루스 스포로써모듀란스, 바실루스 알칼로필루스, 바실루스 슈도알칼로필루스 및 바실루스 클라우시이. (도 1 참조): 계통발생 나무는 바실루스 sp. I633과 가까운 종에 관한 ARP 프로그램으로부터 생성되었다. 16S RNA는 SEQ ID NO:33에 도시된다.

[표 II]

선택된 바실루스 종에 대한 16S 리보좀 RNA 상동성 지수

	BaiSpor2	BaiAlcal	BaiSpec3	BaiSpec5	B.sp.I633
BaiSpor2		92.75 %	92.98 %	92.41 %	93.43 %
BaiAlcal			98.11 %	94.69 %	97.03 %
BaiSpec3				94.49 %	96.39 %
BaiSpec5					93.67 %
BaiSpor2 = B. 스포로써모듀란스, u49079					
BaiAlcal = B. B. 알칼로필루스, x76436					
BaiSpec3 = B. 슈도알칼로필루스, x76449					
BaiSpec5 = B. 클라우시이, x76440					

다른 유용한 패밀리 5 의 만난나제는 배열된 16S 서열을 토대로 모든 종이 바실루스 할로듀란스에 대하여 93 % 이상의 상동성을 나타내는 고도로 관련된 바실루스 종으로부터 유도되는 것들이다. 그러한 바실루스 종은 다음과 같다: 스포로락토바실루스 라에비스, 바실루스 아가라드해렌스 및 마리노코쿠스 할로필루스. (도 2 참조): 계통발생 나무는 바실루스 할로듀란스와 가까운 종들과 관련된 ARP 프로그램으로부터 생성되었다.

[표 III]

선택된 바실루스 종에 대한 16S 리보좀 RNA 상동성 지수

	SplLaev3	BaiSpec6	BaiSpe11	MaoHalo2	NN
SplLaev3		90.98 %	87.96 %	85.94 %	91.32 %
BaiSpec6			91.63 %	87.96 %	99.46 %
BaiSpe11				89.04 %	92.04 %
MaoHalo2					88.17 %
NN					
SplLaev3 = 스포로락토바실루스 라에비스, D16287					
BaiSpec6 = B. 할로듀란스, X76442					
BaiSpe11 = B. 아가라드해렌스, X76445					
MaoHalo2 = 마리노코쿠스 할로필루스, X62171					
NN = 본 발명의 공여 유기체 (B. 할로듀란스)					

다른 유용한 패밀리 5 만난나제는 종 바실루스 아가라드해렌스와, 배열된 16S rDNA 서열을 토대로, 바실루스 아가라드해렌스, DSM 8721에 대하여 모든 종이 바람직하게는 최소한 95 %, 보다 바람직하게는 최소한 98 % 상동하는 고도로 관련된 바실루스 종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 스트레인으로부터 유도되는 것들이다.

유용한 패밀리 26 만난나제는 예를 들면 모든 종이 바실루스 sp. AAI12 에 대하여 93 % 이상 상동하는 고도로 관련된 바실루스 종으로부터 유도되는 것들이다. 그러한 것으로는 다음과 같다: 바실루스 스포로써모듀란스, 바실루스 알칼로필루스, 바실루스 슈도알칼로필루스 및 바실루스 클라우시이. (도 3 참조): 계통발생 나무는 바실루스 sp. AAI12와 가까운 종들에 관한 ARP 프로그램으로부터 생성되었다. 16S RNA 는 SEQ ID NO:34에 도시된다.

[표 IV]

선택된 바실루스 종에 대한 16S 리보좀 RNA 상동성 지수

	BaiSpor2	BaiAlcal	BaiSpec3	BaiSpec5	B.sp.AAI12
BaiSpor2		92.75 %	92.98 %	92.41 %	92.24 %

BaiAlcal			98.11 %	94.69 %	97.28 %
BaiSpec3				94.49 %	96.10 %
BaiSpec5					93.83 %
BaiSpor2 = B. 스포로써모듀란스, u49079					
BaiAlcal = B. B. 알칼로필루스, x76436					
BaiSpec3 = B. 슈도알칼로필루스, x76449					
BaiSpec5 = B. 클라우시이, x76440					

다른 유용한 패밀리 26 만난나제는 종 바실루스 리케니포르미스와, 배열된 16S rDNA 서열을 토대로, 바실루스 리케니포르미스에 대하여 모든 종이 바람직하게는 최소한 95 %, 보다 바람직하게는 최소한 98 % 상동하는 고도로 관련된 바실루스 종으로 이루어지는 군으로부터 선택된 스트레인으로부터 유도되는 것들이다.

실질적으로 상동하는 단백질 및 폴리펩티드는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 가지는 것을 특징으로 한다. 이들 변화는 바람직하게는 미미한 성질의 것, 즉 보존성 아미노산 치환 (표 2 참조), 및 단백질 또는 폴리펩티드의 접힘 또는 활성에 유의할만하게 영향을 미치지 않는 다른 치환이다: 전형적으로 하나 내지 30 개의 아미노산의 작은 결실; 및 작은 아미노- 또는 카르복실-말단 연장, 예컨대 아미노-말단 메티오닌 잔기, 약 20 내지 25 개 잔기의 작은 링커 펩티드, 또는 정제를 용이하게 해주는 작은 연장 (친화성 꼬리표), 예컨대 폴리-히스티딘 트랙, 단백질 A [Nilsson et al., Embo J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991; Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991]. 친화성 꼬리표를 코드화하는 DNA는 상업적인 공급자들 (예컨대 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA)로부터 구할 수 있다.

그러나, 상기 설명된 변화들이 바람직하게는 미미한 성질의 것이라고 해도, 그러한 변화들은 또한 300 개까지의 아미노산의 보다 큰 폴리펩티드로의 융합 또는 본 발명의 만난나제 폴리펩티드로의 아미노- 또는 카르복시-말단 연장과 같은 보다 큰 성질의 것일 수 있다.

[표 1]

보존성 아미노산 치환

염기성	아르기닌 라이신 히스티딘
산성	글루탐산 아스파르트산
극성	글루타민 아스파라긴
소수성	로이신 이소로이신 발린
방향성	페닐알라닌 트립토판 티로신
작은 것	글리신 알라닌 세린 트레오닌 메티오닌

20 개의 표준 아미노산 외에, 비-표준 아미노산 (예컨대 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸 라이신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린 및 a-메틸 세린)이 본 발명에 따르는 폴리펩티드의 아미노산 잔기 대신 치환될 수 있다. 제한된 수의 비-보존성 아미노산, 유전자 코드에 의해 코드화되지 않는 아미노산, 및 비천연 아미노산이 아미노산 잔기 대신 치환될 수 있다. "비천연 아미노산"은 단백질 합성 후에 변형되었고, 및/또는 표준 아미노산의 것과는 다른 화학적 성질을 자신의 측쇄(들)에 가지고 있다. 비천연 아미노산은 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 바람직하게는 상업적으로 구할 수 있고, 그러한 것의 실예로는 피페콜산, 티아졸리딘 카르복실산, 데히드로프롤린, 3- 및 4-메틸프롤린, 및 3,3-디메틸프롤린이 있다.

본 발명의 만난나제 폴리펩티드의 필수 아미노산들은 당업계에 공지되어 있는 과정들, 예컨대 부위-특정 돌연변이생성법 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이생성법 [Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085, 1989]에 따라 확인될 수 있다. 후자의 기법에서는, 단일한 알라닌 돌연변이가 분자의 매 잔기마다 도입되

고, 그 결과 생성된 돌연변이체는 분자의 활성에 중요한 아미노산 잔기를 확인하기 위하여 생물학적 활성 (즉 만난나제 활성)에 대해 시험된다 [Hilton et al., J. Biol. Chem. 271:4699-4708, 1996]. 효소 또는 다른 생물학적 상호반응의 활성 부위는 또한 예를 들면 잠재적인 접촉 부위 아미노산의 돌연변이와 함께 핵자기 공명, 결정학, 전자 회절 또는 광친화성 표지화에 의해 측정되는 바와 같이, 구조의 물리적 분석에 의하여 측정될 수 있다 [de Vos et al., Science 255:306-312, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992]. 필수 아미노산의 정체는 또한 본 발명에 따르는 폴리펩티드와 관련된 폴리펩티드를 사용한 상동성의 분석으로부터 추론될 수 있다.

다중 아미노산 치환은 돌연변이생성, 재조합 및/또는 셔플링과, 이어지는 관련 스크리닝 과정, 예를 들면 라이드하르-올슨 및 사우어, 보위와 사우어에 의해 설명된 것과 같은 방법들을 사용하여 만들어지고 시험될 수 있다 [Reidhaar-Olson and Sauer, Science 241:53-57, 1988; Bowie and Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156, 1989]. 간단하게 설명하면, 상기 저자들은 폴리펩티드의 둘 또는 그 이상의 위치를 동시에 무작위화하거나, 또는 상이한 돌연변이의 재조합/셔플링을 동시에 하고 (WO 95/17413, WO 95/22625), 이어서 기능적인 폴리펩티드를 선택한 후, 각 위치에서 허용되는 치환의 범위를 측정하기 위하여 돌연변이된 폴리펩티드를 서열화하는 방법을 개시하였다. 사용될 수 있는 다른 방법들로는 파지 디스플레이 (Lowman et al., Biochem. 30:10832-10837, 1991; Ladner et al., 미국 특허 제 5,223,409 호; Huse, WIPO 공보 WO 92/06204] 및 영역-특정 돌연변이생성 [Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988]이 있다.

상술된 바와 같은 돌연변이생성/셔플링 방법은 숙주 세포에서 클론되고, 돌연변이된 폴리펩티드의 활성을 검출하기 위하여 고-출력의 자동화된 스크리닝 방법과 결합될 수 있다. 활성 폴리펩티드를 코드화하는 돌연변이된 DNA 분자는 숙주 세포로부터 회수될 수 있고 현대적인 장비를 사용하여 빠르게 서열화될 수 있다. 이들 방법으로 관심의 폴리펩티드의 개별적인 아미노산 잔기들의 중요성이 빠르게 측정될 수 있으며, 이들 방법은 미지의 구조를 가지는 폴리펩티드에도 적용될 수 있다.

상술된 방법들을 사용하여, 당업자는 SEQ ID NO:2의 잔기 33에서 340 또는 33에서 490; 또는 SEQ ID NO:6의 잔기 32에서 344 또는 32에서 494; 또는 SEQ ID NO:10의 잔기 32에서 362 또는 32에서 586; 또는 SEQ ID NO:12의 잔기 33에서 331; 또는 SEQ ID NO:14의 잔기 166에서 488 또는 22에서 488; 또는 SEQ ID NO:16의 잔기 68에서 369 또는 32에서 369; 또는 SEQ ID NO:18의 잔기 1에서 305; 또는 SEQ ID NO:20의 잔기 1에서 132; 또는 SEQ ID NO:22의 잔기 29에서 320; 또는 SEQ ID NO:24의 잔기 29에서 188; 또는 SEQ ID NO:26의 잔기 301에서 625 또는 30에서 625; 또는 SEQ ID NO:28의 잔기 166에서 496 또는 38에서 496; 또는 SEQ ID NO:30의 잔기 26에서 361; 또는 SEQ ID NO:32의 잔기 593에서 903 또는 23에서 903에 대하여 실질적으로 상동하며 야생형 단백질의 만난나제 활성을 보유하고 있는 다양한 폴리펩티드를 확인 및/또는 제조하는 것이 가능하다.

본 발명의 만난나제 효소는 촉매활성 도메인을 포함하고 있는 효소 코아외에, 또한 셀룰로스 결합 도메인 (CBD), 작동가능하게 연결되는 효소의 셀룰로스 결합 도메인 및 효소 코아 (촉매적으로 활성인 도메인)를 포함할 수 있다. 셀룰로스 결합 도메인 (CBD)은 코드화된 효소의 통합 부분으로서 존재하거나, 또는 다른 기원의 CBD가 만난 분해 효소안에 도입되어 효소 혼성체가 생성될 수도 있다. 이런 맥락에서, 용어 "셀룰로스-결합 도메인"은 피터 톰 등에 의해 규정된 바와 같이 이해되도록 의도된다 ["Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties" in "Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates", John N. Saddler and Michael H. Penner (Eds.), ACS Symposium Series, No. 618, 1996]. 이 정의는 120 개 이상의 셀룰로스-결합 도메인을 10 개의 패밀리 (I-X)로 분류하며, CBD가 셀룰라제, 크실라나제, 만난나제, 아라비노퓨라노시다제, 아세틸 에스테라제 및 키티나제와 같은 다양한 효소들에서 발견된다는 것을 증명하였다. CBD는 또한 조류, 예컨대 적색 조류인 Porphyra purpurea에서 비-가수분해성 다당-결합 단백질로서 발견되었다 [Tomme et al., 상기 동일]. 그러나, 대부분의 CBD는 셀룰라제 및 크실라나제로부터 유도되며, CBD는 단백질의 N 및 C 말단에서 발견되거나 또는 단백질의 내부에 있다. 효소 혼성체는 당업계에 공지이며 (예컨대 WO 90/00609 및 WO 95/16782 참조), 만난 분해 효소를 코드화하는 DNA 서열에 링커와 함께 또는 링커 없이 결찰된 셀룰로스-결합 도메인을 코드화하는 DNA의 최소한 단편을 포함하고 있는 DNA 구성물을 숙주 세포안에 형질전환시키고, 그 숙주 세포를 융합된 유전자가 발현되도록 성장시킴으로써 제조될 수 있다. 효소 혼성체는 다음 식으로 설명될 수 있다:

CBD - MR - X

상기 식에서, CBD는 최소한 셀룰로스-결합 도메인에 상응하는 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 영역이고; MR은 중간 영역으로 (링커), 결합, 또는 바람직하게는 2 내지 약 100 개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 2 내지 40 개의 탄소 원자로 된 짧은 연결기, 또는 바람직하게는 약 2 내지 약 100 개의 아미노산, 보다 바람직하게는 2 내지 40 개의 아미노산일 수 있으며; X는 본 발명의 만난나제의 N-말단 또는 C-말단 영역이다. SEQ ID NO:4에는 만난나제 효소 코아와 CBD로 이루어진 효소 혼성체의 아미노산 서열이 개시되어 있다.

바람직하게도, 본 발명의 만난나제 효소는 최소한 7, 바람직하게는 최소한 8, 보다 바람직하게는 최소한 8.5, 보다 더 바람직하게는 최소한 9, 보다 더 바람직하게는 최소한 9.5, 더욱 바람직하게는 최소한 10, 한층 더 바람직하게는 최소한 10.5, 특히 최소한 11 의 pH에서 최대 촉매 활성을 나타낸다; 바람직하게는 효소의 최대 활성은 최소한 40 ℃, 보다 바람직하게는 최소한 50 ℃, 보다 더 바람직하게는 최소한 55 ℃의 온도에서 얻어진다.

바람직하게도, 본 발명의 클리닝 조성물은, 예컨대 기계 세척 과정의 세척 사이클중에 있는 직물 처리에 사용될 때, 전형적으로 약 8 과 약 10.5 사이의 pH를 가지고 있는 세척 용액을 제공한다. 전형적으로, 그러한 세척 용액은 약 20 ℃와 약 95 ℃ 사이의 온도에서, 바람직하게는 약 20 ℃와 약 60 ℃ 사이의 온도, 보다 더 바람직하게는 약 20 ℃와 약 50 ℃ 사이에서 사용된다.

단백질 생성

본 발명의 단백질 및 폴리펩티드는, 그것의 전체 길이의 단백질, 단편 및 융합 단백질을 포함하여, 종래 기법에 따라 유전공학적으로 처리된 숙주 세포에서 생성될 수 있다. 적당한 숙주 세포는 외인성 DNA로 형

질전환되고 배양중에 성장할 수 있는 그러한 타입의 것들이며, 예를 들면 박테리아, 진균 세포, 및 배양된 고등 진핵 세포를 들 수 있다. 박테리아 세포, 특히 그람-포지티브 유기체의 배양된 세포가 바람직하다. 바실루스 속에 속하는 그람-포지티브 세포들이 특히 바람직한데, 예를 들면 바실루스 서브틸리스, 바실루스 렌투스, 바실루스 클라우시이, 바실루스 아가라드해렌스, 바실루스 브레비스, 바실루스 스테아로써모필루스, 바실루스 알칼로필루스, 바실루스 아밀로리쿠에파시엔스, 바실루스 코아귤란스, 바실루스 써큘란스, 바실루스 라우투스, 바실루스 튜링기엔시스, 바실루스 리케니포르미스, 및 바실루스 sp., 특히 바실루스 sp. I633, 바실루스 sp. AAI12, 바실루스 클라우시이, 바실루스 아가라드해렌스 및 바실루스 리케니포르미스로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

다른 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 진균 세포이다. 본원에서 사용되는 "진균"은 아스코미코타 문 (phylum), 바시디오미코타 문, 키트리디오미코타 문, 및 자이고미코타 문 [Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK], 및 오오미코타 문 (Hawksworth et al., 1995, 상기 동일, p. 171)과 모든 영양포자성 진균 (Hawksworth et al., 1995)을 포함한다. 대표적인 아스코미코타 군에는 예컨대 뉴로스포라, 유페니실륨 (=페니실륨), 에메리셀라 (=아스페르길루스), 유로티윰 (=아스페르길루스), 및 상기 열거된 효모들이 있다. 바시디오미코타의 실예로는 버섯, 녹, 흑수병균이 있다. 대표적인 키트리디오미코타 군에는 알로마이세스, 블라스토클라디엘라, 코엘로모마이세스, 및 수생 진균이 있다. 대표적인 오오미코타 군에는 물곰팡이류 수생 진균 (물곰팡이), 예컨대 Achlya 가 있다. 영양포자성 진균의 실예로는 아스페르길루스, 페니실륨, 칸디다, 및 알테르나리아가 있다. 대표적인 자이고미코타 군에는 리조푸스와 뮤코어 (털곰팡이)가 있다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 진균류 숙주 세포는 필라멘트형 진균 세포이다. "필라멘트형 진균"에는 세부분할된 유미코타와 오오미코타의 모든 필라멘트형 (Hawkswotrh et al., 1995, 상기 동일)이 포함된다. 보다 바람직한 구체예에서, 필라멘트형 진균 숙주 세포는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 아크레모니움, 아스페르길루스, 푸사리움, 휴미콜라, 뮤코어, 미셀리오프토라, 뉴로스포라, 페니실륨, 티에라비아, 톨리포클라디움, 및 트리코더마 또는 그것의 텔레오모르프 (teleomorph) 또는 시너님 (synonym) 종의 세포이다.

특히, 세포는 트리코더마 종, 바람직하게는 트리코더마 하르지아눔 또는 트리코더마 레에세이, 또는 아스페르길루스 종, 가장 바람직하게는 아스페르길루스 오리자에 또는 아스페르길루스 니거, 또는 푸사리움 종, 가장 바람직하게는 푸사리움 ATCC 20334 (PCT/US95/07743 에서 상세하게 설명됨)의 뚜렷한 특징을 가지고 있는 푸사리움 sp. 에 속할 수 있다.

진균 세포는 원형질체 형성, 원형질체 형질전환, 및 공지된 자체의 방식으로 세포벽의 재생을 포함하는 과정에 의하여 형질전환될 수 있다. 아스페르길루스 숙주 세포의 형질전환에 적당한 과정은 EP 238 023 및 문헌에 설명되어 있다 [Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474]. 푸사리움 종을 형질전환시키는 적당한 방법은 말라디에르 등에 의해 문헌에 설명되어 있다 [Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156, 본 출원과 공동계류중인 USSN 08/269,449]. 효모는 문헌에 설명되어 있는 방법에 의해 형질전환될 수 있다 [Becker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920]. 포유동물 세포는 그라함과 반 데르 에브의 인산 칼슘 침전법을 사용하는 직접적인 흡수에 의해 형질전환될 수 있다 [Graham and Van der Eb, 1978, Virology 52:546].

클론된 DNA 분자를 조작하고 외인성 DNA를 다양한 숙주 세포안에 도입시키는 기법들은 샘브룩 등에 의해 문헌에 기술되어 있다 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987; "Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria", Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.].

일반적으로, 본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열은 그것의 발현에 필요한 다른 유전적 엘레먼트, 일반적으로 발현 벡터내에 있는 전사 프로모터 및 전사 터미네이터에 작동가능하게 연결된다. 벡터에는 또한 통상적으로 하나 또는 둘 이상의 선택가능한 마아커와 하나 또는 둘 이상의 복제 기원이 포함될 것이지만, 당업자는 특정한 시스템내에서 선택가능한 마아커가 별도의 벡터로 제공될 수 있으며, 외인성 DNA의 복제는 숙주 세포 게놈안으로의 통합에 의하여 제공될 수 있음을 인지할 것이다. 프로모터, 터미네이터, 선택가능한 마아커, 벡터 및 다른 엘레먼트들의 선택은 당업계의 통상적인 지식 수준내에 있는 기본적인 디자인의 문제이다. 많은 그러한 엘레먼트들이 문헌에 설명되어 있으며, 상업적인 공급자들로부터 구할 수 있다.

숙주 세포의 분비 경로안으로 폴리펩티드를 지시하기 위하여, 발현 벡터에 분비 신호 서열 (또는 리더 서열, 프레프로 서열 또는 프레 서열로서 공지되어 있음)이 제공된다. 분비 신호 서열은 폴리펩티드의 분비 신호 서열일 수 있으며, 또는 다른 분비된 단백질로부터 유도될 수도 있고 또는 생체내에서 합성될 수도 있다. 많은 적당한 분비 신호 서열들이 당업계에 공지이며 ["Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria", Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.], 특히 바실루스 숙주 세포에서의 분비를 위해 적당한 분비 신호 서열에 대한 상세한 설명은 문헌을 참조한다 [Cutting, S.M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus", John Wiley and Sons, 1990]. 분비 신호 서열은 정확한 리딩 프레임에서 DNA 서열에 결합된다. 분비 신호 서열은 통상적으로 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열에 대해 5'쪽에 위치하지만, 어떤 신호 서열은 관심의 DNA 서열의 다른 곳에도 위치할 수 있다 (예컨대 Welch 등, 미국 특허 제 5,037,743 호; Holland 등, 미국 특허 제 5,143,830 호).

본 발명의 발현 벡터는 재조합 DNA 과정을 편리하게 수행받을 수 있는 것이면 어느 발현 벡터든지 좋으며, 벡터의 선택은 때로 벡터가 도입될 숙주 세포에 좌우될 것이다. 그러므로, 벡터는 자동으로 복제

하는 벡터, 즉 염색체외적 실체로서 존재하고 그것의 복제가 염색체 복제와 무관한 벡터, 예컨대 플라스미드일 수 있다. 또는 달리, 벡터는 숙주 세포에 도입될 때, 숙주 세포의 게놈안에 통합되어 그것이 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다.

필라멘트형 진균 숙주 세포에서 사용하기에 적당한 프로모터의 실예는 예를 들면 ADH3 프로모터 [McKnight et al., The EMBO J. 4 (1985), 2093-2099] 또는 tpiA 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터의 실예로는 아스페르길루스 오리자에 TAKA 아밀라제를 코드화하는 유전자, 리조뮤코어 미헤이 아스파르트산 프로테이나제를 코드화하는 유전자, 아스페르길루스 니거 중성 a-아밀라제를 코드화하는 유전자, 아스페르길루스 니거 산 안정성 a-아밀라제를 코드화하는 유전자, 아스페르길루스 니거 또는 아스페르길루스 아와모리 글루코아밀라제 (gluA)를 코드화하는 유전자, 리조뮤코어 미헤이 리파제를 코드화하는 유전자, 아스페르길루스 오리자에 알칼리성 프로테아제를 코드화하는 유전자, 아스페르길루스 오리자에 트리오스 포스페이트 이소메라제를 코드화하는 유전자 또는 아스페르길루스 니듈란스 아세트아미다제를 코드화하는 유전자로부터 유도되는 것들이 있다.

형질전환된 숙주 세포는 종래 방법에 따라, 선택된 숙주 세포의 성장을 위해 필요한 영양분 및 다른 것들이 함유되어 있는 배양 배지에서 배양된다. 규정된 배지 및 복합 배지를 포함하여 다양한 적당한 배지가 당업계에 공지이며, 일반적으로 배지에는 탄소 공급원, 질소 공급원, 필수 아미노산, 비타민 및 미네랄이 함유되어 있다. 배지에는 또한 필요에 따라 혈청 또는 성장 인자와 같은 성분들이 함유되어 있다. 성장 배지는 일반적으로 예컨대 약물 선택 또는 발현 벡터상에 포함된 또는 숙주 세포안에 함께 형질전환되는 선택가능한 마아커에 의해 보충되는 필수 영양분의 결핍에 의해 외래적으로 첨가된 DNA를 함유하고 있는 세포를 선택할 것이다.

단백질 분리

발현된 재조합 폴리펩티드가 분비될 때 폴리펩티드는 성장 배지로부터 정제될 수 있다. 바람직하게도, 발현 숙주 세포는 폴리펩티드의 정제전에 배지로부터 제거된다 (예컨대 원심분리에 의해).

발현된 재조합 폴리펩티드가 숙주 세포로부터 분비되지 않는 경우에, 숙주 세포는 바람직하게는 파괴되고 폴리펩티드가 수성"추출물"로 방출되는데, 이것이 그러한 정제 기법의 첫 번째 단계이다. 바람직하게도 발현 숙주 세포는 세포 파괴전에 배지로부터 수집된다 (예컨대 원심분리에 의해).

세포 파괴는 종래의 기법에 의해, 예컨대 라이소자임 소화 또는 세포를 고압력으로 힘을 가함으로써 수행될 수 있다. 세포 파괴 기법에 대한 상세한 설명은 문헌을 참조한다 [Robert K. Scobes, Protein Purification, Second edition, Springer-Verlag].

발현된 재조합 폴리펩티드 (또는 키메릭 폴리펩티드)가 분비되든 또는 그렇지 않든, 폴리펩티드는 분획화 및/또는 종래의 정제 방법 및 배지를 사용하여 정제될 수 있다.

암모늄 술페이트 침전 및 산 또는 카오트로프 (chaptrope) 추출이 샘플의 분획화를 위해 사용될 수 있다. 예시적인 정제 단계로는 히드록시아파타이트, 크기 축출, FPLC 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피가 있다. 적당한 음이온 교환 배지에는 유도된 덱스트란, 아가로스, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 특제 실리카, 등이 포함된다. PEI, DEAE, QAE 및 Q 유도체가 바람직하며, DEAE 패스트-플로우 세파로스 (Pharmacia, Piscataway, NJ)가 특히 바람직하다. 예시적인 크로마토그래피 배지에는 페닐, 부틸, 또는 옥틸 기로 유도된 배지, 예를 들면 페닐 세파로스 FF (Pharmacia), Toyopearl 부틸 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), 옥틸-세파로스 (Pharmacia) 등; 또는 폴리아크릴 수지, 예컨대 암버크롬 CG 71 (Toso Haas) 등이 있다. 적당한 고체 지지체로는 유리 비드, 실리카-기초 수지, 셀룰로스성 수지, 아가로스 비드, 교차-결합된 아가로스 비드, 폴리스티렌 비드, 교차-결합된 폴리아크릴아미드 수지, 및 그것들이 사용되는 조건하에서 불용성인 것들이 있다. 이들 지지체는 아미노기, 카르복실기, 술프히드릴기, 히드록실기 및/또는 탄수화물 부분에 의해 단백질의 부착을 허용하는 반응성기로 변형될 수 있다. 커플링 화학의 실예는 시아노겐 브로마이드 활성화, N-히드록시숙신이미드 활성화, 에폭시드 활성화, 술프히드릴 활성화, 히드라지드 활성화, 및 카르보디이미드 커플링 화학을 위한 카르복실 및 아미노 유도체가 있다. 이들 및 다른 고체 배지는 당업계에 잘 알려져 있으며 널리 사용되고 있고, 상업적인 공급자들로부터 구할 수 있다.

특정 방법의 선택은 기본적인 디자인의 문제이며, 부분적으로는 선택되는 지지체의 성질에 의해 결정된다 [Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988].

본 발명의 폴리펩티드 또는 그것의 단편들은 또한 화학적 합성을 통하여 제조될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 단량체 또는 다량체일 수 있고; 글리코실화되거나 글리코실화되지 않을 수 있으며; 페길화될 수 있거나 페길화되지 않을 수도 있고; 초기 메티오닌 아미노산 잔기를 포함하거나 포함하지 않을 수도 있다.

본원에서 개시되는 서열 정보를 토대로 하여, 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:1에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 94에서 위치 990까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 94에서 1470까지의 DNA 서열이 클론될 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:5에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 94에서 위치 1032까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 94에서 1482까지의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:9에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 94에서 위치 1086까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 94에서 1761까지의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:11에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 97에서 위치 993까지의 서열을 포함하는 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:13에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 498에서 위치 1464까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 64에서 1464까지의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:15에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 204에서 위치 1107까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 76에서 1107까지의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:17에 도시된 DNA 서열을

포함하는 전 길이의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:19에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:21에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 88에서 위치 960까지의 서열을 포함하는 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:23에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:25에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 904에서 위치 1875까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 88에서 2445까지의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:27에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 498에서 위치 1488까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 112에서 1488까지의 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:29에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 79에서 위치 1083까지의 서열을 포함하는 DNA 서열; 및 본 발명의 만난나제를 코드화하고 SEQ ID NO:31에 도시된 DNA 서열을 포함하는 전 길이의 DNA 서열, 최소한 위치 1779에서 위치 2709까지의 서열을 포함하는 DNA 서열, 또는 위치 67에서 2709까지의 DNA 서열이 클론될 수 있다.

클로닝은 다음과 같은 공지된 표준 과정에 의해 수행된다:

♥ 바실루스 스트레인, 특히 바실루스 sp. I633, B. sp. AAI12, B. sp. AA349, 바실루스 아가라드해렌스, 바실루스 할로듀란스, 바실루스 클라우시이 및 바실루스 리케니포르미스로부터 선택된 스트레인, 또는 진균 스트레인으로부터, 특히 휴미콜라 인솔렌스로부터 게놈 라이브러리를 제조하는 단계;

♥ 그러한 라이브러리를 적당한 기질 플레이트위에 플레이팅하는 단계;

♥ SEQ ID NOs:1, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 또는 31 중 어떠한 서열을 토대로 한 프로브를 사용하는 표준 혼성화 기법에 의해 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 클론을 확인하는 단계; 또는

♥ 상기 게놈 라이브러리로부터의 클론을 SEQ ID NOs:1, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 또는 31로부터 얻어지는 서열 정보를 토대로 한 프라이머를 사용하는 역 PCR 스트래티지에 의하여 확인하는 단계. (역 PCR 에 대한 보다 상세한 설명은 M.J. MCPherson et al., "PCR A practical approach" Information Press Ltd, Oxford England, 참조).

본원에 개시된 서열 정보 (SEQ ID NOs:1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 30, 31, 32)를 토대로 할 때, 당업자가 본 발명의 상동성 만난나제를 코드화하는 상동성 폴리뉴클레오티드 서열을, 관련된 미생물 유기체로부터 얻어지는 게놈 라이브러리, 특히 바실루스 sp.의 친알칼리성 종과 같은 바실루스 속의 다른 스트레인 또는 휴미콜라 종과 같은 진균 스트레인으로부터 얻어지는 게놈 라이브러리를 사용하여 유사한 스트래티지에 의해 단리하는 것은 기본적인 작업이다.

또는 달리, 본 발명의 만난 또는 갈락토만난-분해 효소를 코드화하는 DNA는 잘 알려져 있는 과정에 따라, 적당한 공급원, 예컨대 상기 언급된 유기체중 어느 하나로부터, 대장균 DSM 12197, DSM 12180, DSM 12433, DSM 12441, DSM 9984, DSM 12432, DSM 12436, DSM 12846, DSM 12847, DSM 12848, DSM 12849, DSM 12850, DSM 12851 및 DSM 12852중 한 스트레인에 존재하는 플라스미드로부터 얻을 수 있는 DNA 서열을 토대로 제조된 합성 올리고뉴클레오티드를 사용함으로써 편리하게 클론될 수 있다.

따라서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자는 상기 설명된 것과 같은 클로닝에 의해 얻어진 플라스미드가 기탁되어 있는 대장균 DSM 12197, DSM 12180, DSM 12433, DSM 12441, DSM 9984, DSM 12432, DSM 12436, DSM 12846, DSM 12847, DSM 12848, DSM 12849, DSM 12850, DSM 12851 및 DSM 12852중 어느 하나로부터 단리될 수 있다. 또한, 본 발명은 대장균 스트레인 DSM 12197, DSM 12180, DSM 12433, DSM 12441, DSM 9984, DSM 12432, DSM 12436, DSM 12846, DSM 12847, DSM 12848, DSM 12849, DSM 12850, DSM 12851 및 DSM 12852중 어느 하나로부터 단리된 실질적으로 순수한 생물학적 배양물에 관한 것이다.

본 명세서에서, 용어 "효소 제제"는 통상 많은 상이한 효소적 활성을 포함하고 있는, 미생물의 단일 종으로부터 아마도 단리되고 정제된 종래의 효소적 발효 생성물; 또는 별도로 발효되고 단리되고 정제되었고 상이한 종들로부터, 바람직하게는 진균 또는 박테리아 종으로부터 기원하였을, 바람직하게는 종래의 재조합 기법을 사용함으로써 박테리아 또는 진균 종으로부터 유도된 단일성분 효소들의 혼합물; 또는 미생물이 재조합 만난나제의 발현을 위한 숙주 세포로서 작용하지만, 그 미생물은 동시에 미생물의 자연 발생적인 발효 생성물인 다른 효소, 예컨대 펙틴 분해 효소, 프로테아제, 또는 셀룰라제, 즉 상응하는 자연 발생적인 미생물에 의해 관례적으로 생성된 효소 복합체를 생성하는 미생물의 발효 생성물중 어느 하나를 의미하는 것으로 의도된다.

본 발명의 만난나제 제제는 추가로 프로테아제, 셀룰라제 (엔도-β-1,4-글루카나제), β-글루카나제 (엔도-β-1,3(4)-글루카나제), 리파제, 큐티나제, 과산화효소, 락카제, 아밀라제, 글루코아밀라제, 펙티나제, 환원효소, 산화효소, 페놀산화효소, 리그니나제, 풀룰라나제, 헤미셀룰라제, 펙테이트 리아제, 크실로글루카나제, 크실라나제, 펙틴 아세틸 에스테라제, 람노갈락투로난 아세틸 에스테라제, 폴리갈락투로나제, 람노갈락투로나제, 펙틴 리아제, 펙틴 메틸에스테라제, 셀로비오히드롤라제, 트란스글루타미나제로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 효소; 또는 그것들의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 제제중의 하나 또는 그 이상 또는 모든 효소는 재조합 기법에 의하여 제조된다, 즉 효소(들)은 원하는 효소 블렌드를 가지는 효소 제제를 형성하기 위하여 다른 효소(들)과 혼합되는 단일-성분 효소(들)이다.

다른 측면으로, 본 발명은 또한 발명의 효소 제제를 제조하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 효소의 제조가 허용되는 조건하에서 만난나제를 생성할 수 있는 미생물, 예컨대 야생형 스트레인을 배양하고, 배양물로부터 효소를 회수하는 것으로 이루어진다. 배양은 종래의 발효 기법, 예컨대 진동 플라스크 또는 발효기에서 교반됨으로써 성장 배지에 충분한 통기가 보장되어 만난나제 효소의 생성이 유도되는 배양 방식을 사용하여 수행될 수 있다. 성장 배지에는 펩톤, 효모 추출물 또는 카사미노산과 같은 종래의 N-공급원, 덱스트로스 또는 슈크로스와 같은 종래의 C-공급원의 감소된 양, 및 구아르 고무 또는 구주콩 깍지 고무와 같은 인듀서가 함유될 수 있다. 회수는 종래의 기법, 예를 들면 원심분리 또는 여과에 의한

생체 물질 및 상층액의 분리, 상층액의 회수 또는 관심의 효소가 세포내에 있는 경우 세포의 파괴, 그런 다음 아마도 이어지는, EP 0 406 314에 설명된 것과 같은 추가의 정제 또는 WO 97/15660에 설명된 것과 같은 결정화를 사용하여 수행될 수 있다.

본 발명의 효소 또는 효소 제제를 생성하는 유용한 박테리아의 실예는 그람 포지티브 박테리아, 바람직하게는 바실루스/락토바실루스 세분화 종, 바람직하게는 바실루스 속의 스트레인, 보다 바람직하게는 바실루스 sp. 스트레인이다.

또 다른 측면으로, 본 발명은 상술된 성질을 가지고 있고 동종성 불순물이 없으며, 종래의 재조합 기법을 사용하여 제조되는 단리된 만난나제에 관한 것이다.

면역학적 교차-반응성

면역학적 교차-반응성을 측정하는데 사용될 다클론성 항체는 정제된 만난나제 효소를 사용하여 제조될 수 있다. 보다 구체적으로 설명한다면, 본 발명의 만난나제에 대한 항혈청은 문헌에 기재된 과정을 따라 토끼 (또는 다른 설치류)를 면역시킴으로써 발생될 수 있다 [N. Axelsen et al. in: A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23; A. Johnstone and R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982, pp.27-31]. 정제된 면역글로불린은 항혈청으로부터, 예를 들면 염 침전법 ($(NH_4)_2SO_4$)과 이어지는 투석 및, 예컨대 DEAE-세파덱스 상에서의 이온 교환 크로마토그래피에 의하여 얻어질 수 있다. 단백질의 면역화학적 특성확인은 오크텔로니 이중-확산 분석 (O. Ouchterlony in: Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir, Ed., Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706)에 의해, 교차된 면역전기영동 (N. Axelsen et al., 상기 동일, 제 3, 4 장)에 의해, 또는 로켓 면역전기영동 (N. Axelsen et al., 상기 동일, 제 2 장)에 의해 수행될 수 있다.

세제 산업에서의 사용

추가의 측면으로, 본 발명은 본 발명의 만난나제 또는 만난나제 제제를 포함하고 있는 세제 조성물, 기계식 세척 과정의 세척 사이클중의 직물을 본 발명의 만난나제 또는 만난나제 제제를 함유하고 있는 세척 용액으로 처리하는 것으로 이루어지는 직물의 기계식 처리 방법, 및 만난나제 및 임의로 셀룰라제, 아밀라제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제중에서 선택된 다른 효소를 포함하며 월등한 클리닝 성능, 즉 월등한 얼룩 제거, 더러움 세정 및 순백도 유지능력을 제공하는, 세탁, 접시세척, 경질 표면 클리너, 개인용 세정 및 구강/치아용 조성물을 포함한 클리닝 조성물에 관한 것이다.

이 이론에 구속됨이 없이, 본 발명의 만난나제는 갈락토만난을 함유하고 있는 어떠한 얼룩이나 반점을 효과적으로 분해 또는 가수분해할 수 있으며, 따라서 그러한 얼룩 또는 반점을 포함하고 있는 세탁물을 클리닝할 수 있는 것으로 여겨진다.

본 발명의 클리닝 조성물은 최소한 하나의 추가의 세제 성분을 함유하여야 한다. 이들 추가의 성분의 정확한 성질, 및 그것의 혼입 수준은 조성물의 물리적 형태, 및 그것이 사용될 클리닝 조작의 성질에 따라 좌우될 것이다.

본 발명의 클리닝 조성물은 바람직하게는 선택된 계면활성제, 다른 효소, 연마제 및/또는 표백 시스템으로부터 선택된 세제 성분을 추가로 포함한다.

본 발명에 따르는 클리닝 조성물은 액체형, 페이스트형, 겔형, 막대형, 정제형, 분무제형, 발포제형, 분말형 또는 과립형일 수 있다. 과립형 조성물은 또한 "압축"형일 수 있고, 액체 조성물은 또한 "농축"형일 수 있다.

본 발명의 조성물은 예를 들면 수동 및 자동 접시세척 조성물, 세탁물 첨가제 조성물 및 침수 및/또는 얼룩진 직물의 예비처리에 사용하기에 적당한 조성물을 포함한 수동 및 자동 세탁물 세제 조성물, 린스가 첨가된 직물 연화제 조성물, 및 일반적인 가정용 경질 표면 클리닝 조작에 사용하기 위한 조성물로서 제형될 수 있다. 그러한 탄수화물 함유 조성물은 또한 살균 제품, 콘택트 렌즈 클리너 및 건강 및 미용 보호 제품, 예컨대 구강용/치아용 보호 및 개인용 세정 조성물로서 제형될 수 있다.

수동 접시세척 방법에 사용하기 위한 조성물로서 제형될 때, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 계면활성제와, 유기 중합체 화합물, 비누거품 증강제, 제 II 군 금속 이온, 용매, 향수성 물질 및 추가의 효소로부터 선택된 다른 세제 성분을 함유한다.

세탁물 기계식 세척 방법에 사용하기에 적당한 조성물로서 제형될 때, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 계면활성제와 연마제 화합물 두가지를 함유하며, 추가로 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 표백제, 추가의 효소, 비누거품 억제제, 분산제, 라임-비누 분산제, 얼룩 현탁 및 재침착 방지제, 및 부식 억제제로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 세제 성분을 함유한다. 세탁 조성물은 또한 추가의 세제 성분으로서 연화제를 함유할 수 있다. 그러한 탄수화물 함유 조성물은 세탁용 세제 조성물로서 제형될 때 직물 클리닝, 얼룩 제거, 순백도 유지, 연화, 색의 외관, 염료 이동 억제 및 살균력을 제공할 수 있다.

본 발명의 조성물은 또한 고체 또는 액체 형태의 세제 첨가 제품으로서 사용될 수 있다. 그러한 첨가제품은 종래의 세제 성분의 성능을 보충하거나 한층 더 강화하기 위하여 의도된 것이고, 클리닝 과정의 어떤 단계에서든지 첨가될 수 있다.

필요하다면 본원의 세탁용 세제 조성물의 밀도는 20 ℃에서 측정된 조성물의 400 내지 1200 g/l, 바람직하게는 500 내지 950 g/l 의 범위이다.

본원의 조성물의 "압축"형태는 밀도와, 조성물의 견지에서, 무기 충전염에 의해 가장 잘 반영된다; 무기 충전염은 분말 형태의 세제 조성물의 종래 성분이다; 종래의 세제 조성물에서 충전염은 실질적인 양, 전형적으로 총 조성물의 17 내지 35 중량 % 의 양으로 존재한다. 압축 조성물에서, 충전염은 총 조성물의 15 중량 %를 초과하지 않는 양으로, 바람직하게는 10 중량 %를 초과하지 않는 양으로, 가장 바람직하게는 조성물의 5 중량 %를 초과하지 않는 양으로 존재한다. 본 조성물에서 의미하는 것과 같은 의미의 무기 충

전염은 술페이트 및 염화물의 알칼리 및 알칼리 토금속염으로부터 선택된다. 바람직한 충전염은 황산 나트륨이다.

본 발명에 따르는 액체 세제 조성물은 또한 "농축된 형태"일 수 있으며, 그러한 경우에 본 발명에 따르는 액체 세제 조성물은 종래의 액체 세제와 비교하여 더 적은 양의 물을 함유할 것이다. 전형적으로 농축된 액체 세제의 물 함량은 바람직하게는 세제 조성물의 40 중량 % 미만, 보다 바람직하게는 30 중량 % 미만, 가장 바람직하게는 20 중량 % 미만이다.

클리닝 조성물

계면활성제 시스템

본 발명에 따르는 클리닝 또는 세제 조성물은 계면활성제 시스템을 포함하는데, 이 계면활성제는 비이온성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 암포라이틱 (ampholytic) 및/또는 양성이온성 및/또는 반-극성 계면활성제로부터 선택될 수 있다.

계면활성제는 전형적으로 0.1 내지 60 중량 % 의 수준으로 존재한다. 계면활성제는 바람직하게는 조성물 내에 존재하는 효소 혼성체 및 효소 성분에 부합하도록 제형된다. 액체 또는 겔형 조성물에서 계면활성제는 그것이 이들 조성물중의 어떠한 효소 혼성체 또는 효소의 안정성을 촉진하도록, 또는 최소한 분해하지 않도록 제형되는 것이 가장 바람직하다.

본 발명에 따라 사용하기에 적당한 시스템은 계면활성제로서 본원에서 열거한 비이온성 및/또는 음이온성 계면활성제를 하나 또는 둘 이상 포함한다.

알킬 페놀의 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 및 폴리부틸렌 옥사이드 축합물이 본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용하기에 적당하며, 그 중 폴리에틸렌 옥사이드 축합물이 바람직하다. 이들 화합물은 알킬렌 옥사이드와의 직쇄 또는 분지쇄 형태중에 약 6 내지 약 14 개의 탄소 원자, 바람직하게는 약 8 내지 약 14 개의 탄소 원자를 가지고 있는 알킬 페놀의 축합 생성물을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 에틸렌 옥사이드는 알킬 페놀의 몰 당 약 2 내지 약 25 몰, 보다 바람직하게는 약 3 내지 약 15 몰의 양으로 존재한다. 상업적으로 구할 수 있는 이런 유형의 비이온성 계면활성제로는 GAF 사에서 시판하는 Igepal™ CO-630, Rohm & Haas 사에서 시판하는 트리톤™ X-45, X-114, X-100 및 X-102 이 있다. 이들 계면활성제는 통상 알킬페놀 알콕실레이트 (예컨대 알킬 페놀 에톡실레이트)로서 언급된다.

약 1 내지 약 25 몰의 에틸렌 옥사이드와 일차 및 이차 지방족 알코올과의 축합 생성물이 본 발명의 비이온성 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용하기에 적당하다. 지방족 알코올의 알킬 사슬은 직쇄이거나 분지쇄일 수 있고, 일차적이거나 이차적일 수 있으며, 일반적으로 약 8 내지 약 22 개의 탄소 원자를 함유한다. 바람직한 것은 약 8 내지 약 20 개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 18 개의 탄소 원자를 가지고 있는 알킬기를 가지는 알코올과, 알코올의 1 몰당 약 2 내지 약 10 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물이다. 상기 축합 생성물에는 알코올의 몰당 약 2 내지 약 7 몰의 에틸렌 옥사이드, 가장 바람직하게는 약 2 내지 약 5 몰의 에틸렌 옥사이드가 존재한다. 이런 유형의 상업적으로 구할 수 있는 비이온성 계면활성제의 실예로는 유니온 카바이드사에서 시판하는 Tergitol™ 15-S-9 (9 몰의 에틸렌 옥사이드와 C_{11}-C_{15} 선형 알코올과의 축합 생성물), Tergitol™ 24-L-6 NMW (C_{12}-C_{14} 일차 알코올과 6 몰의 좁은 분자량 분포를 가지고 있는 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물); 쉘 케미칼 컴패니에서 시판하는 Neodol™ 45-9 (C_{14}-C_{15} 선형 알코올과 9 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물), Neodol™ 23-3 (C_{12}-C_{13} 선형 알코올과 3.0 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물), Neodol™ 45-7 (C_{14}-C_{15} 선형 알코올과 7 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물), Neodol™ 45-5 (C_{14}-C_{15} 선형 알코올과 5 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물); 프록터 앤드 갬블사에서 시판하는 Kyro™ EOB (C_{13}-C_{15} 알코올과 9 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물); 및 휙스트사에서 시판하는 Genapol LA 050 (C_{12}-C_{14} 알코올과 5 몰의 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물)이 있다. 이들 제품에서 바람직한 HLB 범위는 8 내지 11 이고, 8 내지 10 이 가장 바람직하다.

또한 본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 유용한 것은 US 4,565,647에 개시된 알킬 다당으로, 이것은 약 6 내지 약 30 개의 탄소 원자, 바람직하게는 약 10 내지 약 16 개의 탄소 원자를 함유하고 있는 소수성 기와, 친수성 기로서 약 1.3 내지 약 10, 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3, 가장 바람직하게는 약 1.3 내지 약 2.7의 당 단위를 함유하고 있는 다당, 예컨대 폴리글리코시드를 가지고 있다. 5 또는 6 개의 탄소 원자를 함유하고 있는 어떠한 환원당도 사용될 수 있는데, 예를 들면 글루코스, 갈락토스 및 갈락토실 부분이 글루코실 부분을 대신할 수 있다 (임의로 소수성 기는 2-, 3-, 4-, 등의 위치에 부착되며, 그로써 글루코시드 또는 갈락토시드에 반대되는 글루코스 또는 갈락토스를 제공한다). 당 사이의 결합은 예를 들면 추가의 당 유니트의 한 위치와 선행하는 당 유니트상의 2-, 3-, 4-, 및/또는 6-위치 사이에 있을 수 있다.

바람직한 알킬폴리글리코시드는 다음의 식을 갖는다:

$R^2O(C_nH_{2n}O)_t$(글리코실)$_x$

상기 식에서, R^2는 알킬, 알킬페닐, 히드록시알킬, 히드록시알킬페닐, 및 그것들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 알킬기는 약 10 내지 약 18 개의 탄소 원자, 바람직하게는 약 12 내지 약 14 개의 탄소 원자를 함유하며; n은 2 또는 3, 바람직하게는 2 이고; t는 0 내지 10, 바람직하게는 0 이며; x는 약 1.3 내지 약 10, 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3, 가장 바람직하게는 약 1.3 내지 약 2.7 이다. 글리코실은 바람직하게는 글루코스로부터 유도된다. 이들 화합물을 제조하기 위해서는, 알코올 또는 알킬 폴리에톡시 알코올이 먼저 형성된 후 글루코스, 또는 글루코스의 공급원과 반응되어 글루코시드가 형성된

다 (1-위치에 부착됨). 그런 다음 추가의 글리코실 유니트가 그것들의 1-위치와 선행하는 글리코실 유니트의 2-, 3-, 4-, 및/또는 6-위치, 바람직하게는 우선적으로 2-위치 사이에 부착된다.

프로필렌 옥사이드와 프로필렌 글리콜의 축합에 의하여 형성된 소수성 염기와 에틸렌 옥사이드와의 축합 생성물이 또한 본 발명의 추가의 비이온성 계면활성제 시스템으로서 사용하기에 적당하다. 이들 화합물의 소수성 부분은 바람직하게는 약 1500 내지 약 1800의 분자량을 가질 것이며, 수불용성을 나타낼 것이다. 이 소수성 부분에 폴리옥시에틸렌 부분을 첨가함으로써 분자 전체의 수용성을 증가시키는 경향이 있으며, 생성물의 액체 특성이 폴리옥시에틸렌 함량이 축합 생성물의 총 중량의 약 50 %가 될 때까지 보유되는데, 이 함량은 에틸렌 옥사이드의 약 40 몰과의 축합에 상응한다. 상업적으로 구할 수 있는 이런 유형의 화합물의 실예로는 바스프사에서 시판하는 Pluronic™ 계면활성제가 있다.

본 발명의 비이온성 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 또한 적당한 것은 에틸렌 옥사이드와, 프로필렌 옥사이드와 에틸렌디아민의 반응의 결과 생성된 생성물과의 축합 생성물이다. 이들 제품의 소수성 부분은 에틸렌디아민과 초과량의 프로필렌 옥사이드의 반응 생성물로 구성되며, 일반적으로 약 2500 내지 약 3000 의 분자량을 갖는다. 이 소수성 부분은 에틸렌 옥사이드를 사용하여 축합 생성물이 폴리옥시에틸렌의 중량의 약 40 내지 약 80 %를 함유할 때까지 축합되며, 약 5,000 내지 약 11,000 의 분자량을 갖는다. 이런 유형의 비이온성 계면활성제의 실예로는 바스프사에서 시판하는 상업적으로 구할 수 있는 Tetronic™ 화합물이 있다.

본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용하기에 바람직한 것은 알킬 페놀의 폴리에틸렌 옥사이드 축합물, 일차 및 이차 지방족 알코올과 약 1 내지 약 25 몰의 에틸렌옥사이드와의 축합 생성물, 알킬다당, 및 그것들의 혼합물이 있다. 가장 바람직한 것은 3 내지 15 개의 에톡시 기를 가지는 C_8-C_{14} 알킬 페놀 에톡실레이트와 2 내지 10 개의 에톡시기를 갖는 C_8-C_{18} 알코올 에톡실레이트 (바람직하게는 평균 C_{10}), 및 그것들의 혼합물이 있다.

매우 바람직한 비이온성 계면활성제는 다음 식의 다수산기의 지방산 아미드 계면활성제이다:

$$R^2 - C - N - Z,$$
$$\quad\quad \| \quad \|$$
$$\quad\quad O \quad R^1$$

상기 식에서, R^1은 H, 또는 C_{1-4} 히드로카르빌, 2-히드록시에틸, 2-히드록시프로필 또는 그것들의 혼합물이고, R^2는 C_{5-31} 히드로카르빌이며, Z는 사슬에 최소한 3 개의 히드록실기가 직접 연결되어 있는 선형 히드로카르빌 사슬을 가지고 있는 폴리히드록시히드로카르빌, 또는 그것의 알콕실화된 유도체이다. 바람직한 것은, R^1이 메틸이고, R^2가 직쇄 C_{11-15} 알킬 또는 C_{16-18} 알킬 또는 알케닐 사슬, 예컨대 코코넛 알킬 또는 그것들의 혼합물이며, Z가 환원성 아민화 반응에서 글루코스, 프룩토스, 말토스 또는 락토스와 같은 환원당으로부터 유도되는 것이다.

매우 바람직한 음이온성 계면활성제에는 알콕실화된 술페이트 계면활성제가 있다. 그것의 실예로는 식 $RO(A)_mSO3M$ 의 수용성 염 또는 산으로, 상기 식에서 R은 불포화된 C_{10}-C_{24} 알킬 또는 C_{10}-C_{24} 알킬 성분을 가지고 있는 히드록시알킬기, 바람직하게는 C_{12}-C_{20} 알킬 또는 히드록시알킬, 보다 바람직하게는 C_{12}-C_{18} 알킬 또는 히드록시알킬이고, A는 에톡시 또는 프로폭시 유니트이며, m은 0 보다 큰 수, 전형적으로 약 0.5 와 약 6 사이, 보다 바람직하게는 약 0.5 와 약 3 사이이고, M은 H 또는 예컨대 금속 양이온 (예를 들면 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 등), 암모늄 또는 치환된-암모늄 양이온일 수 있는 양이온이다. 알킬 프로폭실화된 술페이트 뿐만 아니라 알킬 에톡실화된 술페이트도 본원에 포함된다. 치환된 암모늄 양이온의 구체적인 실예로는 메틸-, 디메틸, 트리메틸-암모늄 양이온 및 4차 암모늄 양이온, 예컨대 테트라메틸-암모늄 및 디메틸 피페리디늄 양이온 및 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 그것의 혼합물로부터 유도된 양이온 등이 있다. 예시적인 계면활성제는 C_{12}-C_{18} 알킬 폴리에톡실레이트 (1.0) 술페이트 (C_{12}-$C_{18}E(1.0)M$), C_{12}-C_{18} 알킬 폴리에톡실레이트 (2.25) 술페이트 (C_{12}-$C_{18}E(2.25)M$), C_{12}-C_{18} 알킬 폴리에톡실레이트 (3.0) 술페이트 (C_{12}-$C_{18}E(3.0)M$), 및 C_{12}-C_{18} 알킬 폴리에톡실레이트 (4.0) 술페이트 (C_{12}-$C_{18}E(4.0)M$)이며, 여기서 M은 편리하게도 나트륨 및 칼륨으로부터 선택된다.

사용될 적당한 음이온성 계면활성제는 문헌 ("The Journal of the American Oil Chemists Society", 52 (1975), pp. 323-329)에 따라 수성 SO_3로 술폰화된 C_8-C_{20} 카르복실산의 선형 에스테르 (즉, 지방산)를 포함하는 알킬 에스테르 술포네이트 계면활성제이다. 적당한 출발 물질은 탈로우, 팜유 등으로부터 유도된 대로의 천연 지방 계면활성제를 포함할 것이다.

특히 세탁용으로 적용되는 바람직한 알킬 에스테르 술포네이트 계면활성제는 다음 구조식의 알킬 에스테르 술포네이트 계면활성제를 포함한다:

$$\begin{array}{l} \quad\quad\quad O \\ \quad\quad\quad \| \\ R^3 - CH - C - OR^4 \\ \quad\quad | \\ \quad\quad SO_3M \end{array}$$

상기 식에서, R^3은 C_8-C_{20} 히드로카르빌, 바람직하게는 알킬, 또는 그것의 조합이고, R^4는 C_1-C_6 히드로카르빌, 바람직하게는 알킬, 또는 그것들의 조합이며, M은 알킬 에스테르 술포네이트와 수용성 염을 형성하는 양이온이다. 적당한 염-형성 양이온은 나트륨, 칼륨, 및 리튬과 같은 금속, 및 모노에탄올아민, 디에토놀아민, 및 트리에탄올아민과 같은 치환된 또는 비치환된 암모늄 양이온이다. 바람직한 것은, R^3이 C_{10}-C_{16} 알킬이고, R^4가 메틸, 에틸 또는 이소프로필인 것이다. 특히 바람직한 것은 R^3이 C_{10}-C_{16} 알킬인 메틸 에스테르 술포네이트이다.

다른 적당한 음이온성 계면활성제로는 식 $ROSO_3M$ 의 수용성 염 또는 산인 알킬 술페이트 계면활성제가 있다. 상기 식에서, R은 바람직하게는 C_{10}-C_{24} 히드로카르빌, 바람직하게는 C_{10}-C_{20} 알킬 성분을 가지고 있는 알킬 또는 히드록시알킬, 보다 바람직하게는 C_{12}-C_{18} 알킬 또는 히드록시알킬이고, M은 H 또는 양이온, 예컨대 알칼리 금속 양이온 (예컨대 나트륨, 칼륨, 리튬), 또는 암모늄 또는 치환된 암모늄 (예컨대 메틸-, 디메틸-, 및 트리메틸 암모늄 양이온 및 사차 암모늄 양이온, 예컨대 테트라메틸-암모늄 및 디메틸 피페리디늄 양이온 및 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 및 그것의 혼합물로부터 유도된 사차 암모늄 양이온, 등)이다. 전형적으로, C_{12}-C_{16} 의 알킬 사슬이 낮은 세척 온도 (예컨대 약 50 ℃ 미만)에 바람직하며, C_{16}-C_{18} 알킬 사슬이 보다 높은 세척 온도 (예컨대 약 50 ℃ 이상)에 바람직하다.

세제 목적에 유용한 다른 음이온성 계면활성제가 또한 본 발명의 세탁물 세제 조성물에 포함될 수 있다. 그것들은 비누의 염 (예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 및 치환된 암모늄 염, 예를 들어 모노-, 디- 및 트리에탄올아민 염), C_8-C_{22} 일차 또는 이차 알칸술포네이트, C_8-C_{24} 올레핀술포네이트, 영국 특허 명세서 제 1,082,179 호에 설명된 바와 같이 알칼리 토금속 시트레이트의 열분해 생성물의 술폰화에 의해 제조되는 술폰화된 폴리카르복실산, C_8-C_{24} 알킬폴리글리콜에테르술페이트 (10 몰 까지의 에틸렌 옥사이드를 함유하고 있음); 알킬 글리세롤 술포네이트, 지방 아실글리세롤 술포네이트, 지방 올레일 글리세롤 술페이트, 알킬 페놀 에틸렌 옥사이드 에테르 술페이트, 파라핀 술포네이트, 알킬 포스페이트, 아실 이세티오네이트와 같은 이세티오네이트, N-아실 타우레이트, 알킬 숙시나메이트 및 술포숙시네이트, 술포숙시네이트의 모노에스테르 (특히 포화된 및 불포화된 C_{12}-C_{18} 모노에스테르) 및 술포숙시네이트의 디에스테르 (특히 포화된 및 불포화된 C_6-C_{12} 디에스테르), 아실 사르코시네이트, 알킬폴리글루코시드의 술페이트와 같은 알킬 다당의 술페이트 (하기에서 설명되는 비이온성 비술폰화된 화합물), 분지된 일차 알킬 술페이트, 및 식 $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO-M+$ 으로 표시되는 것과 같은 알킬 폴리에톡시 카르복실레이트 (상기 식에서, R은 C_8-C_{22} 알킬이고, k는 1 내지 10 의 정수이며, M은 가용성 염 형성 양이온이다)이다. 수지산 및 수소처리된 수지산, 예컨대 로진, 수소처리된 로진, 및 톨유에 존재하는 또는 톨유로부터 유도되는 수지산 및 수소처리된 수지산도 또한 적당하다.

알킬벤젠 술포네이트가 매우 바람직하다. 특히 바람직한 것은 알킬기가 바람직하게도 10 내지 18 개의 탄소 원자를 가지고 있는 선형 (직쇄) 알킬 벤젠 술포네이트 (LAS)이다.

추가의 실예는 문헌에 소개되어 있다 ["Surface Active Agents and Detergents", Vol. I & II, Schwartz, Perry and Berch]. 그러한 다양한 계면활성제가 또한 일반적으로 미국 특허 제 3,929,678 호에 개시되어 있다 (컬럼 23, 라인 58 ~ 컬럼 29, 라인 23).

본원에서 본 발명의 세탁용 세제 조성물은 전형적으로 그러한 음이온 계면활성제를 약 1 중량 % 내지 약 40 중량 %, 바람직하게는 약 3 중량 % 내지 약 20 중량 % 포함한다.

본 발명의 클리닝 또는 세탁용 세제 조성물은 또한 양이온성, 암포라이틱, 양성이온성, 및 반-극성 계면활성제 뿐만 아니라, 상술된 것 이외의 비이온성 및/또는 음이온성 계면활성제를 포함할 수 있다.

본 발명의 세탁용 세제 조성물에 사용하기에 적당한 양이온성 세제 계면활성제는 하나의 긴 사슬 히드로카르빌기를 가지는 것들이다. 그러한 양이온성 계면활성제의 실예로는 알킬트리메틸암모늄 할로겐화물과 같은 암모늄 계면활성제, 및 하기 식을 가지는 계면활성제들이 있다:

$$[R^2(OR^3)_y][R^4(OR^3)_y]_2R^5N+X-$$

상기 식에서, R^2는 알킬 또는 알킬 사슬에 약 8 내지 약 18 개의 탄소 원자를 가지고 있는 알킬 벤질기이고, 각각의 R^3은 $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-CH_2CH(CH_2OH)-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, 및 그것들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 각각의 R^4는 C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 히드록시알킬, 두 개의 R^4 기를 결합시킴으로써 형성된 벤질 고리 구조, $-CH_2CHOHCHOHCOR^6CHOHCH_2OH$ (R^6은 어떠한 헥소스 또는 약 1000 미만의 분자량을 가지고 있는 헥소스 중합체이다), y가 0 이 아닐 때 수소이고; R^5는 R^4와 같거나 알킬 사슬로, 총 탄소 원자수 또는 $R^2 + R^5$ 가 약 18을 넘지 않으며; 각각의 y는 0 내지 약 10 이고, y 값의 합은 0 내지 약 15 이며; X는 어떠한 부합하는 음이온이다.

매우 바람직한 양이온성 계면활성제는 다음 식을 가지며 본 발명의 조성물에 유용한 수용성 사차 암모늄 화합물이다:

$$R_1R_2R_3R_4N^+X^- \qquad (i)$$

상기 식에서, R_1은 C_8-C_{16} 알킬이고, R_2, R_3 및 R_4의 각각은 독립적으로 C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 히드록시알킬, 벤질, 및 $-(C_2H_{40})_xH$ (x는 2 내지 50이다)이며, X는 음이온이다. R_2, R_3 또는 R_4 중 하나 이상이 벤질이어서는

안된다.

R_1에 대한 바람직한 알킬 사슬 길이는 C_{12}-C_{15}이며, 특히 알킬기가 코코넛 또는 야자의 인 (kernel) 지방으로부터 유도된 사슬 길이의 혼합물이거나 또는 올레핀 구성 또는 OXO 알코올 합성에 의해 합성적으로 유도되는 것일 때 그러하다.

R_2, R_3 및 R_4 에 대하여 바람직한 기는 메틸 및 히드록시에틸기이고, 음이온 X는 할라이드, 메토술페이트, 아세테이트 및 포스페이트 이온으로부터 선택될 수 있다.

상기 식 (i)의 사차 암모늄 화합물의 적당한 실예는 다음과 같다:

코코넛 트리메틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

코코넛 메틸 디히드록시에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

데실 트리에틸 암모늄 클로라이드;

데실 디메틸 히드록시에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

C_{12-15} 디메틸 히드록시에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

코코넛 디메틸 히드록시에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

미리스틸 트리메틸 암모늄 메틸 술페이트;

라우릴 디메틸 벤질 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

라우릴 디메틸 (에테녹시)$_4$ 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드;

콜린 에스테르 (R_1이 $CH_2-CH_2-O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-C_{12-14}$ 알킬

이고 $R_2R_3R_4$가 메틸인 식 (i)의 화합물);

디알킬 이미다졸린 (식 (i)의 화합물).

본원에 유용한 다른 양이온성 계면활성제는 또한 미국 특허 제 4,228,044 호 및 EP 000 224 에 설명되어 있다.

본원에 포함될 때, 본 발명의 세탁 세제 조성물은 전형적으로 0.2 내지 약 25 중량 %, 바람직하게는 약 1 내지 약 8 중량 % 의 그러한 양이온성 계면활성제를 포함한다.

암포라이틱 계면활성제가 또한 본 발명의 세탁 세제 조성물에 사용하기에 적당하다. 이들 계면활성제는 이차 또는 삼차 아민의 지방족 유도체, 또는 지방족 라디칼이 직쇄이거나 분지쇄일 수 있는 헤테로고리형 이차 및 삼차 아민의 지방족 유도체로서 광범위하게 설명된다. 지방족 치환체중의 하나는 최소한 약 8 개의 탄소 원자, 전형적으로는 약 8 내지 약 18 개의 탄소 원자를 함유하고, 최소한 하나는 음이온성 수-가용화기, 예컨대 카르복시, 술포네이트, 술페이트를 함유한다 (암포라이틱 계면활성제에 대해서는 미국 특허 제 3,929,678 호, 컬럼 19, 라인 18 ~35 참조).

본원에 포함될 때, 본 발명의 세탁 세제 조성물은 전형적으로 약 0.2 내지 약 15 중량 %, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 중량 % 의 그러한 암포라이틱 계면활성제를 포함한다.

양성이온성 계면활성제가 또한 세탁 세제 조성물에 사용하기에 적당하다. 이들 계면활성제는 이차 및 삼차 아민의 유도체, 헤테로고리형 이차 및 삼차 아민의 유도체, 또는 사차 암모늄, 사차 포스포늄 또는 사차 술포늄 화합물의 유도체로서 광범위하게 설명될 수 있다 (양성이온성 계면활성제의 실예는 미국 특허 제 3,929,678 호, 컬럼 19, 라인 38 ~ 컬럼 22, 라인 48 참조).

본원에 포함될 때, 본 발명의 세탁 세제 조성물은 전형적으로 0.2 내지 약 15 중량 %, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 중량 % 의 그러한 양성이온성 계면활성제를 포함한다.

반-극성 비이온성 계면활성제는 비이온성 계면활성제의 특수한 카테고리인데, 그것에는 약 10 내지 약 18 개의 탄소 원자로 이루어진 하나의 알킬 부분과, 약 1 내지 약 3 개의 탄소 원자를 함유하고 있는 알킬기와 히드록시알킬기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 2 부분을 함유하고 있는 수용성 아민 옥사이드; 약 10 내지 약 18 개의 탄소 원자로 이루어진 하나의 알킬 부분과 약 1 내지 약 3개의 탄소 원자를 함유하고 있는 알킬기 및 히드록시알킬기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 2 부분을 함유하는 수용성 포스핀 옥사이드; 및 약 10 내지 약 18 개의 탄소 원자로 이루어진 하나의 알킬 부분과 약 1 내지 약 3개의 탄소 원자를 함유하고 있는 알킬기 및 히드록시알킬기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부분을 함유하는 수용성 술폭시드가 있다.

반-극성 비이온성 세제 계면활성제에는 다음 식을 가지는 아민 옥사이드 계면활성제가 포함된다:

$$R^3(OR^4)xN(R^5)2 \rightarrow O$$

상기 식에서, R^3은 약 8 내지 약 22 개의 탄소 원자를 함유하고 있는 알킬, 히드록시알킬, 또는 알킬 페닐

기 또는 그것들의 혼합물이고; R^4는 약 2 내지 약 3 개의 탄소 원자를 함유하고 있는 알킬렌 또는 히드록시알킬렌 기 또는 그것들의 혼합물이며; x는 0 내지 약 3 이고; 각각의 R^5는 약 1 내지 약 3 개의 탄소 원자를 함유하고 있는 알킬 또는 히드록시알킬기 또는 약 1 내지 약 3 개의 에틸렌 옥사이드기를 함유하고 있는 폴리에틸렌 옥사이드기이다. R^5기는 예컨대 산소 또는 질소 원자를 통하여 서로 부착되어 고리 구조를 형성할 수 있다.

이들 아민 옥사이드 계면활성제로는 특히 C_{10}-C_{18} 알킬 디메틸 아민 옥사이드와 C_8-C_{12} 알콕시 에틸 디히드록시 에틸 아민 옥사이드가 있다.

본원에 포함될 때, 본 발명의 세탁 세제 조성물은 전형적으로 0.2 내지 약 15 중량 %, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 중량 % 의 그러한 반-극성 비이온성 계면활성제를 포함한다.

연마제(builder) 시스템

본 발명에 따르는 조성물은 추가로 연마제 시스템을 포함할 수 있다. 어떠한 종래의 연마제 시스템도 본원에 사용하기에 적당하며, 예를 들면 알루미노실리케이트 물질, 실리케이트, 폴리카르복실레이트 및 지방산, 에틸렌디아민 테트라아세테이트와 같은 물질, 아미노폴리포스포네이트와 같은 금속 이온 봉쇄제, 특히 에틸렌디아민 테트라메틸렌 포스폰산 및 디에틸렌 트리아민 펜타메틸렌포스폰산이 있다. 명백한 환경적인 이유로 덜 바람직하긴 하지만, 포스페이트 연마제도 또한 본원에 사용될 수 있다.

적당한 연마제는 무기 이온 교환 물질, 통상적으로는 무기 수화된 알루미노실리케이트 물질, 보다 구체적으로는 수화된 제올라이트 A, X, B, HS 또는 MAP 와 같은 수화된 합성 제올라이트일 수 있다.

다른 적당한 무기 연마제 물질은 적층 실리케이트, 예컨대 SKS-6 (Hoechst)이다. SKS-6은 규산 나트륨으로 구성되는 결정성 적층 실리케이트이다 (Na_2SiO_5).

하나의 카르복시기를 함유하고 있는 적당한 폴리카르복실레이트에는 벨기에 특허 제 831,368호, 821,369호 및 821,370호에 개시된 바와 같은 락트산, 글리콜산 및 그것의 에테르 유도체가 있다. 2 개의 카르복시기를 함유하고 있는 폴리카르복실레이트로는 숙신산, 말론산, (에틸렌디옥시) 디아세트산, 말레산, 디글리콜산, 타르타르산, 타르트론산 및 푸마르산의 수용성 염뿐만 아니라, 독일 특허 공개 번호 2,446,686호 및 2,446,487호, US 3,935,257호에 기재되어 있는 것과 같은 에테르 카르복실레이트, 및 벨기에 특허 제 840,623호에 기재되어 있는 술피닐 카르복실레이트가 있다. 세 개의 카르복시기를 함유하고 있는 폴리카르복실레이트로는 특히 수용성 시트레이트, 아코니트레이트 및 시트라코네이트뿐만 아니라 영국 특허 제 1,379,241호에 개시되어 있는 카르복시메틸옥시숙시네이트와 같은 숙시네이트 유도체, 네덜란드 출원 7205873에 기재되어 있는 락토옥시숙시네이트, 및 영국 특허 제 1,387,447 호에 기재되어 있는 2-옥사-1,1,3-프로판 트리카르복실레이트와 같은 옥시폴리카르복실레이트 물질이 있다.

4 개의 카르복시기를 함유하고 있는 폴리카르복실레이트로는 영국 특허 제 1,261,829호에서 개시된 옥시디숙시네이트, 1,1,2,2-에탄 테트라카르복실레이트, 1,1,3,3-프로판 테트라카르복실레이트, 영국 특허 제 1,398,421호 및 1,398,422호와 미국 특허 제 3,936,448호에 개시되어 있는 술포 치환체 함유 술포숙시네이트 유도체, 및 영국 특허 제 1,082,179호에 기재되어 있는 술폰화된 열분해된 시트레이트가 있으며, 한편 포스폰 치환체를 함유하고 있는 폴리카르복실레이트는 영국 특허 제 1,439,000호에 개시되어 있다.

지환족 및 헤테로고리형 폴리카르복실레이트에는 시클로펜탄-시스,시스,시스-테트라카르복실레이트, 시클로펜타디에니드 펜타카르복실레이트, 2,3,4,5-테트라히드로-퓨란-시스,시스,시스-테트라카르복실레이트, 2,5-테트라히드로-퓨란-시스, 디스카르복실레이트, 2,2,5,5-테트라히드로퓨란-테트라카르복실레이트, 1,2,3,4,5,6-헥산-헥사카르복실레이트 및 소르비톨, 만니톨 및 크실리톨과 같은 다가 알코올의 카르복시메틸 유도체가 있다. 방향족 폴리카르복실레이트로는 영국 특허 제 1,425,343호에 개시된 멜리트산, 피로멜리트산 및 프탈산 유도체가 있다.

상기 열거한 것중에서, 바람직한 폴리카르복실레이트는 분자당 세 개까지의 카르복시기를 함유하고 있는 히드록시카르복실레이트, 보다 구체적으로는 시트레이트이다.

본 조성물에 사용하기에 바람직한 연마제 시스템으로는 제올라이트 A와 같은 수-불용성 알루미노실리케이트의 혼합물 또는 적층 실리케이트의 혼합물 (SKS-6), 및 시트르산과 같은 수용성 카르복실레이트 킬레이트화제가 있다.

본 발명에 따라 세제 조성물에 포함되기에 적당한 킬레이트화제 (chelant)는 에틸렌디아민-N,N'-디숙신산 (EDDS) 또는 그것의 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄, 또는 치환된 암모늄 염, 또는 그것들의 혼합물이다. 바람직한 EDDS 화합물은 유리산 형태 및 그것의 나트륨 또는 마그네슘 염이다. 그러한 바람직한 EDDS의 나트륨염의 실예로는 Na_2EDDS 와 Na_4EDDS가 있다. 그러한 바람직한 EDDS의 마그네슘 염의 실예는 MgEDDS 및 Mg_2EDDS 이다. 본 발명에 따라 조성물에 포함되기에 가장 바람직한 것은 마그네슘 염이다.

바람직한 연마제 시스템에는 제올라이트 A와 같은 수-불용성 알루미노실리케이트 연마제, 및 시트르산과 같은 수용성 카르복실레이트 킬레이트화제가 있다.

과립형 조성물에 사용하기 위한 연마제 시스템의 일부를 형성할 수 있는 다른 연마제 물질로는 알칼리 금속 카보네이트, 중탄산염, 실리케이트와 같은 무기 물질, 및 유기 포스포네이트, 아미노폴리알킬렌 포스포네이트 및 아미노 폴리카르복실레이트와 같은 유기 물질이 있다.

다른 적당한 수용성 유기염은 폴리카르복실산이 2 개 미만의 탄소 원자에 의하여 상호 분리된 최소한 두 개의 카르복실 라디칼을 포함하고 있는 단일- 또는 공-중합체 산 또는 그것들의 염이다.

이런 유형의 중합체는 GB-A-1,596,756에 개시되어 있다. 그러한 염의 실예로는 분자량이 2000 내지 5000인 폴리아크릴레이트와 그것들과 말레산 무수물과의 공중합체가 있으며, 그러한 공중합체는 분자량이

20,000 내지 70,000, 특히 약 40,000 이다.

세제 연마제 염은 보통 조성물의 5 내지 80 중량 % 의 양으로 포함된다. 액체 세제용으로 바람직한 연마제 수준은 5 내지 30 %이다.

효소

만난나제는 본 발명에 따르는 클리닝 또는 세제 조성물에, 바람직하게는 조성물의 0.0001 내지 2 중량 %, 보다 바람직하게는 0.0005 내지 0.5 중량 %, 가장 바람직하게는 0.001 내지 0.1 중량 % 의 순수한 효소 수준으로 혼입된다.

본 발명의 클리닝 조성물은 추가로 필수 엘레먼트로서, 셀룰라제, 아밀라제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 카르보하이드라제를 포함할 수 있다. 바람직하게도, 본 발명의 클리닝 조성물은 만난나제, 아밀라제 및 셀룰라제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 다른 생체연마-형 효소를 포함할 것이다.

본 발명에 사용될 수 있는 셀룰라제는 박테리아성 또는 진균성 셀룰라제이다. 바람직한 것은, 셀룰라제가 5 와 12 사이의 pH 최적 및 50 CEVU/mg (셀룰로스 점성 단위)이상의 비활성을 가지는 것이다. 적당한 셀룰라제는 미국 특허 제 4,435,307호, J61078384 및 WO 96/02653에 개시되어 있는데, 상기 문헌에는 각각 휴미콜라 인솔렌스, 트리코더마, 티에라비아 및 스포로트리쿰으로부터 생성되는 진균성 셀룰라제가 개시되어 있다. EP 739 982호에는 신규한 바실루스 종으로부터 단리된 셀룰라제가 기재되어 있다. 적당한 셀룰라제가 또한 GB-A-2075028; GB-A-2095275; DE-OS-22 47 832 및 WO 95/26398에 개시되어 있다.

그러한 셀룰라제의 실예는 휴미콜라 인솔렌스 (휴미콜라 그리세아 변종 써모이데아)의 스트레인, 특히 스트레인 휴미콜라 인솔렌스, DSM 1800에 의해 제조된 셀룰라제이다. 다른 적당한 셀룰라제는 분자량이 약 50 kD이고, 등전점이 5.5 이며, 415 개의 아미노산을 함유하고 있는, 휴미콜라 인솔렌스로부터 기원한 셀룰라제; 및 휴미콜라 인솔렌스 DSM 1800으로부터 유도된 약 43 kD의 엔도 베타-1,4-글루카나제이며; 바람직한 셀룰라제는 PCT 특허 출원 WO 91/17243에 개시되어 있는 아미노산 서열을 갖는다. 또한 적당한 셀룰라제는 WO 94/21801에 기재되어 있는, 트리코더마 론지브라키아툼으로부터 유도된 EGIII 셀룰라제이다. 특히 적당한 셀룰라제는 색 보호 장점을 가지고 있는 셀룰라제이다. 그러한 셀룰라제의 실예는 WO 96/29397, EP-A-0495257, WO 91/17243, WO 91/17244 및 WO 91/21801에 기재되어 있는 셀룰라제들이다. 다른 직물 보호 및/또는 클리닝 성질을 가지는 적당한 셀룰라제는 WO 96/34092, WO 96/17994 및 WO 95/24471에 기재되어 있는 것들이다.

상기 셀룰라제는 보통 세제 조성물의 0.0001 내지 2 중량 % 의 순수한 효소로 세제 조성물에 혼입된다.

본 발명의 목적을 위하여 바람직한 셀룰라제는 알칼리성 셀룰라제, 즉 7 내지 12의 pH 범위에서 그것의 최대 활성의 최소한 25 %, 보다 바람직하게는 최소한 40 %를 가지는 효소이다. 보다 바람직한 셀룰라제는 7 내지 12 범위의 pH에서 최대 활성을 가지는 효소들이다. 바람직한 알칼리성 셀룰라제는 노보 노르디스크 사에서 등록상표명 Carezyme®하에 시판하는 셀룰라제이다.

아밀라제 (α 및/또는 β)가 탄수화물-기초 얼룩을 제거하기 위하여 포함될 수 있다. WO 94/02597 (Novo Nordisk A/S, 1994년 2월 3일에 공개)에는 돌연변이 아밀라제가 혼입되어 있는 클리닝 조성물이 기재되어 있다 (참조: WO 95/10603, Novo Nordisk A/S, 1995년 4월 20일 공개). 클리닝 조성물에 사용하기 위해 공지되어 있는 다른 아밀라제들로는 α- 및 β-아밀라제가 있다. α-아밀라제는 당업계에 공지이며, 미국 특허 제 5,003,257호; EP 252,666; WO 91/00353; FR 2,676,456; EP 285,123; EP 525,610; EP368,341; 및 영국 특허 명세서 1,296,839호 (Novo)에 개시된 것들이 있다. 다른 적당한 아밀라제들은 WO 94/18314 (1994년 8월 18일에 공개됨) 및 WO 96/05295 (Genencor, 1996년 2월 22일에 공개됨)에 기재되어 있는 안정성이 증가된 아밀라제 및 노보 노르디스크사로부터 구매할 수 있고 WO 95/10603 (1995년 4월에 공개됨)에서 개시된, 추가의 변형을 가지고 있는 아밀라제 변이체이다. 또한 적당한 것은 EP 277 216, WO 95/26397 및 WO 96/23873 (모두 노보 노르디스크사)에 기재되어 있는 아밀라제들이다.

상업적인 α-아밀라제 제품의 실예로는 Genencor사로부터 시판되는 Purafect Ox Am®, 및 노보 노르디스크사로부터 시판되는 Termamyl®, Ban®, Fungamyl® 및 Duramyl®이 있다. WO 95/26397에는 다른 적당한 아밀라제가 기재되어 있다: α-아밀라제는 파데바스® α-아밀라제 활성 검정에 의하여 측정되는 바, 25 내지 55 ℃의 온도 범위에서 및 8 내지 10 범위의 pH에서 Termamyl®의 비활성보다 최소한 25 % 더 큰 비활성을 갖는 것을 특징으로 한다. WO 96/23873 (Novo Nordisk)에 기재되어 있는 상기 효소의 변이체도 적당하다. 활성 수준 및 열안정성과 더 높은 활성 수준의 조합의 견지에서 개선된 성질을 가지고 있는 다른 녹말분해 효소들은 WO 95/35382에 기재되어 있다.

본 발명의 목적에 대해 바람직한 아밀라제들은 상표명 Termamyl, Duramyl 및 Maxamyl하에 시판되는 아밀라제들 또는 WO 96/23873의 SEQ ID NO:2에 개시되어 있는 바와 같은 열안정성이 증가된 것으로 증명된 α-아밀라제 변이체이다.

특수 적용에 바람직한 아밀라제는 알칼리성 아밀라제, 즉 7 내지 12 의 pH 범위에서 그것의 최대 활성의 최소한 10 %, 바람직하게는 최소한 25 %, 가장 바람직하게는 최소한 40 %의 효소 활성을 가지는 효소이다. 보다 바람직한 아밀라제는 7 내지 12 의 pH 범위에서 그것의 최대 활성을 가지는 효소들이다.

녹말분해 효소는 본 발명의 세제 조성물에, 조성물의 0.0001 내지 2 중량 %, 바람직하게는 0.00018 내지 0.06 중량 %, 보다 바람직하게는 0.00024 내지 0.04 중량 %의 순수한 효소의 수준으로 혼입된다.

용어 "펙틴 분해 효소"는 아라비나나제 (EC 3.2.1.99), 갈락타나제 (EC 3.2.1.89), 폴리갈락투로나제 (EC 3.2.1.15), 엑소-폴리갈락투로나제 (EC 3.2.1.67), 엑소-폴리-알파-갈락투로니다제 (EC 3.2.1.82), 펙틴 리아제 (EC 4.2.2.10), 펙틴 에스테라제 (EC 3.2.1.11), 펙테이트 리아제 (EC 4.2.2.2), 엑소-폴리갈락투로네이트 리아제 (EC 4.2.2.9), 및 엔도-1,3-β-크실로시다제 (EC 3.2.1.32), 크실란-1,4-β-크실로시다

제 (EC 3.2.1.37) 및 α-L-아라비노퓨라노시다제 (EC 3.2.1.55)와 같은 헤미셀룰라제를 포함한다. 펙틴 분해 효소는 상기 언급된 효소적 활성의 천연 혼합물이다. 그러므로 펙틴 효소는 펙틴 메틸 에스테르 결합을 가수분해하는 펙틴 메틸에스테라제, 갈락투론산과 분자간의 글리코시드 결합을 절단하는 폴리갈락투로나제, 및 펙트산에 작용하여 α-1→4 글리코시드 결합의 거의 비-가수분해성 절단을 일으켜 갈락투론산의 불포화 유도체를 형성하는 펙틴 트란스엘레미나제 또는 리아제를 포함한다.

펙틴 분해 효소는 본 발명에 따르는 조성물에, 바람직하게는 총 조성물의 0.0001 내지 2 중량 %, 보다 바람직하게는 0.0005 내지 0.5 중량 %, 가장 바람직하게는 0.01 내지 0.1 중량 % 의 순수한 효소 수준으로 혼입된다.

특수 적용에 바람직한 펙틴 분해 효소는 알칼리성 펙틴 분해 효소, 즉 7 내지 12 의 pH 범위에서 그것의 최대활성의 최소한 10 %, 바람직하게는 최소한 25 %, 보다 바람직하게는 최소한 40 %를 가지는 효소들이다. 보다 바람직한 펙틴 분해 효소는 7 내지 12 의 pH 범위에서 그것의 최대 활성을 가지는 효소들이다. 알칼리성 펙틴 분해 효소는 친알칼리성 미생물, 예컨대 박테리아, 진균 및 효모 미생물, 예를 들면 바실루스 종에 의해 생성된다. 바람직한 미생물은 JP 56131376 및 JP 56068393에 기재되어 있는 것과 같이 바실루스 피르무스, 바실루스 써큘란스 및 바실루스 서브틸리스이다. 알칼리성 펙틴 분해 효소에는 갈락투란-1,4-α-갈락투로나제 (EC 3.2.1.67), 폴리-갈락투로나제 활성 (EC 3.2.1.15), 펙틴 에스테라제 (EC 3.1.1.11), 펙테이트 리아제 (EC 4.2.2.2) 및 그것들의 이소효소가 포함되며, 그것들은 에르위니아 종에 의해 생성된다. 바람직한 것은 JP 59066588, JP 63042988 및 World J. Microbiol. Microbiotechnol. (8, 2, 115-120, 1992)에 기재되어 있는 바와 같이 E. chrysanthemi, E. carotovora, E. amylovora, E. herbicola, E. dissolvens 이다. 상기 알칼리성 펙틴 효소는 또한 JP 73006557 및 Agr. Biol. Chem. (1972), 36(2) 285-293에 기재되어 있는 바와 같이 바실루스 종에 의해서도 생성될 수 있다.

용어 크실로글루카나제는 바게닝겐 대학의 빙켄과 포라겐에 의해 설명된 바와 같은 [Vincken & Voragen at Wageningen University, (1994), Plant Physiol. 104, 99-107] 효소 패밀리를 포함하며, 하야시 등에 의해 설명된 바와 같이 크실로글루칸을 분해할 수 있다 [Hayashi et al., (1989) Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 139-168]. 빙켄 등은 트리코더마 비리데로부터 정제된 크실로글루카나제 (엔도-IV-글루카나제)에 의해 분리된 사과의 세포벽의 셀룰로스로부터 크실로글루칸 코팅이 제거되는 것을 증명하였다. 이 효소는 세포벽에 삽입된 셀룰로스를 효소적으로 분해하는 것을 증강시키며, 펙트산에 작용하는 효소와 동조작용을 한다. 기스트-브로카데스사에서 시판하는 Rapidaes LIQ+에는 크실로글루카나제 활성이 함유되어 있다.

이 크실로글루카나제는 본 발명에 따르는 클리닝 조성물에, 바람직하게는 조성물의 0.0001 내지 2 중량 %, 보다 바람직하게는 0.0005 내지 0.5 중량 %, 가장 바람직하게는 0.001 내지 0.1 중량 % 의 순수한 효소의 수준으로 혼입된다.

특수 적용에 바람직한 크실로글루카나제는 알칼리성 크실로글루카나제, 즉 7 내지 12 의 pH 범위에서 그것의 최대활성의 최소한 10 %, 바람직하게는 최소한 25 %, 보다 바람직하게는 최소한 40 %를 가지는 효소들이다. 보다 바람직한 크실로글루카나제는 7 내지 12 의 pH 범위에서 그것의 최대 활성을 가지는 효소들이다.

상기 언급된 효소들은 어떠한 적당한 기원, 예컨대 식물, 동물, 박테리아, 진균 및 효모 기원의 것들이다. 기원은 또한 중온성 (mesophilic) 또는 호극성 (extremophilic) (호저온성, 호냉성, 호열성, 호압성, 친알칼리성, 호산성, 호염성, 등)의 것일 수 있다. 이들 효소의 정제된 또는 정제되지 않은 형태가 사용될 수 있다. 현재, 야생형 효소를, 그것의 성능 효율을 본 발명의 클리닝 조성물에 최적화시키기 위하여 단백질/유전공학적 기법을 통하여 변형시키는 것이 통상적인 일이다. 예를 들어, 변이체를, 그러한 조성물중의 통상적으로 만나게 되는 성분들에 대한 효소의 부합성이 증가되도록 디자인할 수 있다. 또는 달리, 변이체는 효소 변이체의 최적 pH, 표백 또는 킬레이트화 안정성, 촉매 활성 등이 특정 클리닝 적용에 꼭 맞도록 디자인될 수 있다.

특히, 표백 안정성의 경우 산화에 민감한 아미노산 및 계면활성제 부합성에 대해서는 표면 전하에 주의가 집중되어야 한다. 그러한 효소의 등전점은 일부의 하전된 아미노산의 치환에 의해 변형될 수 있다. 예컨대 등전점의 증가는 음이온성 계면활성제와의 부합성을 증가시키는 것을 보조할 수 있다. 효소의 안정성은 추가로 예컨대 추가적인 염 가교의 생성 및 금속 결합 부위에 힘을 가하여 킬레이트화제 안정성을 증가시킴으로써 증가될 수 있다.

표백제

본 발명의 세제 조성물에 포함될 수 있는 추가의 임의 세제 성분으로는 입자 크기가 400 내지 800 미크론인 PB1, PB4 및 과탄산염과 같은 표백제가 있다. 이들 표백제 성분은 하나 또는 둘 이상의 산소 표백제와, 선택된 표백제에 따라 하나 또는 둘 이상의 표백 활성화제를 포함할 수 있다. 산소 표백 화합물은 전형적으로 약 1 내지 약 25 % 의 수준으로 존재할 것이다. 일반적으로, 표백 화합물은 비-액체 제형, 예컨대 과립형 세제의 임의 추가 성분이다.

본원에서 사용하기 위한 표백제 성분은 산소 표백제를 포함하여 세제 조성물에 유용한 표백제라면 어느 것이라도 좋으며, 당업계에는 다른 것들도 공지되어 있다.

본 발명에 적당한 표백제는 활성화된 또는 활성화되지 않은 표백제일 수 있다.

사용될 수 있는 산소 표백제의 한 범주에는 과카르복실산 표백제 및 그것의 염이 포함된다. 이 부류의 표백제의 적당한 실예로는 마그네슘 모노퍼옥시프탈레이트 6수화물, 메타-클로로 과벤조산의 마그네슘 염, 4-노닐아미노-4-옥소퍼옥시부티르산 및 디퍼옥시도데칸디온산이 있다. 그러한 표백제는 US 4,483,781, US 740,446, EP 0 133 354 및 US 4,412,934에 개시되어 있다. 매우 바람직한 표백제는 또한 US 4,634,551에 기재되어 있는 6-노닐아미노-6-옥소퍼옥시카프로산이다.

사용될 수 있는 다른 범주의 표백제는 할로겐 표백제이다. 하이포할라이트 (hypohalite) 표백제의 실예로는 예컨대 트리클로로 이소시아누르산 및 나트륨 및 칼륨 디클로로이소시아누레이트 및 N-클로로 및 N-브

로모 알칸 술폰아미드가 있다. 그러한 물질들은 보통 최종 제품의 0.5 내지 10 중량 %, 바람직하게는 1 내지 5 중량 % 의 양으로 첨가된다.

과산화수소 방출제, 예컨대 테트라아세틸에틸렌디아민 (TAED), 노나노일옥시벤젠술포네이트 (NOBS, US 4,412,934 에 기재되어 있음), 3,5-트리메틸헥사놀옥시벤젠술포네이트 (ISONOBS, EP 120 591) 또는 펜타아세틸글루코스 (PAG)와 같은 것들이 표백 활성화제와 함께 사용될 수 있으며, 이것들은 과가수분해되어 활성 표백 종으로서 과산을 형성하고, 그로써 개선된 표백 효과를 유도한다. 또한, 표백 활성화제 C8(6-옥탄아미도-카프로일) 옥시벤젠-술포네이트, C9(6-노난아미도 카프로일) 옥시벤젠술포네이트 및 C10 (6-데칸아미도 카프로일) 옥시벤젠술포네이트 또는 그것들의 혼합물도 매우 적당한다. 또한 적당한 활성화제는 예컨대 유럽 특허 출원 91870207.7에 기재되어 있는 것과 같은 아실화된 시트레이트 에스테르이다.

과옥시산 및, 본 발명에 따르는 클리닝 조성물에 사용하기 위한 표백 활성화제 및 과산소 표백 화합물을 포함하고 있는 표백 시스템을 포함하여 유용한 표백제가 USSN 08/136,626에 기재되어 있다.

과산화수소가 또한 세척 및/또는 헹굼 과정을 시작할 때 또는 중간에 과산화수소를 생성할 수 있는 효소 시스템 (즉 효소와 그것에 대한 기질)을 첨가함으로써 존재할 수 있다. 그러한 효소 시스템은 유럽 특허 출원 EP 0 537 381에 기재되어 있다.

산소 표백제 이외의 표백제가 또한 당업계에 공지이며, 본원에서도 활용될 수 있다. 특별한 관심을 끄는 한 유형의 비-산소계 표백제로는 광활성화된 표백제, 예컨대 술폰화된 아연 및/또는 알루미늄 프탈로시아닌이 있다. 이들 물질은 세척 공정중에 기질위에 침착될 수 있다. 빛을 쪼이면, 산소가 있는 경우, 예컨대 의류를 건조시키기 위하여 낮에 걸어놓으면, 술폰화된 아연 프탈로시아닌이 활성화되고, 따라서 기질이 표백된다. 바람직한 아연 프탈로시아닌 및 광활성화된 표백 과정은 US 4,033,718에 기재되어 있다. 전형적으로, 세제 조성물은 약 0.025 내지 약 1.25 중량 %의 술폰화된 아연 프탈로시아닌을 함유할 것이다.

표백제는 또한 망간 촉매를 포함할 수 있다. 망간 촉매는 예컨대 문헌에 기재된 화합물의 것일 수 있다 ["Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, pp. 637-639].

비누거품 억제제

다른 임의의 성분은 비누거품 억제제로, 실리콘, 및 실리카-실리콘 혼합물을 예로 들 수 있다. 실리콘은 일반적으로 알킬화된 폴리실옥산 물질이 대표적이며, 실리카는 보통 미세하게 분할된 형태로, 예컨대 실리카 에어로겔 및 제로겔 및 다양한 유형의 소수성 실리카로 사용된다. 이들 물질은 과립으로 혼입될 수 있는데, 비누거품 억제제는 유익하게도 수용성 또는 수-분산성, 실질적으로는 비 표면-활성 세제 불투과성 담체로 서서히 방출되도록 혼입된다. 또는 달리 비누거품 억제제는 액체 담체로 용해되거나 분산될 수 있고, 하나 또는 둘 이상의 다른 성분들위에 분무에 의해 적용될 수도 있다.

바람직한 실리콘 비누거품 조절제는 US 3,933,672에 개시되어 있다. 다른 특별히 유용한 비누거품 억제제는 독일 특허 출원 DTOS 2,646,126에 기재되어 있는 자체-유화 실리콘 비누거품 억제제이다. 그러한 화합물의 실예는 다우 코닝사로부터 시판되는, 실록산-글리콜 공중합체인 DC-544이다. 특히 바람직한 비누거품 조절제는 실리콘 오일과 2-알킬-알칸올과의 혼합물을 포함하고 있는 비누거품 억제제 시스템이다. 적당한 2-알킬-알칸올은 상표명 Isofol 12 R 하에 시판되는 2-부틸-옥탄올이다.

그러한 비누거품 억제제 시스템은 유럽 특허 출원 EP 0 593 841에 기재되어 있다.

특히 바람직한 실리콘 비누거품 조절제는 유럽 특허 출원 92201649.8에 기재되어 있다. 상기 조성물은 Aerosil® 과 같은 훈증된 비정질 실리카와 조합된 실리콘/실리카 혼합물을 포함할 수 있다.

상술된 비누거품 억제제는 보통 조성물의 0.001 내지 2 중량 %, 바람직하게는 0.01 내지 1 중량 %의 수준으로 사용된다.

다른 성분들

세제 조성물에는 다른 성분들, 예컨대 얼룩-현탁제, 얼룩-방출제, 광학 증백제, 마모제, 살균제, 변색 억제제, 착색제, 및/또는 캡슐화되었거나 캡슐화되지 않은 방향제가 사용될 수 있다.

특히 적당한 캡슐화 물질은 예컨대 GB 1,464,616에 기재되어 있는 것과 같은 다당과 다가 화합물과의 매트릭스로 구성된 수용성 캡슐이다.

다른 적당한 캡슐화 물질로는 US 3,455,838에 개시되어 있는 것과 같은 치환된 디카르복실산의 젤라틴화되지 않은 전분 산 에스테르로부터 유도된 덱스트린이 있다. 이들 산-에스테르 덱스트린은 바람직하게는, 옥수수 녹말, 수수 녹말, 사고 녹말, 타피오카 및 감자 녹말과 같은 전분으로부터 제조된다. 상기 캡슐화 물질의 적당한 실예는 내셔날 스타치사에 의해 제조되는 N-Lok 이다. N-Lok 캡슐화 물질은 변형된 옥수수 녹말과 글루코스로 구성된다. 전분은 옥테닐 숙신산 무수물과 같은 단일 기능의 치환기를 첨가함으로써 변형된다.

본원에 적당한 재침착방지제 및 얼룩 현탁제로는 셀룰로스 유도체, 예컨대 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 및 히드록시에틸셀룰로스와, 단일- 또는 공-중합체성폴리카르복실산 또는 그것들의 염이 있다. 이 유형의 중합체에는 연마제로서 앞서 언급되었던 폴리아크릴레이트 및 말레산 무수물-아크릴산 공중합체 뿐만 아니라, 말레산 무수물과 에틸렌, 메틸비닐 에테르 또는 메타크릴산과의 공중합체가 있고, 말레산 무수물은 공중합체의 최소한 20 몰 %를 구성한다. 이들 물질은 보통 조성물의 0.5 내지 10 중량 %, 보다 바람직하게는 0.75 내지 8 중량 %, 가장 바람직하게는 1 내지 6 중량 % 의 양으로 사용된다.

바람직한 광학 증백제는 음이온성으로, 예를 들면 디소디움 4,4'-비스-(2-디에탄올아미노-4-아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2:2' 디술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(2-모르폴리노-4-아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)-스틸벤-2:2'-디술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(2,4-디아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤)-2:2'-디술포네이트, 모노소디움 4,4''-비스-(2,4-디아닐리노-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2-술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(2-아닐리노-4-(N-메틸-N-2-히드록시에틸아미노)-s-트리아진-6-일아미

노)스틸벤-2,2'-디술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(4-페닐-2,1,3-트리아졸-2-일)-스틸벤-2,2'-디술포네이트, 디소디움 4,4'-비스-(2-아닐리노-4-(1-메틸-2-히드록시에틸아미노)-s-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2,2' 디술포네이트, 소디움 2(스틸빌-4''-(나프토-1',2':4,5)-1,2,3-트리아졸-2''-술포네이트 및 4,4'-비스(2-술포스티릴)비페닐이 있다.

다른 유용한 중합체 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 특히 분자량이 1000 내지 10000, 보다 구체적으로는 2000 내지 8000, 가장 바람직하게는 약 4000인 것들이다. 이것들은 0.20 내지 5 중량 %, 보다 바람직하게는 0.25 내지 2.5 중량 %의 수준으로 사용된다. 이들 중합체 및 앞서 언급된 단일- 또는 공중합체성 폴리카르복실레이트 염은 전이 금속 불순물이 존재할 때 순백도 유지, 직물 재(ash) 침착, 및 점토, 단백성 및 산화가능한 얼룩에 대한 클리닝 성능을 개선시키는데 가치가 잇다.

본 발명의 조성물에 유용한 얼룩 방출제는 테레프탈산과 다양한 배열의 에틸렌 글리콜 및/또는 프로필렌 글리콜 단위체와의 종래의 공중합체 또는 삼합체이다. 그러한 중합체의 실예는 US 4,116,885 및 4,711,730 호 및 EP 0 272 033호에 개시되어 있다. EP 0 272 033에 따르는 특히 바람직한 중합체는 다음 식을 갖는다:

$(CH_3(PEG)_{43})_{0.75}(POH)_{0.25}[(T\text{-}PO)_{2.8}(T\text{-}PEG)_{0.4}]T(POH)_{0.25}((PEG)_{43}CH_3)_{0.75}$

상기 식에서, PEG는 $-(OC_2H_4)O-$이고, PO는 (OC_3H_6O)이며, T는 $(pOOC_6H_4CO)$이다.

또한 매우 유용한 것은 디메틸 테레프탈레이트, 디메틸 술포이소프탈레이트, 에틸렌 글리콜 및 1,2-프로판디올의 무작위 공중합체와 같은 변형된 폴리에스테르이며, 단부 기는 주로 술포벤조에이트로, 그리고 이차적으로는 에틸렌 글리콜 및/또는 1,2-프로판디올의 모노 에스테르로 구성된다. 목표는 양 단부가 "주로" 술포벤조에이트기에 의하여 캡핑된 중합체를 얻는 것이며, 본 명세서에서 상기 공중합체의 대부분은 술포벤조에이트기에 의해 단부캡핑될 것이다. 그러나, 일부의 공중합체는 완전하게 캡핑되지 않을 것이며, 따라서 그것들의 단부 기는 에틸렌 글리콜 및/또는 1,2-프로판디올의 모노에스테르로 구성될 수 있으며, 그러한 종을 "이차적으로" 구성한다.

본원에서 선택된 폴리에스테르는 약 46 중량 %의 디메틸 테레프탈산, 약 16 중량 %의 1,2-프로판디올, 약 10 중량 %의 에틸렌 글리콜, 약 13 중량 %의 디메틸 술포벤조산 및 약 15 중량 %의 술포이소프탈산을 함유하며, 약 3,000의 분자량을 갖는다. 폴리에스테르 및 그것들의 제조 방법은 EP 311 342에 상세하게 설명되어 있다.

연화제

직물 연화제가 또한 본 발명에 따르는 세탁 세제 조성물에 혼입될 수 있다. 이들 제제는 무기 또는 유기 유형의 것일 수 있다. 무기 연화제는 GB-A-1 400898 및 US 5,019,292에 개시된 스멕타이트 점토를 예로 들 수 있다. 유기 직물 연화제로는 GB-A1 514 276 및 EP 0 011 340에 기재되어 있는 수불용성 삼차 아민과, EP-B-0 026 528에 기재되어 있는, 그것들과 모노 C_{12}-C_{14} 사차 암모늄 염과의 조합 및 EP 0 242 919에 기재되어 있는, 그것들과 2 개의 긴 사슬 아미드와의 조합이 있다. 직물 연화 시스템의 다른 유용한 유기 성분으로는 EP 0 299 575 및 0 313 146에 개시되어 있는 것과 같은 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드 물질이 있다.

스멕타이트 점토의 수준은 보통 5 내지 15 중량 %, 바람직하게는 8 내지 12 중량 % 의 범위이며, 제형의 나머지에 건조 혼합 성분으로서 첨가된다. 수불용성 삼차 아민 또는 2개의 긴 사슬 아미드 물질과 같은 유기 직물 연화제는 0.5 내지 5 중량 %, 보통 1 내지 3 중량 % 의 수준으로 혼입되는 한편, 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드 물질과 수용성 양이온성 물질은 0.1 내지 2 중량 %, 보통은 0.15 내지 1.5 중량 % 의 수준으로 첨가된다. 이들 물질은 통상 조성물의 분무 건조된 부분으로 첨가되지만, 어떤 경우에는 건조 혼합 과립으로서, 또는 조성물의 다른 고체 성분들위에 분무되어 용융된 액체 형태로 첨가되는 것이 보다 편리하기도 하다.

중합체 염료-전달 억제제

본 발명에 따르는 세제 조성물에는 또한 0.001 내지 10 중량 %, 바람직하게는 0.01 내지 2 중량 %, 보다 바람직하게는 0.05 내지 1 중량 %의 중합체 염료-전달 억제제가 포함될 수 있다. 상기 중합체 염료-수송 억제제는 보통 착색된 직물로부터 그것과 함께 세척되는 다른 직물위로 염료가 전달되는 것을 억제하기 위하여 세제 조성물에 혼입된다. 이들 중합체는 염료가 세척중에 있는 다른 물품에 부착될 기회를 갖기 전에 착염된 직물에서 씻겨나온 변색되기 쉬운 염료를 착화합물로 만들거나 또는 흡착할 수 있는 능력을 가지고 있다.

특히 적당한 중합체 염료-전달 억제제는 폴리아민 N-옥사이드 중합체, N-비닐피롤리돈과 N-비닐이미다졸과의 공중합체, 폴리비닐피롤리돈 중합체, 폴리비닐옥사졸리돈 및 폴리비닐이미다졸 또는 그것들의 혼합물이다.

그러한 중합체들의 첨가는 또한 본 발명에 따르는 효소의 성능을 증가시킨다.

종이 펄프 산업에의 이용

나아가, 본 발명의 만난나제는 종이 펄프 (합성 펄프, 반합성 펄프, 기계식 펄프 또는 크래프트 펄프)의 명도를 증가시키기 위하여 종이 펄프에 대한 염소-유리 표백 과정에 유용하며, 그로써 표백 과정에서 과산화수소에 대한 필요가 감소되거나 또는 제거되는 것으로 예상된다.

직물 및 셀룰로스성 섬유 처리 산업에의 이용

본 발명의 만난나제는 세제와 조합하여 섬유의 제조를 위해 또는 섬유의 클리닝을 위해 다른 탄수화물 분해 효소 (예컨대 크실로글루카나제, 크실라나제, 다양한 펙티나제)와 조합 사용될 수 있다.

본 명세서에서, 용어 "셀룰로스성 물질"은 면, 면 혼합물 또는 천연 또는 인조 셀룰로스 (예컨대 목재 펄

프로부터와 같이 크실란-함유 셀룰로스 섬유로부터 만들어지는) 또는 그것들의 혼합물로부터 제조된 니트, 직포, 데님, 실, 및 수건감을 포함한 섬유, 재봉된 및 재봉되지 않은 직물을 의미하는 것으로 의도된다. 혼합물의 실예는 면 또는 레이온/비스코스와 하나 또는 둘 이상의 한 짝의 물질, 예컨대 울, 합성 섬유 (예컨대 폴리아미드 섬유, 아크릴 섬유, 폴리에스테르 섬유, 폴리비닐 알코올 섬유, 폴리비닐 클로라이드 섬유, 폴리비닐리덴 클로라이드 섬유, 폴리우레탄 섬유, 폴리우레아 섬유, 아라미드 섬유), 및 셀룰로스-함유 섬유 (예컨대 레이온/비스코스, 섬모시, 대마, 아마/린넨, 황마, 셀룰로스 아세테이트 섬유, 라이오셀)와의 혼합물이다.

직물 산업에 사용하기 위한 셀룰로스성 물질, 예컨대 면 섬유의 의류 제조용 물질로의 가공처리는 여러 단계를 포함한다: 섬유의 실로의 방적; 실로부터의 제직 또는 편직 직물의 제조 및 후속되는 제조, 염색 및 마감처리 조작 단계. 제직된 제품은 일련의 날실사이에 씨실을 짜 넣음으로써 제조된다; 실은 두가지의 상이한 유형일 수 있다.

디사이징: 만난, 전분, CMC 또는 PVA 와 같은 중합체 크기는 날실의 속도를 증가시키기 위하여 제직전에 첨가된다. 이 물질은 추가의 처리과정전에 제거되어야 한다. 본 발명의 효소는 만난 함유 크기의 제거에 유용하다.

증후제(thickener)의 분해

구아르 고무 및 구주콩 깍지 고무와 같은 갈락토만난은 예컨대 식품 및 T-셔츠위의 프린트와 같은 직물 프린팅용 프린트 페이스트에 증후제로서 광범위하게 사용된다. 본 발명에 따르는 효소 또는 효소 제제는 가공처리 장비의 잔여 식품의 점성을 감소시키는데 사용될 수 있고, 그로써 가공처리후의 클리닝을 용이하게 해준다. 나아가, 효소 또는 효소 제제는 프린트 페이스트의 점성을 감소시키는데 유용하며, 따라서 직물 프린팅후 잔여 프린트 페이스트의 세척을 용이하게 해준다.

식물 재료의 분해 또는 변형

본 발명에 따르는 효소 또는 효소 제제는 바람직하게는 식물로부터 기원하는 만난, 갈락토만난, 글루코만난 또는 갈락토글루코만난 함유 물질의 분해 또는 변형을 위한 제제로서 사용된다. 그러한 물질의 실예는 구아르 고무와 구주콩 깍지 고무이다.

본 발명의 만난나제는 점성같은 식물 유도 물질의 물리적-화학적 성질을 변형시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 만난나제는 만난을 함유하고 있는 사료 또는 식품의 점성을 감소시키고, 점성 만난 함유 물질의 가공처리를 촉진시키기 위하여 사용될 수 있다.

커피 추출

본 발명의 효소 또는 효소 제제는 또한 액상 커피 추출물에 존새하는 갈락토만난을 가수분해하기 위하여, 바람직하게는 (인스탄트) 커피의 낸동건조중에 겔 형성을 억제하기 위하여 사용될 수 있다.
바람직하게도, 본 발명의 만난나제는 효소 소모를 감소시키고 커피의 오염을 피하기 위하여 고정된다. 이 용도는 EP-A-676 145에 보다 상세하게 설명되어 있다.

지하층의 균열에의 이용 (오일 드릴링)

나아가, 본 발명의 효소는 미국 특허 제 5,806,597호, 5,562,160호, 5,201,370호 및 5,067,566호 (BJ Services Company, Houston, TX, USA)에 기재되어 있는 것과 같이 효소 브레이커로서 유용한 것으로 예상된다.

따라서, 본 발명의 만난나제는 갱정의 구멍에 지하층을 균열하는 방법에 유용한데, 이 방법에서 겔화가능한 균열 유체가 먼저 수성 유체, 수화가능한 중합체, 중합체 겔을 형성하기 위한 수화가능한 중합체를 교차 결합시키기 위한 적당한 교차결합제 및 효소 브레이커, 즉 본 발명의 효소와 함께 섞음으로써 형성된다. 교차 결합된 중합체 겔은 주변 층을 균열시키기에 충분한 압력하에 갱정의 구멍에 펌프되어 들어간다. 효소 브레이커는 시간이 경과함에 따라 교차결합된 중합체를 분해하여 유체의 점성을 감소시키고, 따라서 유체가 층의 밑으로부터 갱정의 표면으로 펌핑될 수 있게 된다.

효소 브레이커는 균열 유체 또는 추가로 수화가능한 중합체 및 교차결합제를 포함하는 브레이커-교차결합제-중합체 복합체의 한 성분일 수 있다. 균열 유체 또는 복합체는 겔이거나 겔화될 수 있다. 복합체는 갱정 구멍내에 있는 원하는 위치에 충분한 압력하에 유체를 펌핑하여 주변의 지하층을 균열함으로써, 갱정 구멍 주위의 지하층을 균열하기 위한 균열용 유체에 복합체를 사용하는 방법에 유용하다. 복합체는 유체가 갱정 구멍의 원하는 위치에 있고 원하는 균열이 완성될 때까지 특정 pH 및 온도 조건을 유지함으로써, 실질적으로 비-반응성 상태로 유지될 수 있다. 일단 균열이 완성되면, 복합체가 비활성이 되는 특정 조건은 더 이상 유지되지 않는다. 조건이 충분히 변하면, 복합체는 활성이 되고 브레이커는 중합체 분해를 촉매하기 시작하여 균열 유체가 충분히 유체가 되어 지하층으로부터 갱정 표면으로의 유체 펌핑이 유도된다.

재료 및 방법

활성 시험을 위한 검정

만난나제 활성을 가지고 있는 본 발명의 폴리펩티드는 당업계에 공지된 표준 시험 과정에 따라, 예를 들면 시험하고자 하는 용액을 0.2 % 의 AZCL 갈락토만난 (carob), 즉 메가자임 회사로부터 CatNo.I-AZGMA로서 시판되는 엔도-1,4-베타-D-만난나제의 검정용 기질을 함유하고 있는 아가 플레이트에 천공된 4 mm 직경의 구멍에 적용됨으로써 시험될 수 있다 (메가자임의 인터넷 주소: http://www.megazyme.com/Purchase/index.html).

만난나제의 촉매 활성 (ManU)의 측정

비색 검정

기질: 0.1 M 글리신 완충액, pH 10.0 중의 carob로부터의 0.2 % AZCL-갈락토만난 (Megazyme, Australia)

검정은 교반되는 열혼합기위의 1.5 ml 에펜도르프 마이크로 튜브에서 및 40 ℃로 조절되는 온도에서 수행된다. 0.750 ml의 기질을 0.05 ml의 효소와 함께 20 분동안 인큐베이션하고, 4 분동안 15000 rpm에서 원심분리한다. 상층액의 색을 600 nm에서 1 cm 의 큐벳에서 측정한다.

1 ManU (만난나제 유니트)는 1 cm 큐벳에서 0.24의 흡광도를 나타낸다.

스트레인 및 공여 유기체

상기 언급된 바실루스 sp. I633은 SEQ ID NO:1 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12197은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:1)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 바실루스 아가라드해렌스 NCIMB 40482는 SEQ ID NO:5 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12180은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:5)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 바실루스 sp. AAI12는 SEQ ID NO:9 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12433은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:9)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 바실루스 할로듀란스는 SEQ ID NO:11 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12441은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:11)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 휴미콜라 인솔렌스는 SEQ ID NO:13 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 9984는 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:13)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 바실루스 sp. AA349는 SEQ ID NO:15 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12432는 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:15)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

대장균 DSM 12847은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:17)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

대장균 DSM 12848은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:19)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 바실루스 클라우시이는 SEQ ID NO:21 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12849는 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:21)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

대장균 DSM 12850은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:23)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

바실루스 sp.은 SEQ ID NO:25 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12846은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:25)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

바실루스 sp. 은 SEQ ID NO:27 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12851은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:27)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

상기 언급된 바실루스 리케니포르미스는 SEQ ID NO:29 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12852는 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:29)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

바실루스 sp. I633은 SEQ ID NO:31 에 도시된 베타-1,4-만난나제 코드화 DNA 서열을 포함한다.

대장균 DSM 12436은 본 발명의 베타-1,4-만난나제를 코드화하는 DNA (SEQ ID NO:31)를 함유하고 있는 플라스미드를 포함한다.

대장균 스트레인: 대장균 SJ2 의 세포 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B.R.,

Sjoholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol., 172, 4315-4321)를 준비하였고, 그것을 공급자에 의해 설명된 바와 같이 BIO-RAD 사로부터의 Gene PulserTM 일렉트로포레이터를 사용하여 일렉트로포레이션에 의해 형질전환시켰다.

바실루스 서브틸리스 PL2306. 이 스트레인은 공지의 바실루스 서브틸리스 셀룰라제 유전자의 전사 유니트에 파괴된 apr 및 npr 유전자 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B.R., Sjoholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol., 172, 4315-4321)를 가짐으로써 셀룰라제 네가티브 세포가 된 바실루스 서브틸리스 DN1885이다. 파괴는 본질적으로 문헌에 기재된 대로 수행되었다 (Eds. A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and Richard Losick (1993) Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria, American Society for microbiology, p.618).

경합 세포가 준비되었고 문헌에 기재된 대로 형질전환되었다 (Yasbin, R.E., Wilson, G.A. and Young, F.E. (1975) 바실루스 서브틸리스의 용원성 스트레인에서의 형질전환: 경합 세포에서의 프로파지의 선택적인 유도에 대한 증거. J. Bacteriol, 121:296-304).

일반적인 분자 생물학 방법:

다른 언급이 없는 한, 모든 DNA 조작 및 형질전환은 분자 생물학의 표준 방법을 사용하여 수행하였다 (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

DNA 조작을 위한 효소는 제조업자의 지시를 따라 사용하였다 (예컨대 제한 엔도뉴클레아제, 리가제 등은 뉴 잉글란드 바이오랩스 사로부터 구할 수 있다).

플라스미드:

pSJ1678: 국제 특허 출원 공보 WO 94/19454 참조.

pBK-CMV (Stratagene Inc., La Jolla Ca.)

pMOL944. 이 플라스미드는 본질적으로 플라스미드를 바실루스 서브틸리스에서 증식할 수 있도록 만드는 엘레먼트, 카나마이신 내성 유전자를 함유하며, 바실루스 리케니포르미스 ATCC 14580의 amyL 유전자로부터 클론된 강한 프로모터와 신호 펩티드를 가지고 있는 pUB110 유도체이다. 신호 펩티드는 신호 펩티드와 융합된 단백질의 성숙한 부분을 코드화하는 DNA를 클론하는 것을 편리하게 만들어주는 SacII 부위를 함유하고 있다. 이것은 세포의 밖을 향하여 지시되는 프레-단백질의 발현을 초래한다.

플라스미드는 통상적인 유전 공학에 의해 제조되었고, 그것을 하기에서 간단하게 설명한다.

pMOL944 의 제조:

pUB110 플라스미드 (McKenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15:93-103)를 유일한 제한 효소 NciI으로 소화시켰다. 플라스미드 pDN1981 (P.L. Jorgensen et al., 1990, Gene, 96, p37-41)상에 코드화된 amyL 프로모터로부터 증폭된 PCR 단편을 NciI으로 소화시키고, 그것을 NciI 소화된 pUB110에 삽입하여 플라스미드 pSJ2624를 만들었다.

사용된 두 개의 프라이머는 다음의 서열을 가지고 있다:

LWM5494 5'-GTCGCCGGGGCGGCCGCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC-3'

LWM5495 5'-GTCGCCCGGGAGCTCTGATCAGGTACCAAGCTTGTCGACCTGCAGAATGAGGCAGCAA

GAAGAT-3'

프라이머 # LWN5494 는 플라스미드에 NotI 부위를 삽입시킨다.

그런 다음 플라스미드 pSJ2624를 SacI 과 NotI으로 소화시키고, pDN1981상에 코드화된 amyL 프로모터에 대해 증폭된 새로운 PCR 단편을 SacI 및 NotI으로 소화시킨 후, 이 DNA 단편을 SacI-NotI 소화된 pSJ2624에 삽입하여 플라스미드 pSJ2670을 만들었다.

이 클로닝은 첫 번째 amyL 프로모터 클로닝을 동일 프로모터로, 그러나 반대 방향으로 대체시킨다. PCR 증폭에 사용된 두 개의 프로모터는 다음의 서열을 가지고 있다:

#LWN5938 5'-GTCGGCGGCCGCTGATCACGTACCAAGCTTGTCGACCTGCAGAATGAGGCAGCAAG

AAGAT-3'

#LWN5939 5'-GTCGGAGCTCTATCAATTGGTAACTGTATCTCAGC-3'

플라스미드 pSJ2670을 제한 효소 PstI과 BclI으로 소화시키고, 알칼리성 아밀라제 SP722 (특허 # WO9526397-A1)를 코드화하는 클론된 DNA 서열로부터 증폭된 PCR 단편을 PstI 및 BclI으로 소화시킨 후, 삽입하여 플라스미드 pMOL944를 얻었다. PCR 증폭에 사용된 두 개의 프라이머는 다음의 서열을 가지고 있다:

#LWN7864 5'-AACAGCTGATCACGACTGATCTTTTAGCTTGGCAC-3'

#LWN7901 5'-AACTGCAGCCGCGGCACATCATAATGGGACAAATGGG-3'

프라이머 #LWN7901은 플라스미드에 SacII 부위를 삽입한다.

공여 스트레인의 배양 및 게놈 DNA의 분리

관련된 바실루스 스트레인, 예컨대 바실루스 sp. I633을 500 ml의 TY 당 50 ml의 1 M 나트륨-세스퀴카보넷을 첨가함으로써 pH를 대략 9.7 로 조정한 TY에서 성장시켰다. 30 ℃ 및 300 rpm에서 24 시간동안 인큐베이션한 후, 세포를 수확하고, 피쳐 등에 의해 설명된 방법에 의해 게놈 DNA를 분리하였다 (Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R. J.:구아니디움 티오시아네이트를 사용한 박테리아 게놈 DNA의 신속한 추출; Lett. Appl. Microbiol. 1989, 8:151-156).

배지

TY (Ausubel, F.M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995 참조).

LB 아가 (Ausubel, F.M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995 참조).

LBPG는 0.5 % 의 글루코스와 0.05 M 의 인산 칼륨, pH 7.0 이 첨가된 LB 아가이다.

AZCL-갈락토만난은 0.5 % 로 LBPG-아가에 첨가된다. AZCL-갈락토만난은 메가자임사 (오스트레일리아)로부터 구한다.

BPX 배지는 EP 0 506 780 (WO 91/09129)에 설명되어 있다.

NZY 아가: (리터당) 5 g의 NaCl, 2 g의 MgSO4, 5 g의 효모 추출물, 10 g의 NZ 아민 (카세인 가수분해물), 15 g의 아가; 탈이온수를 1 리터가 되도록 첨가하고, NaOH를 사용하여 pH를 7.5로 조정한 후, 오토클레이브한다.

NZY 육즙: (리터당) 5 g의 NaCl, 2 g의 MgSO4, 5 g의 효모 추출물, 10 g의 NZ 아민 (카세인 가수분해물); 탈이온수를 1 리터가 되도록 첨가하고, NaOH를 사용하여 pH를 7.5 로 조정한 후, 오토클레이브한다.

NZY 탑 아가: (리터당) 5 g의 NaCl, 2 g의 MgSO4, 5 g의 효모 추출물, 10 g의 NZ 아민 (카세인 가수분해물), 0.7 % (w/v)의 아가로스; 탈이온수를 1 리터가 되도록 첨가하고, NaOH를 사용하여 pH를 7.5 로 조정한 후, 오토클레이브한다.

다음의 비-제한 실시예는 본 발명을 예시한다.

실시예

실시예 1

바실루스 sp. (I633)로부터 유도된 만난나제

바실루스 sp. I633으로부터의 게놈 라이브러리의 람다ZAPExpress 벡터안에서의 구성

바실루스 sp. I633의 게놈 DNA를 제한 효소 Sau3A로 부분 소화하고, 0.7 % 의 아가로스 겔 (SeaKem agarose, FMC, USA)상에서의 전기영동에 의하여 크기대로 분류하였다. 크기가 1.5와 10 kb 사이인 단편을 분리하여 1.5 % 의 아가로스 겔상에서 DNA 단편을 반대로 달리게 하여 DNA 밴드로 농축시킨 후, Qiaquick 겔 추출 키트를 사용하여 제조업자 (Qiagen Inc., USA)의 지시를 따라 아가로스 겔 슬라이스로부터 단편을 추출하였다. 게놈 라이브러리를 제조하기 위하여, 상기로부터 얻은 100 ng의 정제되고 분획화된 DNA를, 1㎍의 BamHI-절단되고 탈인산화된 람다ZAPexpress 벡터 아암 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)과 24 시간동안 4 ℃에서 제조업자의 지시를 따라 결찰시켰다. 3 ㎕의 결찰 혼합물을 GigaPackIII 골드 팩키징 추출물 (Stratagene, USA)을 사용하여 제조자 (Stratagene)의 지시를 따라 직접 팩키징하였다. 게놈성 람다ZAPExpress 파지 라이브러리를 대장균 XL1-블루 MRF- 스트레인 (Stratagene, La Jolla, USA)을 사용하여 적정하였다. 증폭되지 않은 게놈 라이브러리는 3×10^7 플라크-형성 유니트 (pfu)로 구성되었고, 벡터 바탕값은 1 % 미만이었다.

람다ZAPExpress에서의 기능성 발현에 의한 베타-만난나제 클론에 대한 스크리닝

게놈 라이브러리로부터의 대략 5000 플라크-형성 유니트 (pfu)를 0.1 % 의 AZCL-갈락토만난 (MegaZyme, Australia, cat. no. I-AZGMA)이 함유되어 있는 NZY-아가 플레이트위에, 숙주로서 대장균 XL1-블루 MRF' (Stratagene, USA)를 사용하여 플레이팅하고, 그 플레이트를 37 ℃에서 24 시간동안 인큐베이션하였다. 만난나제-포지티브 람다 클론을, 포지티브 파지 클론주위의 푸른색의 가수분해 할로스의 형성에 의해 확인하였다. 그것들을, 관심의 플라크를 함유하고 있는 TOP-아가 슬라이스를 500 ㎕의 SM 완충액 및 20 ㎕의 클로로포름에 배넣음으로써 스크리닝 플레이트로부터 회수하였다. 만난나제-포지티브 람다ZAPExpress 클론을, 상기와 같이 0.1 % 의 AZCL-갈락토만난이 함유되어 있는 NZY 플레이트위에 속을 빼낸 파지 스톡의 분취액을 플레이팅함으로써 플라크-정제하였다. 단일한 만난나제-포지티브 람다 클론을 500 ㎕의 SM 완충액과 20 ㎕의 클로로포름에 넣고, 상술한 바와 같은 플레이팅 과정을 1 회 더 실시함으로써 정제하였다.

만난나제-포지티브 람다ZAPExpress 클론으로부터 파지미드의 단일-클론 생체내 절출

대장균 XL1-블루 세포 (Stratagene, La Jolla, CA)를 준비하여 스트라타진 (La Jolla, USA)사에 의해 권고되는 바와 같이 10 mM의 MgSO4에 현탁시켰다. 만난나제-포지티브 클론으로부터의 250 ㎕의 순수한 파지 스톡 분취액을, 팔콘 2059 튜브안에서, 200 ㎕의 XL1-블루 MRF' 세포 (OD600=1.0) 및 106 pfu/ml 이상의 ExAssist M13 헬퍼 파지 (Stratagene)와 조합하고, 그 혼합물을 37 ℃에서 15 분동안 인큐베이션하였다. 각 튜브에 3 ml의 NZY 육즙을 첨가하고, 튜브를 37 ℃에서 2.5 시간동안 인큐베이션하였다. 튜브를 65 ℃에서 20 분동안 가열하여 대장균 세포 및 박테리오파지 람다를 죽였다; 파지미드는 가열에 대해 내성이었다. 튜브를 3000 rpm에서 15 분동안 회전시켜서 세포 파편을 제거하고, 상층액을 깨끗한 팔콘 2059 튜브

에 따랐다. 절출된 단일-가닥의 파지미드를 함유하고 있는 상층액의 분취액을 사용하여 200 ㎕의 대장균 XLOLR 세포 (Stratagene, OD600=1.0, in 10 mM MgSO4)와 함께 37 ℃에서 15 분동안 인큐베이션함으로써 감염시켰다. 세포에 350 ㎕의 NZY 육즙을 첨가하고, 튜브를 45 분동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 세포의 분취액을 LB 카나마이신 아가 플레이트위에 플레이팅하고 24 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 5 개의 절출된 단일 콜로니를 0.1 %의 AZCL-갈락토만난 (Megazyme, Australia)이 함유되어 있는 LB 카나마이신 아가 플레이트위에 재-스트리킹하였다. 만난나제-포지티브 파지미드 클론을, 포지티브 콜로니 주변의 푸른색의 가수분해 할로스의 형성에 의하여 특성확인하였다. 이것들을 추가로 EcoRI, PstI, EcoRI-PstI, 및 HindIII를 사용한 단리된 파지미드 DNA (QiaSpin kit, Qiagen, USA)의 제한 효소 소화에 의하여, 그리고 이어지는 아가로스 겔 전기영동에 의하여 분석하였다.

뉴클레오티드 서열 분석

게놈 베타-1,4-만난나제 클론 pBXM3의 뉴클레오티드 서열을, 500 ng의 Qiagen-정제된 주형 (Qiagen, USA), Taq 데옥시-말단 사이클 서열화 키트 (Perkin-Elmer, USA), 형광 표지된 터미네이터 및 5 pmol의 pBK-CMV 폴리링커 프라이머 (Stratagene, USA) 또는 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여, 디데옥시 사슬-종결 방법 (Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467)에 의해 양 가닥으로부터 측정하였다. 서열 데이터의 분석은 문헌의 방법에 따라 수행하였다 [Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387-395].

서열 배열

본 발명의 바실루스 sp. I633으로부터의 글리코하이드롤라제 패밀리 5 베타-1,4-만난나제 (SEQ ID NO:2), 바실루스 써큘란스 (GenBank/EMBL 승인 번호 O66185), 비브리오 sp. (승인 번호 O69347), 스트렙토마이세스 리비단스 (승인 번호 P51529), 및 칼디셀룰로시룹터 사카로라이티쿠스 (승인 번호 P22533)의 다중 서열 배열. 다중 서열 배열은 GCG 위스콘신 소프트웨어 팩키지, 버전 8.1의 파일업 프로그램: 갭 크리에이션 페널티 3.00 및 갭 익스텐젼 페널티 0.10을 사용하여 만들었다.

서열 유사성

바실루스 sp. I633으로부터 클론된 본 발명의 패밀리 5 베타-1,4-만난나제의 추론된 아미노산 서열은 바실루스 써큘란스의 베타-1,4-만난나제 (GenBank/EMBL 승인 번호 O66185)에 대해 75 %의 유사성 및 60.1 %의 서열 동일성을, 비브리오 sp. 로부터 얻어지는 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 O69347)에 대해 64.4 %의 유사성과 44.6 %의 서열 동일성을, 스트렙토마이세스 리비단스로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P51529)에 대해서는 63 %의 유사성과 43.2 %의 동일성을, 그리고 칼디셀룰로시룹터 사카로라이티쿠스로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P22533)에 대해서는 52.5 %의 유사성과 34.4 %의 서열 동일성을 나타낸다. 서열들은 GCG 위스콘신 소프트웨어 팩키지, 버전 8.1의 GAP 프로그램: 갭 크리에이션 페널티 3.00 및 갭 익스텐젼 페널티 0.10을 사용하여 배열되었다.

바실루스 sp (I633) 만난나제 유전자의 클로닝

A. 바실루스 서브틸리스에서의 촉매활성 코아 만난나제 효소의 하위클로닝 및 발현

본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열을 다음의 두 개의 올리고 뉴클레오티드로 구성되는 PCR 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시켰다:

BXM2.upper. SacII

5'-GTT GAG AAA GCG GCC GCC TTT TTT CTA TTC TAC AAT CAC ATT ATC-3'

BXM2.core.lower.NotI

5'-GAC GAC GTA CAA GCG GCC GCT CAC TAC GGA GAA GTT CCT CCA TCA G-3'

제한 부위 SacII와 NotI 에 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 sp. I633으로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)상에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 1.0 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝:

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다. 5 ㎍의 pMOL944와 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NotI으로 소화시키고, 0.8 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NotI 소화되고 정제된 pMOL944에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤 동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를

LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB748로 명명하였다. 클론 MB748을 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 SEQ ID NO:1의 염기쌍 위치 1201에서 1203에 상응하는 아미노산 잔기 번호 331을 대신하는 중지 코돈이 도입된 만난나제의 성숙한 부분 (첨부된 DNA 서열 SEQ ID NO:1의 위치 91에서 990 및 첨부된 단백질 서열 SEQ ID NO:2의 위치 31에서 330에 상응함)에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다.

B. 바실루스 서브틸리스에서의 성숙한 전체 길이의 만난나제의 하위클로닝 및 발현

본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열을 다음의 두 개의 올리고뉴클레오티드로 구성되는 PCR 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시켰다:

BXM2.upper.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AAT TCC GGA TTT TAT GTA AGC GG-3'

BXM2.lower.NotI

5'-GTT GAG AAA GCG GCC GCC TTT TTT CTA TTC TAC AAT CAC ATT ATC-3'

제한 부위 SacII 와 NotI 은 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 sp. I633으로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)상에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 1.5 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝:

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다. 5 ㎍의 pMOL944와 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NotI으로 소화시키고, 0.8 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NotI 소화되고 정제된 pMOL944에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB643으로 명명하였다. 클론 MB643을 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 SEQ ID NO:1 의 위치 317에서 1693 및 SEQ ID NO:2의 위치 33에서 490에 있는 만난나제의 성숙한 부분에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다.

클론 MB643을 500 ml의 격벽이 설치된 두 개의 진동 플라스크에 들어 있는 10 ㎍/ml의 카나마이신이 첨가된 25×200 ml의 BPX 배지중에서 5 일동안 37 ℃에서 및 300 rpm에서 성장시켰다.

아미노산 잔기 번호 341부터 아미노산 잔기 번호 490에 있는 기능이 미지인 C-말단 도메인을 코드화하는 DNA 서열은 공지의 만난나제로부터 X18로 명명된 도메인에 대하여 높은 상동성을 나타냈다. 이 X18은 EMBL 엔트리 AB007123에서 발견된다: Yoshida S., Sako Y., Uchida A.: "구아르 고무를 분해하는 바실루스 써큘란스 K-1로부터의 효소를 코드하는 유전자의 대장균에서의 클로닝, 서열 분석, 및 발현" in Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:514-520 (1998). 이 유전자는 알파 펩티드 (아미노산 1에서 34), 패밀리 5 만난나제 (아미노산 35에서 335), 링커 (아미노산 336에서 362) 및 마지막으로 미지의 기능의 X18 도메인 (아미노산 363에서 516)을 코드한다.

이 X18 도메인은 또한 바실루스 서브틸리스 베타-만난나제 스위스 단백질 데이터베이스 엔트리 P55278에서 발견되는데, 그것은 신호 펩티드 (아미노산 1에서 26), 촉매활성 코아 패밀리 26 만난나제 (아미노산 27에서 360) 및 미지의 기능의 X18 단백질 도메인 (아미노산 361에서 513)을 코드하는 유전자를 나타낸다; (바실루스 서브틸리스 NM-39로부터의 베타-만난나제 유전자의 클로닝 및 서열화, Mendoza NS;

Arai M; Sugimoto K; Ueda M; Kawaguchi T; Joson LM; Phillippines. In Biochimica Et Biophysica Acta Vol. 1243, No. 3 pp. 552-554 (1995)).

실시예 2

바실루스 sp. I633으로부터의 만난나제의 발현, 정제 및 특성확인

실시예 1 및 재료와 방법 단원에서 설명된 바와 같이 얻어진 클론 MB748을 500 ml의 격벽이 설치된 두 개의 진동 플라스크에 들어 있는 10 ㎍/ml의 카나마이신이 첨가된 25×200 ml의 BPX 배지중에서 5 일동안 37 ℃에서 및 300 rpm에서 성장시켰다.

클론 MB748의 진동 플라스크 배양액 4500 ml을 모아서 pH를 5.6으로 조정하고, 응집을 위해 교반하는 중에 100 ml의 양이온성 제제 (10 % C521) 및 180 ml의 음이온성 제제 (A130)를 첨가하였다. 응집된 물질을 Sorval RC 3B를 사용하여 9000 rpm에서 20 분동안 6 ℃에서 원심분리함으로써 분리하였다. 상층액을 훠트만 유리 필터 GF/D 및 C를 이용하여 정화하고, 마지막으로 10 kDa의 컷오프로 필트론상에 농축시켰다.

이 농축액 700 ml을 수산화 나트륨을 사용하여 pH를 7.5 로 조정하였다. 투명한 용액을 50 mmol 트리스 pH 7.5로 평형화한 1000 ml의 Q-세파로스 칼럼을 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피에 적용하였다. 결합된 만난나제 활성을 염화 나트륨 구배를 사용하여 1100 ml로 용출하였다. 이것을 필트론 막을 사용하여 440 ml로 농축하였다. 매우 순수한 만난나제를 얻기 위하여 농축액을 0.1 M의 아세트산 나트륨, pH 6.0으로 평형화된 슈퍼덱스 200 칼럼을 통과시켰다.

순수한 효소는 SDS-PAGE에서 단일한 밴드로 나타났고, 분자량이 34 kDa였다.

구주콩 깍지 고무를 사용한 정지 상태 역학:

이 검정은 상이한 양의 기질, 구주콩깍지 고무를 사용하여, 20 분동안 40 ℃에서 pH 10, 0.1 M 의 글리신 완충액중에서 인큐베이션한 후, 환원당의 형성을 측정함으로서 수행하였다. 정지 상태 동안 환원당의 마이크로몰 형성의 계산을 위한 표준으로서 글루코스를 사용하였다.

본 발명의 고도로 정제된 만난나제에 대하여 다음의 데이터를 얻었다:

초당 467의 KCat, 표준편차 13;

0.7의 kM, 표준편차 0.07.

계산을 위하여 에리타쿠스 소프트웨어 (Erithacus Software) U.K.로부터의 리더배로우 (Leatherbarrow)에 의한 컴퓨터 프로그램 그래피트 (grafit)를 사용하였다. 환원당은 PHBAH 방법을 사용하여 측정하였다 (Lever, M. (1972), A new reaction for colormetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. 47:273-279).

정제된 단백질의 다음의 N-말단 서열을 측정하였다: ANSGFYVSGTTLYDANG

안정성: 만난나제는 실온에서 2 일동안 인큐베이션된 후 pH 6.0 및 11에서 완전하게 안정하였다. 효소는 낮은 pH에서 침전하였다.

pH 활성 프로필은 효소가 pH 7.5 와 pH 10 사이에서 60 % 이상 활성인 것으로 나타난다.

온도 최적은 50 ℃에서 및 pH 10에서 발견되었다.

DSC 차등 스캐닝 열량측정 결과, 아세트산 나트륨 완충액 pH 6.0에서 용융온도로서 66 ℃를 나타냈고, 이것은 만난나제 효소가 열안정성임을 나타낸다.

면역학적 성질: 토끼의 다클론성 단일특이적 혈청은 덴마크의 회사인 DAKO사에서 사용하는 종래의 기법을 사용하여 고도로 정제된 클론된 만난나제에 대하여 발생시켰다. 이 혈청은 아가로스 겔에서 본 발명의 미정제된 만난나제와 함께 선명한 단일 침전을 형성하였다.

실시예 3

실시예 2 의 효소의 세제에의 이용

완충액 대신 시판중인 세제를 사용하고, 상술된 바와 같이 구주콩나무 등급으로부터의 0.2 % 의 AZCL-갈락토만난 (Megazyme, Australia)과 함께 40 ℃에서 20 분동안 인큐베이션한 후, 푸른색의 형성을 측정함으로써, 활성 여부를 시험하였다. 실시예 2에서 설명된 바와 같이 얻어진 효소는 글리신 완충액중에서 측정된 활성에 대하여, 유럽의 분말 세제 Ariel Futur에서 60 %의 상대 활성을 나타냈고, 유럽의 액체 세제 Ariel Futur에서는 80 %의 상대 활성을 나타냈으며, 미국의 Tide 분말에서는 45 %의 상대 활성을 나타냈고, 미국의 Tide 액체 세제에서는 37 %의 상대 활성을 나타냈다. 이들 시험에서, 상업적인 세제 포장용으로는 세제 농축이 권장되었고, 세탁물은 유럽의 조건 (Ariel Futur) 하에서는 18 도의 독일 경도를 가지는 수둣물이었고, 미국 조건 (US Tide)하에서는 9도의 경도를 가지는 수돗물이었다.

실시예 4

바실루스 sp. I633의 만난나제 (실시예 1 및 2)와 셀룰로스 결합 도메인 (CBD)사이의 융합 단백질의 제조 및 발현

클로스트리디움 써모셀룸 스트레인 YS (Poole D.M.; Morag E.; Lamed R.; Bayer E.A.; Hazlewood G.P.; Gilbert H.J. (1992), 클로스트리디움 써모셀룸 YS로부터의 셀룰로섬 하위단위 S1의 셀룰로스-결합 도메인의 확인, Fems Microbiology Letters Vol. 78, No. 2-3 pp.181-186)로부터의 CipB 유전자의 CBD 코드화 DNA 서열을 앞서 벡터 pMOL1578에 도입시켜놓았다. CBD를 코드화하는 염색체 DNA는 문헌에 기재된 바와 같이 얻을 수 있다 (Poole D.M.; Morag E.; Lamed R.; Bayer E.A.; Hazlewood G.P.; Gilbert H.J. (1992), 클로스트리디움 써모셀룸 YS로부터의 셀룰로섬 하위단위 S1의 셀룰로스-결합 도메인의 확인,

Fems Microbiology Letters Vol. 78, No. 2-3 pp.181-186). CBD를 코드화하는 DNA 샘플을 PCR에 주형으로서 사용하고, CBD를 pMOL944 벡터를 토대로 한 적절한 플라스미드 pMB993에 클론하였다.

pMB993 벡터는 CBD 앞에 있는 펩티드 링커를 가지고 있는 CipB CBD를 함유하고 있다. 링커는 다음의 펩티드 서열: ASPEPTPEPT로 구성되고, 바로 뒤에 CipB CBD가 이어진다. AS 아미노산은 제한 엔도뉴클레아제 부위 NheI를 구성하는 DNA 서열로부터 유도되고, 그것은 본 발명의 만난나제를 클론하는데 사용된다.

만난나제.Upper.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AAT TCC GGA TTT TAT GTA AGC GG-3'

만난나제.Lower.NheI

5'-CAT CAT GCT AGC TGT AAA AAC GGT GCT TAA TCT CG-3'

제한 부위 NheI 및 SacII 는 은 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 sp. I633으로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 0.9 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝:

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다. 5 ㎍의 pMB993 및 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NheI으로 소화시키고, 0.7 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NheI 소화되고 정제된 pMB993에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB1014로 명명하였다. 클론 MB1014를 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 SEQ ID NO:3 및 첨부된 단백질 서열 SEQ ID NO:4에 표시된 바와 같은 만난나제-링커-cbd의 성숙한 부분에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다.

그러므로 최종 구성물은 다음의 관련된 엘레먼트: (amyL-프로모터)-(amyL-신호 펩티드)-만난나제-링커-CBD를 함유한다.

만난나제-CBD 융합 단백질의 발현 및 검출

MB1014를 20 시간동안 TY-배지중에서 37 ℃에서 및 250 rpm에서 인큐베이션하였다. 세포-유리 상층액 1 ml을 밀리포아 H20 에서 200 ㎕의 10 % Avicel (Merck, Darmstadt, Germany)과 혼합하였다. 혼합물을 0.5 시간동안 0 ℃에서 인큐베이션하였다. 이 기간동안 아비셀에 BXM2-링커-CBD 융합 단백질이 결합되고, 단백질이 결합된 아비셀을 5 분동안 5000 g에서 회전시켰다. 생성된 펠릿을 100 ㎕의 SDS-PAGE 완충액에 현탁하고, 그것을 95 ℃에서 5 분동안 끓인 후, 5000 g에서 5 분동안 회전시킨 다음, 25 ㎕를 4 내지 20 %의 라엠리 트리스-글리신, SDS-PAGE NOVEX 겔 (Novex, USA)위에 로딩하였다. 샘플을 XcellTM Mini-Cell (NOVEX, USA)에서 제조자의 지시를 따라 전기영동하였고, 이어지는 쿠마찌로의 염색, 탈염 및 건조를 포함한 모든 겔 조작을 제조자의 지시를 따라 수행하였다.

대략 53 kDa의 단백질 밴드가 나타났고, 이것은 플라스미드 pMB1014위에 코드화된 전체 길이의 만난나제-링커-CBD 융합물이 바실루스 서브틸리스에서 발현되었음을 나타낸다.

실시예 5

바실루스 아가라드해렌스로부터 유도된 만난나제

바실루스 아가라드해렌스로부터의 만난나제 유전자의 클로닝

게놈 DNA 제조

스트레인 바실루스 아가라드해렌스 NCIMB 40482를 WO 94/01532에서 설명된 바와 같이 액체 배지중에서 증식시켰다. 16 시간동안 30 ℃에서 및 300 rpm에서 인큐베이션한 후에, 세포를 수득하고, 게놈 DNA를 피쳐 등에 의해 설명된 방법에 의하여 단리하였다 [Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J. (1989), 구아

니디움 티오시아네이트를 사용한 박테리아 게놈 DNA의 신속한 추출, Lett. Appl. Microbiol., 8, 151-156].

게놈 라이브러리 제조

게놈 DNA를 제한 효소 Sau3A로 부분적으로 소화시키고, 0.7 %의 아가로스 겔상에서의 전기영동에 의하여 크기대로 분류하였다. 크기가 2 와 7 kb 사이인 단편들을 DEAE-셀룰로스 종이위에서의 전기영동에 의하여 단리하였다 (Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1981), 아가로스 및 아크릴아미드 겔로부터 DNA 단편을 회수하는 믿을 수 있는 방법, Anal. Biochem., 112, 295-298).

단리된 DNA 단편을 BamHI 소화된 pSJ1678 플라스미드 DNA에 결찰하고, 그 결찰 혼합물을 사용하여 대장균 SJ2를 형질전환시켰다.

포지티브 클론의 확인

상술된 바와 같이 구성된 대장균내의 DNA의 라이브러리를 0.2 %의 AZCL-갈락토만난 (Megazyme) 및 9 ㎍/ml의 클로르암페니콜이 함유되어 있는 LB 아가 플레이트위에 스크린하고, 그것을 37 ℃에서 하룻밤동안 인큐베이션하였다. 만난나제 활성을 발현하는 클론들은 푸른색의 확산 할로스를 나타냈다. 이들 클론중 하나로부터 플라스미드 DNA를 1 ml의 하룻밤 배양 육즙에 대한 Qiagen 플라스미드 스핀 프렙에 의해 단리하였다 (세포는 37 ℃에서 9 ㎍/ml의 클로르암페니콜이 함유된 TY중에서, 250 rpm에서 진동시키면서 인큐베이션하였다).

이 클론 (MB525)을 클론된 Sau3A DNA 단편의 DNA 서열화에 의해 추가로 특성확인하였다. DNA 서열화는 Taq 데옥시-말단 사이클 서열화 키트 (Perkin-Elmer, USA), 형광 표지된 터미네이터 및 프라이머로서 적절한 올리고뉴클레오티드를 사용하여 프라이머워킹에 의해 수행하였다.

서열 데이터의 분석은 문헌에 따라 수행하였다 [Devereux et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 387-395]. 만난나제를 코드화하는 DNA 서열은 SEQ ID NO:5에 나타낸다. 유도된 단백질 서열은 SEQ ID NO:6에 나타낸다.

바실루스 아가라드해렌스 만난나제의 바실루스 서브틸리스에서의 하위클로닝 및 발현

본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열을 다음의 두 개의 올리고뉴클레오티드로 구성되는 PCR 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시켰다:

만난나제.Upper.SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA GCA AGT ACA GGC TTT TAT GTT GAT GG-3'

만난나제.Lower.NotI

5'-GAC GAC GTA CAA GCG GCC GCG CTA TTT CCC TAA CAT GAT GAT ATT TTC G-3'

제한 부위 NotI 및 SacII 는 은 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 아가라드해렌스 NCIMB 40482로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 1.4 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다. 5 ㎍의 pMOL944 및 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NotI으로 소화시키고, 0.8 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NotI 소화되고 정제된 pMOL944에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB594로 명명하였다. 클론 MB594를 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 만난나제의 성숙산 부분, 즉 첨부된 SEQ ID NO:7의 위치 94 에서 1404에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다. 유도된 성숙한 단백질은 SEQ ID NO:8에 나타낸다. SEQ ID NO:5의 서열에 의하

여 코드화된 만난나제의 3' 단부는 PCR에 사용된 하부 프라이머의 디자인에 의거하여 SEQ ID NO:7에 도시된 것으로 바뀌었음이 드러날 것이다. 그 결과의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:8에 나타내며, SEQ ID NO:6의 C-말단 (SHHVREIGVQFSAADNSSGQTALYVDNVTLR)이 SEQ ID NO:8의 C-말단 (IIMLGK)으로 바뀌었음이 명백하다.

실시예 6

바실루스 아가라드해렌스로부터의 만난나제의 발현, 정제 및 특성확인

실시예 5에서 설명된 바와 같이 얻어진 클론 MB594를, 500 ml의 격벽이 설치된 두 개의 진동 플라스크에 들어 있는 10 ㎍/ml의 카나마이신이 첨가된 25×200 ml의 BPX 배지중에서 5 일동안 37 ℃에서 및 300 rpm에서 성장시켰다.

클론 MB594 (배치 #9813)의 진동 플라스크 배양액 6500 ml을 모아서 pH를 5.5로 조정하였다. 응집을 위해 교반하는 중에 146 ml의 양이온성 제제 (C521) 및 292 ml의 음이온성 제제 (A130)를 첨가하였다. 응집된 물질을 Sorval RC 3B를 사용하여 9000 rpm에서 20 분동안 6 ℃에서 원심분리함으로써 분리하였다. 상층액을 훠트만 유리 필터 GF/D 및 C를 이용하여 정화하고, 마지막으로 10 kDa의 컷오프로 필트론상에 농축시켰다.

이 농축액 750 ml을 수산화 나트륨을 사용하여 pH를 7.5 로 조정하였다. 투명한 용액을 50 mmol 트리스 pH 7.5로 평형화한 900 ml의 Q-세파로스 칼럼을 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피에 적용하였다. 결합된 만난나제 활성을 염화 나트륨 구배를 사용하여 용출하였다.

순수한 효소는 SDS-PAGE에서 단일한 밴드로 나타났고, 분자량이 38 kDa였다.

만난나제 효소의 아미노산 서열, 즉 번역된 DNA 서열을 SEQ ID NO:6 에 나타낸다.

역학 상수의 측정:

기질: 구주콩깍지 고무 (carob) 및 환원당 분석 (PHBAH). Sigma 사로부터의 구주콩깍지 고무 (G-0753).

상이한 농도의 구주콩깍지 고무 및 20 분동안 40 ℃에서 및 pH 10에서의 인큐베이션을 사용한 역학 층정 결과,

Kcat: 1 초당 467

Km: 리터당 0.08 g

MW: 38 kDa

pI (등전점): 4.2

만난나제의 온도 최적은 60 ℃인 것으로 발견되었다.

pH 활성 프로필은 pH 8 과 10 사이에서 최대 활성을 나타냈다.

DSC 차등 스캐닝 열량측정 결과, 트리스 완충액 pH 7.5에서 용융온도로서 77 ℃를 나타냈고, 이것은 만난나제 효소가 열에 매우 안정함을 나타낸다.

기질로서 carob로부터의 0.2 % AZCL-갈락토만난 및 상술된 바와 같인 40 ℃에서의 인큐베이션을 사용한 세제 부합성은 종래의 액체 세제와의 우수한 부합성 및 종래의 분말 세제와의 양호한 부합성을 나타낸다.

실시예 7

본 발명의 효소의 세제에의 이용

실시예 6에서 설명된 바와 같이 얻어진 정제된 효소 (배치 #9813)는 종래의 시판 액체 세제를 사용한 미니워쉬 시험에서 1 ppm 의 수준으로 사용되었을 때 개선된 클리닝 성능을 나타냈다. 시험은 종래의 노오쓰 아메리칸 워쉬 조건하에서 수행하였다.

실시예 8

바실루스 sp. AAI12로부터 유도된 만난나제

바실루스 sp. AAI12로부터의 라이브러리의 제조

바실루스 sp. 의 게놈 DNA를 제한 효소 Sau3A로 부분 소화하고, 0.7 % 의 아가로스 겔 (SeaKem agarose, FMC, USA)상에서의 전기영동에 의하여 크기대로 분류하였다. 크기가 1.5와 10 kb 사이인 단편을 분리하여 1.5 % 의 아가로스 겔상에서 DNA 단편을 반대로 달리게 하여 DNA 밴드로 농축시킨 후, Qiaquick 겔 추출 키트를 사용하여 제조업자 (Qiagen Inc., USA)의 지시를 따라 아가로스 겔 슬라이스로부터 단편을 추출하였다. 게놈 라이브러리를 제조하기 위하여, 상기로부터 얻은 약 100 ng의 정제되고 분획화된 DNA를, 1㎍의 BamHI-절단되고 탈인산화된 람다ZAPexpress 벡터 아암 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)과 24 시간동안 4 ℃에서 제조업자의 지시를 따라 결찰시켰다. 3 ㎕의 결찰 혼합물을 GigaPackIII 골드 팩키징 추출물 (Stratagene, USA)을 사용하여 제조자 (Stratagene)의 지시를 따라 직접 팩키징하였다. 게놈성 람다ZAPExpress 파지 라이브러리를 대장균 XL1-블루 MRF- 스트레인 (Stratagene, La Jolla, USA)을 사용하여 적정하였다. 증폭되지 않은 게놈 라이브러리는 7.8×10^{7} 플라크-형성 유니트 (pfu)로 구성되었고, 벡터 바탕값은 1 % 미만이었다.

람다ZAPExpress에서의 기능성 발현에 의한 베타-만난나제 클론에 대한 스크리닝

게놈 라이브러리로부터의 대략 5000 플라크-형성 유니트 (pfu)를 0.1 % 의 AZCL-갈락토만난 (MegaZyme, Australia, cat. no. I-AZGMA)이 함유되어 있는 NZY-아가 플레이트위에, 숙주로서 대장균 XL1-블루 MRF'

(Stratagene, USA)를 사용하여 플레이팅하고, 그 플레이트를 37 ℃에서 24 시간동안 인큐베이션하였다. 만난나제-포지티브 람다 클론을, 포지티브 파지 클론주위의 푸른색의 가수분해 할로스의 형성에 의해 확인하였다. 그것들을, 관심의 플라크를 함유하고 있는 TOP-아가 슬라이스를 500 ㎕의 SM 완충액 및 20 ㎕의 클로로포름에 빼넣음으로써 스크리닝 플레이트로부터 회수하였다. 만난나제-포지티브 람다ZAPExpress 클론을, 상기와 같이 0.1 % 의 AZCL-갈락토만난이 함유되어 있는 NZY 플레이트위에 속을 빼낸 파지 스톡의 분취액을 플레이팅함으로써 플라크-정제하였다. 단일한 만난나제-포지티브 람다 클론을 500 ㎕의 SM 완충액과 20 ㎕의 클로로포름에 넣고, 상술한 바와 같은 플레이팅 과정을 1 회 더 실시함으로써 정제하였다.

만난나제-포지티브 람다ZAPExpress 클론으로부터 파지미드의 단일-클론 생체내 절출

대장균 XL1-블루 세포 (Stratagene, La Jolla, CA)를 준비하여 스트라타진 (La Jolla, USA)사에 의해 권고되는 바와 같이 10 mM의 MgSO4에 현탁시켰다. 만난나제-포지티브 클론으로부터의 250 ㎕의 순수한 파지 스톡 분취액을, 팔콘 2059 튜브안에서, 200 ㎕의 XL1-블루 MRF' 세포 (OD600=1.0) 및 106 pfu/ml 이상의 ExAssist M13 헬퍼 파지 (Stratagene)와 조합하고, 그 혼합물을 37 ℃에서 15 분동안 인큐베이션하였다. 각 튜브에 3 ml의 NZY 육즙을 첨가하고, 튜브를 37 ℃에서 2.5 시간동안 인큐베이션하였다. 튜브를 65 ℃에서 20 분동안 가열하여 대장균 세포 및 박테리오파지 람다를 죽였다; 파지미드는 가열에 대해 내성이었다. 튜브를 3000 rpm에서 15 분동안 회전시켜서 세포 파편을 제거하고, 상층액을 깨끗한 팔콘 2059 튜브에 따랐다. 절출된 단일-가닥의 파지미드를 함유하고 있는 상층액의 분취액을 사용하여 200 ㎕의 대장균 XLOLR 세포 (Stratagene, OD600=1.0, in 10 mM MgSO4)와 함께 37 ℃에서 15 분동안 인큐베이션함으로써 감염시켰다. 세포에 350 ㎕의 NZY 육즙을 첨가하고, 튜브를 45 분동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 세포의 분취액을 LB 카나마이신 아가 플레이트위에 플레이팅하고 24 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 5 개의 절출된 단일 콜로니를 0.1 %의 AZCL-갈락토만난 (MegaZyme, Australia)이 함유되어 있는 LB 카나마이신 아가 플레이트위에 재-스트리킹하였다. 만난나제-포지티브 파지미드 클론을, 포지티브 콜로니 주변의 푸른색의 가수분해 할로스의 형성에 의하여 특성확인하였다. 이것들을 추가로 EcoRI, PstI, EcoRI-PstI, 및 HindIII를 사용한 단리된 파지미드 DNA (QiaSpin kit, Qiagen, USA)의 제한 효소 소화에 의하여, 그리고 이어지는 아가로스 겔 전기영동에 의하여 분석하였다.

뉴클레오티드 서열 분석

게놈 베타-1,4-만난나제 클론 pBXM1의 뉴클레오티드 서열을, 500 ng의 Qiagen-정제된 주형 (Qiagen, USA), Taq 데옥시-말단 사이클 서열화 키트 (Perkin-Elmer, USA), 형광 표지된 터미네이터 및 5 pmol의 pBK-CMV 폴리링커 프라이머 (Stratagene, USA) 또는 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여, 디데옥시 사슬-종결 방법 (Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467)에 의해 양 가닥으로부터 측정하였다. 서열 데이터의 분석은 문헌의 방법에 따라 수행하였다 [Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387-395].

서열 배열

본 발명의 바실루스 sp. AAI12 로부터의 글리코하이드롤라제 패밀리 26 베타-1,4-만난나제 (SEQ ID NO:10), 칼디셀룰로시룹터 사카로라이티쿠스 (GenBank/EMBL 승인 번호 P77847), 딕티오글로무스 써모필룸 (승인 번호 030654), 로도써무스 마리누스 (승인 번호 P49425), ManA 에 의해 코드화된 피로마이세스 sp. (승인 번호 P55296), 바실루스 sp. (승인 번호 P91007), 바실루스 서브틸리스 (승인 번호 005512) 및 슈오모나스 플루오레센스 (승인 번호 P49424)의 다중 서열 배열을 GCG 위스콘신 소프트웨어 팩키지, 버전 8.1의 파일업 프로그램: 갭 크리에이션 페널티 3.00 및 갭 익스텐젼 페널티 0.10을 사용하여 만들었다.

서열 유사성

바실루스 sp. AAI 12로부터 클론된 본 발명의 패밀리 26 베타-1,4-만난나제의 추론된 아미노산 서열은 칼디셀룰로시룹터 사카로라이티쿠스의 베타-1,4-만난나제 (GenBank/EMBL 승인 번호 P77847)에 대해 45 %의 서열 유사성 및 19.8 %의 서열 동일성을, 딕티오글로무스 써모필룸으로부터 얻어지는 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 030654)에 대해 49 %의 유사성과 25.1 %의 동일성을, 로도써무스 마리누스로부터 얻어지는 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P49425)에 대해서는 48.2 %의 유사성과 26.8 %의 동일성을, 피로마이세스 sp. 로부터의 ManA-코드화된 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P55296)에 대해서는 46 %의 유사성과 19.5 %의 서열 동일성을, 바실루스 sp.로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P91007)에 대해서는 47.2 %의 유사성과 22 %의 동일성을, 바실루스 서브틸리스로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 005512)에 대해서는 52.4 %의 유사성과 27.5 %의 동일성을, 그리고 슈도모나스 플루오레센스로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P49424)에 대해서는 60.6 %의 유사성과 37.4 %의 동일성을 나타낸다. 서열들은 GCG 위스콘신 소프트웨어 팩키지, 버전 8.1의 GAP 프로그램: 갭 크리에이션 페널티 3.00 및 갭 익스텐젼 페널티 0.10을 사용하여 배열되었다.

바실루스 sp (AAI 12) 만난나제 유전자의 클로닝

바실루스 서브틸리스에서의 만난나제의 하위클로닝 및 발현

본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열을 다음의 두 개의 올리고 뉴클레오티드로 구성되는 PCR 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시켰다:

BXM1.upper. SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA TTT TCT GGA AGC GTT TCA GC-3'

BXM1.lower.NotI

5'-CAG CAG TAG CGG CCG CCA CTT CCT GCT GGT ACA TAT GC-3'

제한 부위 SacII와 NotI 에 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 sp. AAI 12로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA

중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 1.0 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다. 5 ㎍의 pMOL944와 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NotI으로 소화시키고, 0.8 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NotI 소화되고 정제된 pMOL944에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB747로 명명하였다. 클론 MB747을 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 SEQ ID NO:9의 만난나제의 성숙한 부분에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다.

바실루스 sp. AAI 12로부터의 만난나제의 발현, 정제 및 특성확인

상술된 바와 같이 얻어진 클론 MB747을, 500 ml의, 격벽이 설치된 두 개의 진동 플라스크에 들어 있는 10 ㎍/ml의 카나마이신이 첨가된 25×200 ml의 BPX 배지중에서 5 일동안 37 ℃에서 및 300 rpm에서 성장시켰다.

클론 MB747의 진동 플라스크 배양액 4100 ml을 모아서 pH를 7.0으로 조정하고, EDTA를 최종 농도가 2 mM이 되도록 첨가하였다. 응집을 위해 교반하는 중에 185 ml의 양이온성 제제 (10 % C521) 및 370 ml의 음이온성 제제 (A130)를 첨가하였다. 응집된 물질을 Sorval RC 3B를 사용하여 9000 rpm에서 20 분동안 6 ℃에서 원심분리함으로써 분리하였다. 상층액을 훠트만 유리 필터 GF/D 및 C를 이용하여 정화하고, 마지막으로 10 kDa의 컷오프로 필트론상에 농축시켰다.

이 농축액 1500 ml을 수산화 나트륨을 사용하여 pH를 7.5 로 조정하였다. 투명한 용액을 25 mmol 트리스 pH 7.5로 평형화한 1000 ml의 Q-세파로스 칼럼을 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피에 적용하였다. 결합된 만난나제 활성을 염화 나트륨 구배를 사용하여 용출하였다. 이것을 필트론 막을 사용하여 440 ml로 농축하였다. 매우 순수한 만난나제를 얻기 위하여 농축물을 0.1 M 아세트산 나트륨, pH 6.0으로 평형화시켜놓은 슈퍼덱스 칼럼을 통과시켰다.

순수한 효소는 SDS-PAGE에서 단일한 밴드로 나타났고, 분자량이 62 kDa였다.

만난나제 효소의 아미노산 서열, 즉 번역된 DNA 서열을 SEQ ID NO:10 에 나타낸다.

다음의 N-말단 서열을 측정하였다: FSGSVSASGQELKMTDQN.

pI (등전점): 4.5

DSC 차등 스캐닝 열량측정 결과, 아세트산 나트륨 완충액 pH 6.0에서 용융온도로서 64 ℃를 나타냈고, 이것은 이 만난나제 효소가 열안정성임을 나타낸다.

이온 강도에 따라 촉매활성이 증가하는 것은 효소의 비활성이 높은 이온 상도를 가지는 인산염 완충액을 사용함에 의해 증가될 수 있음을 가리킨다는 것이 발견되었다.

본 발명의 폴리펩티드의 만난나제 활성은 칼슘 이온에 의해 억제된다.

면역학적 성질: 본 발명의 고도로 정제된 만난나제에 대한 토끼 다클론성 단일특이적 혈청을, 덴마크의 회사인 DAKO 사의 종래의 기법을 사용하여 발생시켰다. 이 혈청은 아가로스 겔에서 본 발명의 미정제 만난나제와 함께 깨끗한 단일 침전을 형성하였다.

실시예 9

실시예 8의 효소의 세제에의 이용

완충액 대신 시판중인 세제를 사용하고, 상술된 바와 같이 구주콩나무 등급으로부터의 0.2 % 의 AZCL-갈락토만난 (Megazyme, Australia)과 함께 40 ℃에서 20 분동안 인큐베이션한 후, 푸른색의 형성을 측정함으로써, 활성 여부를 시험하였다. 실시예 8에서 설명된 바와 같이 얻어진 효소는 글리신 완충액중에서 측정된 활성에 대하여, 유럽의 분말 세제 Ariel Futur에서 132 %의 상대 활성을 나타냈고, 미국의 Tide 분

말에서는 108 %의 상대 활성을 나타냈으며, 미국의 Tide 액체 세제에서는 86 %의 상대 활성을 나타냈다. 이들 시험에서, 상업적인 세제 포장용으로는 세제 농축이 권장되었고, 세탁물은 유럽의 조건 (Ariel Futur) 하에서는 18 도의 독일 경도를 가지는 수돗물이었고, 미국 조건 (US Tide)하에서는 9도의 경도를 가지는 수돗물이었다.

실시예 10

바실루스 할로듀란스로부터 유도된 만난나제

바실루스 할로듀란스로부터의 게놈 라이브러리의 pSJ1678 벡터안에서의 구성

바실루스 할로듀란스의 게놈 DNA를 제한 효소 Sau3A로 부분 소화하고, 0.7 % 의 아가로스 겔 (SeaKem agarose, FMC, USA)상에서의 전기영동에 의하여 크기대로 분류하였다. 크기가 2와 10 kb 사이인 단편을 분리하여 DEAE-셀룰로스 종이위에서의 전기영동에 의하여 DNA 단편을 단리하였다 [Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., Chambon, P. (1981), 아가로스 및 아크릴아미드 겔로부터의 DNA 단편의 믿을 수 있는 회수 방법, Anal. Biochem., 112, 295-298]. 단리된 DNA 단편을 BamHI-소화된 pSJ1678 플라스미드 DNA에 결찰시키고, 그 결찰 혼합물을 사용하여 대장균 SJ2를 형질전환시켰다.

대장균에서의 기능성 발현에 의한 베타-만난나제 클론에 대한 스크리닝

게놈 라이브러리로부터의 대략 10,000 콜로니-형성 유니트 (cfu)를, 9 ㎍/ml의 클로르암페니콜 및 0.1 % 의 AZCL-갈락토만난 (MegaZyme, Australia, cat. no. I-AZGMA)이 함유되어 있는 LB-아가 플레이트위에, 숙주로서 대장균 SJ2를 사용하여 플레이팅하고, 그 플레이트를 37 ℃에서 24 시간동안 인큐베이션하였다. 만난나제-포지티브 대장균 콜로니를, 포지티브 플라스미드 클론주위의 푸른색의 가수분해 할로스의 형성에 의해 확인하였다. pSJ1678 중의 만난나제-포지티브 클론을, 상기와 같이 9 ㎍/ml의 클로르암페니콜 및 0.1 % 의 AZCL-갈락토만난이 함유되어 있는 LB 플레이트위에 단리된 콜로니를 재-스트리킹함으로써 콜로니-정제하였다. 단일한 만난나제-포지티브 플라스미드 클론을, 플라스미드 DNA의 정제를 위하여, 9 ㎍/ml의 클로르암페니콜이 함유되어 있는 5 ml의 LB 배지에 접종하였다.

뉴클레오티드 서열 분석

게놈 베타-1,4-만난나제 클론 pBXM5의 뉴클레오티드 서열을, 500 ng의 Qiagen-정제된 주형 (Qiagen, USA), Taq 데옥시-말단 사이클 서열화 키트 (Perkin-Elmer, USA), 형광 표지된 터미네이터 및 5 pmol의 pBK-CMV 폴리링커 프라이머 (Stratagene, USA) 또는 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여, 디데옥시 사슬-종결 방법 (Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467)에 의해 양 가닥으로부터 측정하였다. 서열 데이터의 분석은 문헌의 방법에 따라 수행하였다 [Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387-395].

서열 배열

본 발명의 바실루스 할로듀란스로부터의 글리코하이드롤라제 패밀리 5 베타-1,4-만난나제 (SEQ ID NO:12), 바실루스 써큘란스 (GenBank/EMBL 승인 번호 066185), 비브리오 sp. (승인 번호 069347), 스트렙토마이세스 리비단스 (승인 번호 P51529), 및 칼디셀룰로시룹터 사카로라이티쿠스 (승인 번호 P22533)의 다중 서열 배열. 다중 서열 배열은 GCG 위스콘신 소프트웨어 팩키지, 버전 8.1의 파일업 프로그램: 갭 크리에이션 페널티 3.00 및 갭 익스텐젼 페널티 0.10을 사용하여 만들었다.

서열 유사성

바실루스 할로듀란스로부터 클론된 본 발명의 패밀리 5 베타-1,4-만난나제의 추론된 아미노산 서열은 바실루스 써큘란스의 베타-1,4-만난나제 (GenBank/EMBL 승인 번호 066185)에 대해 77 %의 유사성 및 60 %의 서열 동일성을, 비브리오 sp. 로부터 얻어지는 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 069347)에 대해 64.2 %의 유사성과 46 %의 동일성을, 스트렙토마이세스 리비단스로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P51529)에 대해서는 63 %의 유사성과 41.8 %의 동일성을, 그리고 칼디셀룰로시룹터 사카로라이티쿠스로부터의 베타-1,4-만난나제 (승인 번호 P22533)에 대해서는 60.3 %의 유사성과 42 %의 서열 동일성을 나타낸다. 서열들은 GCG 위스콘신 소프트웨어 팩키지, 버전 8.1의 GAP 프로그램: 갭 크리에이션 페널티 3.00 및 갭 익스텐젼 페널티 0.10을 사용하여 배열되었다.

바실루스 할로듀란스 만난나제 유전자의 클로닝

바실루스 서브틸리스에서의 성숙한 전체 길이의 만난나제의 하위클로닝 및 발현

본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열을 다음의 두 개의 올리고 뉴클레오티드로 구성되는 PCR 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시켰다:

BXM5.upper. SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA CAT CAC AGT GGG TTC CAT G-3'

BXM5.lower.NotI

5'-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TAT TGA AAC ACA CTG CTT CTT TTA G-3'

제한 부위 SacII와 NotI 에 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 할로듀란스로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 0.9 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝:

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다.

5 ㎍의 pMOL944와 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NotI으로 소화시키고, 0.8 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NotI 소화되고 정제된 pMOL944에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB878로 명명하였다. 클론 MB878을 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 SEQ ID NO:11의 위치 97에서 993 및 SEQ ID NO:12의 위치 33에서 331의 만난나제의 성숙한 부분에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다.

바실루스 할로듀란스로부터의 만난나제의 발현, 정제 및 특성확인

상술된 바와 같이 얻어진 클론 MB878을, 500 ml의, 격벽이 설치된 두 개의 진동 플라스크에 들어 있는 10 ㎍/ml의 카나마이신이 첨가된 25×200 ml의 BPX 배지중에서 5 일동안 37 ℃에서 및 300 rpm에서 성장시켰다.

클론 MB878의 진동 플라스크 배양액 5000 ml을 모아서 pH를 6.0으로 조정하였다. 응집을 위해 교반하는 중에 125 ml의 양이온성 제제 (10 % C521) 및 250 ml의 음이온성 제제 (A130)를 첨가하였다. 응집된 물질을 Sorval RC 3B를 사용하여 9000 rpm에서 20 분동안 6 ℃에서 원심분리함으로써 분리하였다. 상층액을 NaOH를 사용하여 pH를 8.0으로 조정하고, 훠트만 유리 필터 GF/D 및 C를 이용하여 정화하였다. 그런 다음 50 g의 DEAE A-50 세파덱스를 0.1 M의 아세트산 나트륨, pH 6.0으로 평형화하고, 그것을 여과물에 첨가하여, 효소가 결합되도록 실온에서 하룻밤동안 방치하였다. 결합된 효소를 아세트산염 완충액중의 0.5 M NaCl을 사용하여 용출하였다. 그런 다음 pH를 수산화 나트륨을 사용하여 8.0으로 조정한 후, 10 kDa의 컷오프로 필트론상에서 450 ml로 농축시킨 다음, 20 %의 글리세롤, 20 %의 MPG 및 2 %의 베롤로 안정화하였다. 생성물을 적용 시도에 사용하였다.

이 농축액 2 ml을 수산화 나트륨을 사용하여 pH를 8.0 으로 조정하였다. 매우 순수한 만난나제를 얻기 위하여 농축액을 0.1 M의 아세트산 나트륨, pH 8.5로 평형화된 슈퍼덱스 200 칼럼을 통과시켰다.

순수한 효소는 SDS-PAGE에서 단일한 밴드로 나타났고, 분자량이 34 kDa였다.

만난나제 효소의 아미노산 서열, 즉 번역된 DNA 서열은 SEQ ID NO:12에 나타낸다.

정제된 단백질의 다음의 N-말단 서열을 측정하였다: AHHSGFHVNGTTLYDA.

pH 활성 프로필은 ManU 검정 (40 ℃에서 20 분동안 인큐베이션)을 사용하여 효소가 pH 7.5 와 pH 10 사이에서 50 % 이상 더 큰 상대 활성을 갖는 것으로 나타났다.

온도 최적은 60 ℃와 70 ℃ 사이에서 및 pH 10에서 발견되었다 (ManU 검정을 사용함; 글리신 완충액).

면역학적 성질: 고도로 정제된 클론된 만난나제에 대한 토끼의 다클론성 단일특이적 혈청을, 덴마크의 회사인 DAKO사에서 사용하는 종래의 기법을 사용하여 발생시켰다. 이 혈청은 아가로스 겔에서 본 발명의 미정제된 만난나제와 선명한 단일 침전을 형성하였다.

실시예 11

실시예 10 의 만난나제 효소의 세제에의 이용

완충액 대신 시판중인 세제를 사용하고, 상술된 바와 같이 구주콩나무 등급으로부터의 0.2 % 의 AZCL-갈락토만난 (Megazyme, Australia)과 함께 40 ℃에서 20 분동안 인큐베이션한 후, 푸른색의 형성을 측정함으로써, 활성 여부를 시험하였다. 실시예 10에서 설명된 바와 같이 얻어진 만난나제 효소는 완충액중에서의 활성에 대하여, 유럽의 액체 세제 Ariel Futur에서, 미국의 Tide 분말 및 미국의 Tide 액체 세제에서 40 % 이상 더 큰 활성을 나타냈다. 이들 시험에서, 상업적인 세제 포장용으로는 세제 농축이 권장되었고, 세탁물은 유럽의 조건 (Ariel Futur) 하에서는 18 도의 독일 경도를 가지는 수돗물이었고, 미국 조건 (US Tide)하에서는 9도의 경도를 가지는 수돗물이었다.

실시예 12

바실루스 sp. AA349로부터 유도된 만난나제

바실루스 sp (AA349) 만난나제 유전자의 클로닝

바실루스 서브틸리스에서의 촉매활성 코아 만난나제 효소의 하위클로닝 및 발현

본 발명의 만난나제를 코드화하는 DNA 서열을 다음의 두 개의 올리고 뉴클레오티드로 구성되는 PCR 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시켰다:

BXM7.upper. SacII

5'-CAT TCT GCA GCC GCG GCA AGT GGA CAT GGG CAA ATG C-3'

BXM7.lower.NotI

5'-GCG TTG AGA CGC GCG GCC GCT TAT TTT TTG TAT ACA CTA ACG ATT TC-3'

제한 부위 SacII와 NotI 에 밑줄이 그어져 있다.

상술된 바와 같이 바실루스 sp. AA349로부터 단리된 염색체 DNA를, 제조자의 지시를 따라 Amplitaq DNA 중합효소 (Perkin Elmer)를 사용하는 PCR 반응에 주형으로서 사용하였다. PCR 반응은 200 μM의 각각의 dNTP, 2.5 유니트의 AmpliTaq 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus, USA) 및 100 pmol의 각 프라이머를 함유하고 있는 PCR 완충액 (10 mM의 트리스-HCl, pH 8.3, 50 mM 의 KCl, 1.5 mM 의 $MgCl_2$, 0.01 %(w/v)의 젤라틴)중에 셋업하였다.

PCR 반응은 DNA 열 순환기 (Landgraf, Germany)를 사용하여 수행하였다. 94 ℃에서 1 분동안 인큐베이션을 1회 하고, 94 ℃에서 30 초동안 변성, 60 ℃에서 1 분동안 아닐링, 그리고 72 ℃에서 2 분동안 연장하는 프로필의 사이클을 30 회 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭 생성물의 5 ㎕의 분취액을 0.7 % 아가로스 겔 (NuSieve, FMC)에서의 전기영동에 의하여 분석하였다. 크기가 1.0 kb인 DNA 단편이 나타났고, 이것은 유전자 절편이 적절하게 증폭되었음을 나타냈다.

PCR 단편의 하위클로닝:

상술된 바와 같이 생성된 PCR 생성물의 45 ㎕의 분취액을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 정제된 DNA를 50 ㎕의 10 mM 트리스-HCl, pH 8.5에 용출시켰다. 5 ㎍의 pMOL944와 25 ㎕의 정제된 PCR 단편을 SacII 및 NotI으로 소화시키고, 0.8 %의 낮은 겔화 온도를 가지고 있는 아가로스 (SeaPlaque GTG, FMC) 겔에서 전기영동한 후, 관련된 단편을 겔로부터 절출하여, QIAquick 겔 추출 키트 (Qiagen, USA)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 정제하였다. 그런 다음 단리된 PCR DNA 단편을 SacII-NotI 소화되고 정제된 pMOL944에 결찰시켰다. 결찰은 16 ℃에서 0.5 ㎍의 각각의 DNA 단편, 1 U의 T4 DNA 리가제 및 T4 리가제 완충액 (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 하룻밤동안 수행하였다.

결찰 혼합물을 사용하여 경합하는 바실루스 서브틸리스 PL2306을 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 LBPG-10 ㎍/ml의 카나마이신-아가 플레이트위에 플레이팅하였다. 그것을 18 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션한 후, 콜로니들이 플레이트위에 나타났다. 여러개의 클론을, 하룻밤동안의 배양 육즙으로부터 플라스미드 DNA를 분리함으로써 분석하였다.

하나의 그러한 포지티브 클론을 상술된 바와 같이 아가 플레이트위에 여러번 재스트리킹하고, 이 클론을 MB879로 명명하였다. 클론 MB879를 하룻밤동안 TY-10 ㎍/ml의 카나마이신중에서 37 ℃에서 성장시키고, 다음날 1 ml의 세포를 사용하여 Qiaprep 스핀 플라스미드 미니프렙 키트 #27106을 사용하여 바실루스 서브틸리스 플라스미드 제조에 대한 제조자의 지시를 따라 세포로부터 플라스미드를 분리하였다. 이 DNA를 DNA 서열화하였고, 그 결과 만난나제의 성숙한 부분 (첨부된 SEQ ID NO:15의 위치 204에서 1107 및 첨부된 단백질 서열 SEQ ID NO:16의 위치 26에서 369에 상응하는)에 상응하는 DNA 서열을 나타냈다.

바실루스 sp. AA349로부터의 만난나제의 발현, 정제 및 특성확인

상술된 바와 같이 얻어진 클론 MB879를, 500 ml의, 격벽이 설치된 두 개의 진동 플라스크에 들어 있는 10 ㎍/ml의 카나마이신이 첨가된 25×200 ml의 BPX 배지중에서 5 일동안 37 ℃에서 및 300 rpm에서 성장시켰다.

클론 MB879의 진동 플라스크 배양액 400 ml을 모아서 pH를 6.5로 조정하였다. 응집을 위해 교반하는 중에 19 ml의 양이온성 제제 (10 % C521) 및 38 ml의 음이온성 제제 (A130)를 첨가하였다. 응집된 물질을 Sorval RC 3B를 사용하여 5000 rpm에서 25 분동안 6 ℃에서 원심분리함으로써 분리하였다. 그런 다음 농축하고, 쿨로 세척하여 컷오프가 10 kDa인 필트론에 대한 전도성을 감소시켜서 150 ml로 농축한 다음, pH를 4.0으로 조정하고, 50 mM 아세트산 나트륨 완충액 pH 4.0중의 S-세파로스 칼럼 크로마토그래피에 적용하였다. 칼럼을 먼저 0.5 M 까지의 NaCl 구배를 사용하여 용출한 다음, 만난나제를 0.1 M 의 글리신 완충액 pH 10을 사용하여 용출하였다. 만난나제 활성 분획을 모았고, 그것들은 SDS-PAGE에서 단일한 밴드를 나타냈으며, 분자량이 38 kDa였다.

만난나제 효소의 아미노산 서열, 즉 번역된 DNA 서열은 SEQ ID NO:16에 나타낸다.

pH 활성 프로필은 ManU 검정 (40 ℃에서 20 분동안 인큐베이션)을 사용하여 효소가 pH 3과 pH 10 사이에서 30 % 이상 더 큰 상대 활성을 갖는 것으로 나타났다.

온도 최적은 60 ℃와 70 ℃ 사이에서 및 pH 10에서 발견되었다 (ManU 검정을 사용함; 글리신 완충액).

면역학적 성질: 고도로 정제된 클론된 만난나제에 대한 토끼의 다클론성 단일특이적 혈청을, 덴마크의 회사인 DAKO사에서 사용하는 종래의 기법을 사용하여 발생시켰다. 이 혈청은 아가로스 겔에서 본 발명의 미정제된 만난나제와 선명한 단일 침전을 형성하였다.

실시예 13

실시예 12 의 만난나제 효소의 세제에의 이용

완충액 대신 시판중인 세제를 사용하고, 상술된 바와 같이 구주콩나무 등급으로부터의 0.2 % 의 AZCL-갈락토만난 (Megazyme, Australia)과 함께 40 ℃에서 20 분동안 인큐베이션한 후, 푸른색의 형성을 측정함으로써, 활성 여부를 시험하였다. 실시예 12에서 설명된 바와 같이 얻어진 만난나제 효소는 완충액중에서의 활성에 대하여, 유럽의 액체 세제 Ariel Futur 및 미국의 Tide 분말 세제에서 40 % 이상 더 큰 활성을 나타냈다. 만난나제는 유럽의 분말형 Ariel Futur 및 미국의 tide 분말 세제에서 35 % 이상 더 큰 활성을 나타냈다. 이들 시험에서, 상업적인 세제 포장용으로는 세제 농축이 권장되었고, 세탁물은 유럽의 조건 (Ariel Futur) 하에서는 18 도의 독일 경도를 가지는 수돗물이었고, 미국 조건 (US Tide)하에서는 9도의 경도를 가지는 수돗물이었다.

실시예 14

진균 스트레인 휴미콜라 인솔렌스 DSM 1800 으로부터 유도된 만난나제

휴미콜라 인솔렌스로부터의 패밀리 26 베타-1,4-만난나제의 발현 및 클로닝

진균 스트레인 및 배양 조건

휴미콜라 인솔렌스 스트레인 DSM 1800을 WO 97/32014에 설명되어 있는 바와 같이 발효시키고, 26 ℃에서 5 일동안 성장시킨 후, 균사체를 수득하여 즉시 액체 N_2에 냉동시켜 -80 ℃에서 보관하였다.

RNase-유리 유리제품, 팁 및 용액의 제조

RNA 단리에 사용된 모든 유리제품은 220 ℃에서 최소한 12 시간동안 구웠다. 에펜도르프 튜브, 피펫 팁 및 플라스틱 칼럼을 에탄올중의 0.1 %의 디에틸피로카보네이트 (DEPC)로 12 시간동안 처리한 후, 오토클레이브하였다. 모든 완충액 및 물 (트리스-함유 완충액은 제외)을 0.1 %의 DEPC로 12 시간동안 37 ℃에서 처리한 후 오토클레이브하였다.

총 RNA의 추출

총 RNA를 구아니디늄 티오시아네이트를 사용한 추출 및 이어서 5.7 M CsCl 쿠션 (Chirgwin et al., 1979)을 통과하는 한외여과에 의하여 제조하되, 다음의 사항을 변용하였다. 냉동된 균사체를 액체 N_2 중에서 절구와 공이를 사용하여 미세한 분말로 분쇄한 후, 미리 냉각시켜 놓은 커피 분쇄기에서 갈은 직후에, 5 부피의 RNA 추출 완충액 (4 M의 GuSCN, 0.5 % 의 Na-라우릴사르코신, 25 mM의 Na-시트레이트, pH 7.0, 0.1 M의 β-메르캅토에탄올)중에 현탁하였다. 그 혼합물을 30 분동안 실온에서 교반한 후, 원심분리하여 (30 분, 5000 rpm, 실온, Heraeus Megafuge 1.0 R) 세포 파편을 펠릿화하였다. 상층액을 모아서 12.0 ml 의 CsCl 쿠션당 26.5 ml 의 상층액을 사용하여 5.7 M 의 CsCl 쿠션 (5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA, pH 7.5, 0.1 % DEPC; 사용전에 오토클레이브함)위에 상층액을 조심스럽게 올려 놓은 후, 원심분리 (Beckman, SW 28 rotor, 25,000 rpm, 실온, 24 시간)하여 총 RNA를 얻었다. 원심분리후 상층액을 조심스럽게 제거하고, RNA 펠릿을 함유하고 있는 튜브의 바닥을 잘라서 70 %의 에탄올로 세정하였다. 총 RNA 펠릿을 에펜도르프 튜브에 옮기고, 500 ml의 TE, pH 7.6에 현탁시키고 (만약 이것이 어렵다면, 때로 5 분동안 65 ℃에서 가열한다), 페놀로 추출한 후, 에탄올을 사용하여 12 시간동안 -20 ℃에서 (2.5 부피의 에탄올, 0.1 부피의 3 M NaAc, pH 5.2)침전시켰다. RNA를 원심분리에 의하여 수집하고, 이것을 70 %의 에탄올로 세척한 후, 최소 부피의 DEPC-DIW에 재현탁하였다. RNA 농도를 $OD_{260/280}$을 측정함으로써 측정하였다.

폴리(A)$^+$RNA의 단리

폴리(A)$^+$RNA를 올리고(dT)-셀룰로스 친화성 크로마토그래피 (Aviv & Leder, 1972)에 의하여 단리하였다. 전형적으로, 0.2 g의 올리고(dT) 셀룰로스 (Boehringer Mannheim, 결합 용량에 대하여 체크함)를 미리 10 ml의 1×칼럼 로딩 완충액 (20 mM의 트리스-Cl, pH 7.6, 0.5 M의 NaCl, 1 mM의 EDTA, 0.1 % 의 SDS)에 부풀리고, 그것을 DEPC로 처리되고 플러지된 플라스틱 칼럼 (폴리 프렙 크로마토그래피 칼럼, Bio Rad)위에 로딩한 후, 20 ml의1×로딩 완충액으로 평형화하였다. 총 RNA를 65 ℃에서 8 분동안 가열하고, 얼음위에서 5 분동안 퀀칭한 후, 1 부피의 2×칼럼 로딩 완충액을 칼럼위에 로딩된 RNA 샘플위에 첨가하였다. 용출액을 수집하고, 상기와 같이 샘플을 가열함으로써 재로딩을 2, 3 회 시행하였고, 각 로딩전에 얼음위에서 퀀칭하였다. 올리고(dT) 칼럼을 10 부피의 1×로딩 완충액으로 세척한 후, 3 부피의 중간염 완충액 (20 mM의 트리스-Cl, pH 7.6, 0.1 M의 NaCl, 1 mM의 EDTA, 0.1 %의 SDS)으로 세척하고, 폴리(A)$^+$RNA를 미리 65 ℃로 가열하여 놓은 용출 완충액 (10 mM의 트리스-Cl, pH 7.6, 1 mM의 EDTA, 0.05 %의 SDS) 3 부피를 사용하여 용출하여 500 ml의 분획으로 수집하였다. 각각의 수집된 분획에 대하여 OD_{260}을 판독하고, mRNA를 함유하고 있는 분획을 모아 에탄올로 -20 ℃에서 12 시간동안 침전시켰다. 폴리(A)$^+$RNA를 원심분리에 의해 모아서 DEPC-DIW에 재현탁하여 5 내지 10 mg씩의 분취량으로 -80 ℃에서 보관하였다.

cDNA 합성

첫 번째 가닥의 합성

이중-가닥의 cDNA를 5 mg의 휴미콜라 인솔렌스 폴리(A)$^+$RNA로부터, 하겐 (F.S. Hagen)에 의해 개발된 헤어-핀 변형을 사용하는 RNase H 방법 (Gubler & Hoffman 1983, Sambrook et al., 1989)에 의하여 합성하였다. 폴리(A)$^+$RNA (5 ml의 DEPC-처리된 물중의 5 mg)를 70 ℃에서 8 분동안 가열하고, 얼음위에서 퀀칭한 다음, 1 mM의 각각의 dNTP (Pharmacia), 40 유니트의 사람 태반의 리보뉴클레아제 억제제 (RNasin, Promega), 10 mg의 올리고(dT)12-18 프라이머 (Pharmacia) 및 1000 유니트의 SuperScript II RNase H-역전사효소 (Bethesda Research Laboratories)가 함유되어 있는 역전사효소 완충액 (50 mM의 트리스-Cl, pH 8.3, 75 mM의 KCl, 3 mM의 $MgCl_2$, 10 mM의 DTT, Bethesda Research Laboratories)과 최종 부피 50 ml로 만

들었다. 이 반응 혼합물을 45 ℃에서 1 시간동안 인큐베이션함으로써 첫 번째 가닥의 cDNA를 합성하였다.

두 번째 가닥의 합성

합성후에, 30 ml의 10 mM의 트리스-Cl, pH 7.5, 1 mM의 EDTA를 첨가하고, 40 mg의 글리코겐 담체 (Boehringer Mannheim), 0.2 부피의 10 M NH_4Ac 및 2.5 부피의 96 % 에탄올을 첨가함으로써 mRNA:cDNA 혼성체를 12 시간동안 -20 ℃에서 에탄올로 침전시켰다. 혼성체를 원심분리에 의하여 회수하고, 70 % 의 에탄올로 세척한 후, 공기 건조시키고, 100 mM의 각각의 dNTP, 44 유니트의 대장균 DNA 중합효소 I (Amersham), 6.25 유니트의 RNase H (Bethesda Research Laboratories) 및 10.5 유니트의 대장균 DNA 리가제 (New England Biolabs)가 함유되어 있는 250 ml의 두 번째 가닥 완충액 (20 mM의 트리스-Cl, pH 7.4, 90 mM 의 KCl, 4.6 mM의 $MgCl_2$, 10 mM의 $(NH_4)_2SO_4$, 16 mM의 βNAD^+)중에 현탁하였다. 두 번째 가닥의 cDNA 합성은 반응 튜브를 16 ℃에서 3 시간동안 인큐베이션함으로써 수행하였고, EDTA를 20 mM의 최종 농도로 첨가하고 페놀 추출을 함으로써 반응을 중지시켰다.

녹두 뉴클레아제 처리

이중-가닥의 (ds) cDNA를 2 부피의 96 % 에탄올, 0.1 부피의 3 M NaAc, pH 5.2의 첨가에 의해 -20 ℃에서 12 시간동안 에탄올 침전시키고, 생성된 침전을 원심분리에 의하여 회수한 후, 70 % 의 에탄올로 세척한 다음, 건조시키고 (SpeedVac), 36 유니트의 녹두 뉴클레아제 (Bethesda Research Laboratories)가 함유되어 있는 30 ml의 녹두 뉴클레아제 완충액 (30 mM의 NaAc, pH 4.6, 300 mM 의 NaCl, 1 mM의 ZnSO4, 0.35 mM의 DTT, 2 % 의 글리세롤)에 재현탁하였다. 단일-가닥의 헤어핀 DNA를 30 ℃에서 30 분동안 반응물을 인큐베이션한 후, 70 ml의 10 mM 트리스-Cl, pH 7.5, 1 mM 의 EDTA를 첨가하고, 페놀로 추출한 후, 2 부피의 96 %의 에탄올 및 0.1 부피의 3 M NaAc, pH 5.2로 -20 ℃에서 12 시간동안 에탄올 침전시킴으로써 클립하였다.

T4 DNA 중합효소를 사용한 블런트-단부화

ds cDNA를 0.5 mM의 각각의 dNTP와 7.5 유니트의 T4 DNA 중합효소 (Invitrogen)가 함유되어 있는 50 ml의 T4 DNA 중합효소 완충액 (20 mM의 트리스-아세테이트, pH 7.9, 10 mM의 MgAc, 50 mM의 KAc, 1 mM의 DTT) 중에서, T4 DNA 중합효소를 사용하여, 반응 혼합물을 37 ℃에서 15 분동안 인큐베이션함으로써 블런트-단부화하였다. 20 mM의 최종 농도로 EDTA를 첨가함으로써 반응을 중지시키고, 이어서 페놀로 추출하고 에탄올로 침전시켰다.

어댑터 결찰 및 크기 선택

충전 반응후에 cDNA를 600 pmol의 BstX I 어댑터 및 5 유니트의 T4 리가제 (Invitron)가 함유되어 있는 30 ml의 결찰 완충액 (50 mM의 트리스-Cl, pH 7.8, 10 mM의 MgCl2, 10 mM의 DTT, 1 mM의 ATP, 25 mg/ml의 우혈청 알부민)중에서 비-팰린드롬성 BstX I 어댑터 (1 mg/ml, Invitrogen)에, 그 반응 혼합물을 16 ℃에서 12 시간동안 인큐베이션함으로써 결찰시켰다. 반응을 70 ℃에서 5 분동안 가열함으로써 중지시키고, 어댑터가 연결된 cDNA를 아가로스 겔 전기영동 (0.8 % HSB-아가로스, FMC)에 의하여 크기-분류함으로써 결찰되지 않은 어댑터와 작은 cDNA를 분리하였다. cDNA를 0.7 kb의 컷-오프로 크기-선택하고, cDNA를 10 mM의 트리스-Cl, pH 7.5, 1 mM의 EDTA 중에서 1 시간동안 100 볼트에서 아가로스 겔로부터 전기용출하고, 상기와 같이 페놀로 추출한 다음 에탄올로 -20 ℃에서 12 시간동안 침전시켰다.

휴미콜라 인솔렌스 cDNA 라이브러리의 구성

어댑터가 연결된 ds cDNA를 원심분리에 의하여 회수하고, 70 % 의 에탄올에 세척한후, 25 ml의 DIW에 재현탁시켰다. 대규모의 라이브러리 결찰전에, 4 개의 시험 결찰을, 각각 1 ml의 ds cDNA (반응 튜브 #1 - #3), 2 유니트의 T4 리가제 (Invitrogen) 및 50 ng (튜브 #1), 100 ng (튜브 #2) 및 200 ng (튜브 #3 및 #4)의 Bst XI 절단된 pYES 2.0 벡터 (Invitrogen)가 함유되어 있는 10 ml의 결찰 완충액 (상기와 같음)중에서 수행하였다. 결찰 반응을 16 ℃에서 12 시간동안 인큐베이션함으로써 수행하고, 반응물을 70 ℃에서 5 분동안 가열한 후, 각 결찰물 1 ml을 40 ml의 경합하는 대장균 1061 세포 (OD600 = 0.9, 1 리터 LB-육즙중에서, 저온 DIW로 2 회 세척, 20 ml의 10 % 글리세롤로 1 회 세척, 2 ml의 10 % 글리세롤에 재현탁됨)에 일렉트로포레이트하였다 (200W, 2.5 kV, 25 mF). 1 ml의 SOC를 각각의 형질전환 혼합물에 첨가하고, 세포를 37 ℃에서 1 시간동안 성장시킨 후, 50 ml을 LB+암피실린 플레이트 (100 mg/ml)위에 플레이팅하여 37 ℃에서 12 시간동안 성장시켰다.

최적 조건을 사용하여 대규모 결찰을 9 유니트의 T4 리가제가 함유되어 있는 40 ml의 결찰 완충액중에 셋업하고, 반응물을 16 ℃에서 12 시간동안 인큐베이션하였다. 결찰 반응을 70 ℃에서 5 분동안 가열함으로써 중지시키고, 에탄올로 -20 ℃에서 12 시간동안 침전시킨 후, 원심분리에 의해 회수하여 10 ml의 DIW에 재현탁하였다. 1 ml의 분취액을 사용하여 상기와 동일한 조건을 사용하여 전기-경합성 대장균 1061 세포에 형질전환하고, 형질전환된 세포를 적정한 다음, 라이브러리를 LB+암피실린 플레이트위에 5000 내지 7000 c.f.u./플레이트로 플레이팅하였다. 1×10^6 개의 재조합 클론을 포함하고 있는 cDNA 라이브러리를 1) 20 % 글리세롤중의 개별적인 푸울 (5000 내지 7000 c.f.u./푸울)로서 -20 ℃에서, 2) 동일한 푸울의 세포 펠릿으로서 -20 ℃에서, 그리고 3) 개별적인 푸울로부터의 Qiagen 정제된 플라스미드 DNA로서 -20 ℃에서 (Qiagen Tip 100, Diagen) 보관하였다.

휴미콜라 인솔렌스로부터의 베타-1,4-만난나제 cDNA의 사카로마이세스 세레비시아에에서의 발현, 클로닝

개별적인 푸울로부터의 정제된 플라스미드 DNA (100 ng/ml)의 1 ml의 분취액을 40 ml의 전기경합성 사카로마이세스 세레비시애 W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1:HIS3, prb1::LEU2; cir+) 세포 (OD600 = 1.5, 500 ml의 YPD중에서, 저온 DIW로 2 회 세척하고, 저온 1 M 소르비톨로 1 회 세척한 후, 0.5 ml의 1 M 소르비톨중에 재현탁됨, Becker & Guarante, 1991)에 일렉트로포레이션하였다. 1 ml의 1 M 저온 소르비톨을 첨가하고, 80 ml의 분취액을 SC+글루코스-우라실위에, 플레이트당 250 내지 400 개의 콜리니 형성 유니트로 플레이팅하여 그것을 30 ℃에서 3 내지 5 일동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 아가 플레이트에 혼입된 AZCL-갈락토만난 (MegaZyme, Australia)을 함유하고 있는

SC+갈락토스-우라실 플레이트위에 복제하였다. 휴미콜라 인솔렌스 라이브러리로부터 총 대략 50,000 개의 효모 콜로니가 만난나제-포지티브 클론에 대하여 스크린되었다.

포지티브 클론을 상응하는 효모 콜로니 주변의 푸른색의 가수분해 할로스의 형성에 의해 확인하였다. 클론을 단일 콜로니로서 얻었고, cDNA 삽입물을 비오티닐화된 pYES 2.0 폴리링커 프라이머를 사용하여 효모 세포로부터 직접 증폭시켰고, 그것을 자성 비이드 (Dynabead M-280, Dynal) 시스템에 의하여 정제한 다음, 사슬-종결 방법 (Sanger et al., 1977) 및 Sequenase 시스템 (United States Biochemical)을 사용하여 각각의 cDNA 클론의 5'-단부를 서열화함으로써 특성확인하였다.

만난나제-포지티브 효모 콜로니를 50 ml의 튜브중의 20 ml의 YPD 육즙에 접종하였다. 그 튜브를 2 일동안 30 ℃에서 진동시킨 후, 세포를 10 분동안 3000 rpm에서의 원심분리에 의하여 수득하였다. 총 효모 DNA를 WO 94/14953에 따라 단리하고, 그것을 50 ml의 오토클레이브한 물에 녹여서, 그것으로 상기와 같이 일렉트로포레이션에 의해 대장균을 형질전환하였다. 삽입물을 함유하고 있는 pYES 2.0 cDNA 클론을 LB+암피실린 아가 플리에트위에 플레이팅함으로써 구하여, 그 플라스미드 DNA를 표준 과정을 사용하여 대장균으로부터 단리한 후, 제한 효소를 사용한 소화에 의하여 분석하였다.

뉴클레오티드 서열 분석

전체 길이의 휴미콜라 인솔렌스 베타-1,4-만난나제 cDNA 클론 pC1M59의 뉴클레오티드 서열을, 디데옥시 사슬-종결 방법 (Sanger et al., 1977)에 의하여, 500 ng의 Qiagen-정제된 주형 (Qiagen, USA), Taq 데옥시-말단 사이클 서열화 키트 (Perkin-Elmer, USA), 형광 표지된 터미네이터 및 5 pmol의 pYES 2.0 폴리링커 프라이머 (Invitrogen, USA)를 사용하여 양 가닥으로부터 측정하였다. 서열 데이터의 분석은 문헌에 따라 수행하였다 (Devereux et al., 1984).

아스페르길루스 오리자에에서의 이종성 발현

아스페르길루스 오리자에의 형질전환

아스페르길루스 오리자에의 형질전환은 문헌에 설명된 바와 같이 수행하였다 [Christensen et al., (1988), Biotechnology 6, 1419-1422].

아스페르길루스 발현을 위한 베타-1,4-만난나제 발현 카세트의 구성

만난나제 클론 pC1M59로부터 플라스미드 DNA를 표준 과정을 사용하여 단리하고, 제한 효소 분석에 의하여 분석하였다. cDNA 삽입물을 적절한 제한 효소를 사용하여 절출하고, 그것을 플라스미드 p775 (EP 238023에 설명되어 있음)의 유도체인 아스페르길루스 발현 벡터 pHD414에 결찰시켰다. pHD414의 제조는 WO 93/11249에 추가로 설명되어 있다.

아스페르길루스 오리자에 또는 아스페르길루스 니거의 형질전환

일반적인 과정: 100 ml의 YPD (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratories, 1981)를 아스페르길루스 오리자에 또는 아스페르길루스 니거의 포자로 접종하고, 37 ℃에서 진동시키면서 약 2 일동안 인큐베이션하였다. 균사체를 미라클로쓰 (miracloth)를 통한 여과에 의해 수득하고, 200 ml의 0.6 M $MgSO_4$로 세척하였다. 균사체를 15 ml의 1.2 M의 $MgSO_4$, 10 mM의 NaH_2PO_4, pH=5.8에 현탁시켰다. 현탁액을 얼음위에서 냉각시키고, 120 mg의 Novozyme® 234가 함유되어 있는 1 ml의 완충액을 첨가하였다. 5 분후에 1 ml의 12 mg/ml의 BSA를 첨가하고, 대다수의 원형질체를 현미경하에 조사된 샘플중에서 볼 수 있을 때까지 부드럽게 교반하면서 1.5 내지 2.5 시간동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 현탁액을 미라클로쓰를 통하여 여과하고, 여과물을 멸균 튜브에 옮긴 후, 5 ml의 0.6 M 소르비톨, 100 mM의 트리스-HCl, pH 7.0을 그 위에 놓았다. 원심분리를 15 분동안 100 g에서 수행하고, 원형질체를 $MgSO_4$ 쿠션의 상부로부터 수집하였다. 2 부피의 STC를 원형질체 현탁액에 첨가하고, 그 혼합물을 5 분동안 1000 g에서 원심분리하였다. 원형질체 펠릿을 3 ml의 STC에 재현탁하고 재펠릿화하였다. 이것을 반복한다. 마지막으로 원형질체를 0.2 내지 1 ml의 STC에 재현탁하였다. 100 ㎕의 원형질체 현탁액을 5 내지 25 ㎍의 적절한 DNA와 10 ㎕의 STC 중에서 혼합한다. 원형질체를 p3SR2 (아스페르길루스 니듈란스 amdS 유전자 함유 플라스미드)와 혼합한다. 그 혼합물을 실온에서 25 분동안 방치한다. 0.2 ml의 60 % PEG 4000, 10 mM의 $CaCl_2$ 및 10 mM의 트리스-HCl, pH 7.5를 첨가하고, 조심스럽게 (두 번) 혼합한 후, 마지막으로 동일한 용액 0.85 ml을 첨가하고 조심스럽게 혼합한다. 그 혼합물을 실온에서 25 분동안 방치한 후, 2500 g에서 15 분동안 회전시키고, 생성된 펠릿을 2 ml의 1.2 M 소르비톨에 재현탁시킨다. 한번 더 침강시킨 후 원형질체를 적절한 플레이트위에 펼쳐놓는다. 원형질체를 바탕 성장을 억제하기 위하여 최소 플레이트위에 펼쳐놓는다. 37 ℃에서 4 내지 7 일동안 인큐베이션한 후에 포자를 취하여 단일 콜로니에 대하여 펼쳐놓는다. 이 과정을 반복하고, 두 번째 재-단리후의 단일 콜로니의 포자를 규정된 형질전환체로서 보관한다.

아스페르길루스 오리자에 형질전환체의 정제

아스페르길루스 오리자에 콜로니를 AmdS+-플레이트 (+0.01 %의 트리톤 X-100)위의 분생자 포자 및 YPM에서 3 일동안 30 ℃에서의 성장을 통하여 정제하였다.

만난나제-포지티브 아스페르길루스 오리자에 형질전환체의 확인

아스페르길루스 오리자에 형질전환체로부터의 상층액을 기질로서 0.2 %의 AZCL-갈락토만난 (MegaZyme, Australia)이 함유되어 있는 아가 플레이트상에서의 베타-1,4-만난나제 활성에 대해 검정하였다. 포지티브 형질전환체를 30 ℃에서의 24 시간동안의 인큐베이션후에 푸른색의 가수분해 할로스에 대해 분석함으로서 확인하였다.

SDS-PAGE 분석

베타-1,4-만난나제를 생성하는 아스페르길루스 오리자에 형질전환체로부터의 상층액에 대한 SDS-PAGE 분

석. 형질전환체들을 5 ml의 YPM에서 3 일동안 성장시켰다. 10 ㎕의 상층액을 12 %의 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 적용하고, 계속해서 겔을 쿠마찌 형광 블루로 염색하였다.

휴미콜라 인솔렌스 만난나제의 정제 및 특성확인

유전자를 상술된 바와 같이 아스페르길루스 오리자에안에 형질전환하고, 형질전환된 스트레인을 말토스 시럽, 슈크로스, MgS04, Ka2P04 및 K2S04와 시트르산 효모 추출물 및 미량의 금속이 들어있는 표준 배지를 사용하여 발효기안에서 성장시켰다. 인큐베이션은 6 일동안 34 ℃에서 통풍하에 수행하였다.

발효 육즙 (5000 ml)을 수득하여, 균사체를 여과에 의해 액체로부터 분리시켰다. 투명한 액체를 필트론상에서 275 ml로 농축시켰다.

만난나제를 양이온성 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. S-세파로스 칼럼을 25 mM의 시트르산 pH 4.0으로 평형화하고, 칼럼에 결합된 만난나제를 염화 나트륨 구배 (0 내지 0.5 M)를 사용하여 용출하였다. 만난나제 활성 분획을 모아서 pH를 7.3으로 조정하였다. 그런 다음 모아진 만난나제 100 ml을 ml 당 약 13 mg의 단백질을 사용하여 5 ml로 농축하고 후속되는 적용 시도에 사용하였다. 추가의 정제를 위하여, 2 ml을 아세트산 나트륨 완충액 pH 6.1중의 슈퍼덱스 200 상에서의 크기 크로마토그래피에 적용하였다. 만난나제 활성 분획은 SDS-PQGE에서 분자량 45 kDa 및 38 kDa의 동일한 염색 밴드를 나타냈고, 이것은 N-말단의 비-촉매적 도메인에서 단백질 가수분해가 일어났음을 가리킨다.

만난나제 효소의 아미노산 서열, 즉 번역된 DNA 서열은 SEQ ID NO:14에 나타낸다.

SEQ ID NO:13의 DNA 서열은 위치 1에서 21에 있는 신호 펩티드를 코드한다. 다른 만난나제에서 또한 발견되는 미지의 기능의 도메인은 아미노산 서열 SEQ ID NOl14의 위치 22에서 159에 나타나고, 촉매활성 도메인은 SEQ ID NO:14의 위치 160에서 488에서 발견된다.

가장 높은 서열 상동성은 딕티오글로무스 써모필룸에 대해 발견되었다 (49 % 동일성) (만난나제 서열 EMBL; AF013989, REEVES R.A., GIBBS M.D., BERGQUIST P.L. submitted in July 1997).

분자량: 38 kDa

아세트산 나트륨 완충액 pH 6.0중에서의 DSC는 65。였다.

ManU 검정 (20 분동안 40 ℃에서 인큐베이션)을 사용하는 pH 활성 프로필은 효소가 pH 8에서 최적의 활성을 가짐을 나타낸다.

온도 최적은 pH 10에서 70 ℃인 것으로 나타났다 (ManU 검정을 사용함: 기질로서 Megazyme AZCL 구주콩깍지 고무를 사용함).

면역학적 성질: 고도로 정제된 클론된 만난나제에 대한 토끼의 다클론성 단일특이적 혈청을, 덴마크 회사인 DAKO에서 사용하는 종래 기술을 사용하여 발생시켰다. 혈청은 아가로스 겔에서 본 발명의 미정제 만난나제와 양호한 단일 침전을 형성하였다.

실시예 15

휴미콜라 인솔렌스 패밀리 26 만난나제의 세척 평가

세척 성능을 본 발명의 만난나제가 포함된 세제 용액중에서 구주콩깍지 고무가 코팅된 견본을 세척함으로써 평가하였다. 세척후의 효과는 견본을 산화 철로 얼룩지게 함으로써 가시화하였다.

구주콩깍지 고무 견본의 제조: 깨끗한 면 소재 견본을 2 g/l의 구주콩깍지 고무 용액에 담근 후, 실온에서 하룻밤동안 건조시켰다. 견본을 물로 예비세탁하고 다시 건조시켰다.

세척: 작은 원형의 구주콩깍지 고무 견본을 15° dH 물중의 6,7 g/l Ariel Futur 액이 담긴 비이커에 넣고, 30 분동안 40 ℃에서 자성 막대를 사용하여 교반하면서 인큐베이션하였다. 견본을 수돗물로 세척하고 건조시켰다.

얼룩: 견본을 0.25 g/l의 Fe_2O_3 가 담긴 비이커에 넣고 3 분동안 교반하였다. 견본을 수돗물로 세척하고 건조시켰다.

평가: 견본의 리미션을 440 nm에서 MacBeth ColorEye 7000 리미션 분광계를 사용하여 측정하였다.

그 결과를: 델타 리미션 = $(R_{세척후} - R_{세척전})$효소 - $(R_{세척후} - R_{세척전})_{대조표준}$으로 나타내며, 여기서, R은 440 nm에서의 리미션이다.

본 발명의 만난나제는 분명히 구주콩깍지 고무 견본에 대해 효과적이며, 이때의 세척 성능은 바실루스 sP. I633 으로부터의 대조 만난나제보다 약간 더 좋다.

바실루스 sP. I633 으로부터의 만난나제 (실시예 1-3)에 비교한 휴미콜라 인솔렌스 패밀리 26 만난나제의 세척 성능은 델타 리미션 값으로 나타낸다:

효소 용량, mg/l	휴미콜라 인솔렌스 만난나제	바실루스 sp. I633 만난나제
0	0	0
0.01	6.6	5.0
0.1	9.3	8.6
1.0	10.2	7.7
10.0	10.5	9.7

실시예 16 - 40

다음의 실시예들은 본 발명의 조성물을 예시하기 위한 것이지만, 반드시 본 발명의 범주를 제한하거나 또는 규정하려는 의도는 아니다.

세제 조성물에서, 효소 수준은 총 조성물의 순수한 효소 중량으로 표시하고, 다른 언급이 없는 한, 세제 성분은 총 조성물의 중량으로 표시한다. 본원에서 약칭된 성분 표시는 다음의 의미를 갖는다:

LAS : 선형 C_{11-13} 알킬 벤젠 술폰산 나트륨

TAS : 탈로우 알킬 황산 나트륨

CxyAS : C_{1x}-C_{1y} 알킬 황산 나트륨

CxySAS : C_{1x}-C_{1y} 이차 (2,3) 알킬 황산 나트륨

CxyEz : 평균 z 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된 C_{1x}-C_{1y}의 지배적으로 선형인 일차 알코올

CxyEzS : 평균 z 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된 C_{1x}-C_{1y} 알킬 황산 나트륨

QAS : $R_2.N+(CH_3)_2(C_2H_4OH)$, R_2 = C_{12}-C_{14}

QAS1 : $R_2.N+(CH_3)_2(C_2H_4OH)$, R_2 = C_8-C_{11}

APA : C_{8-10} 아미도 프로필 디메틸 아민

비누 : 탈로우와 코코넛 지방산의 80/20 혼합물로부터 유도된 나트륨 선형 알킬 카르복실레이트

비이온성 : 평균 에톡실화도가 3.8 이고 평균 프로폭실화도가 4.5 인 C_{13}-C_{15} 혼합 에톡실화된/프로폭실화된 지방 알코올

Neodol 45-13 : C_{14}-C_{15} 선형 일차 알코올 에톡실레이트, 쉘 케미칼사 시판

STS : 톨루엔 술폰산 나트륨

CFAA : C_{12}-C_{14} 알킬 N-메틸 글루카미드

TFAA : C_{16}-C_{18} 알킬 N-메틸 글루카미드

TPKFA : C_{12}-C_{14} 증류된 전체 절단 지방산

규산염 : 비정질의 규산 나트륨 (SiO_2:Na_2O 비 = 1.6-3.2)

메타규산염 : 메타규산 나트륨 (SiO_2:Na_2O 비 = 1.0)

제올라이트 A : 일차 입자 크기가 0.1 내지 10 마이크로미터 범위에 있는 식 $Na_{12}(AlO_2SiO_2)_{12} \cdot 27H_2O$ 의 수화된 알루미노규산 나트륨 (중량은 무수물 기준으로 표시됨)

Na-SKS-6 : 식 δ-$Na_2Si_2O_5$의 결정성 적층된 규산염

시트르산염 : 입자 크기 분포가 425 내지 850 ㎛ 사이에 있는, 활성이 86.4 %인 시트르산 3나트륨 2수화물

시트르산 : 무수 시트르산

붕산염 : 붕산 나트륨

탄산염 : 입자 크기가 200 내지 900 ㎛인 무수 탄산 나트륨

중탄산염 : 입자 크기가 400 내지 1200 ㎛인 무수 탄산 수소 나트륨

황산염 : 무수 황산 나트륨

Mg 황산염 : 무수 황산 마그네슘

STPP : 트리폴리인산 나트륨

TSPP : 피로인산 4나트륨

MA/AA : 평균 분자량이 약 70,000 내지 80,000 인 4:1 아크릴레이트/말레이트의 무작위 공중합체

MA/AA 1 : 평균 분자량이 약 10,000 인 6:4 아크릴레이트/말레이트의 무작위 공중합체

AA : 평균 분자량이 4,500 인 폴리아크릴산 나트륨 중합체

PA30 : 평균 분자량이 약 4,500 내지 8,000 인 폴리아크릴산

480N : 평균 분자량이 약 3,500인 7:3 아크릴레이트/메타크릴레이트 무작위 공중합체

폴리겔/카르보폴: 고분자량 교차 결합된 폴리아크릴레이트

PB1 : 식 $NaBO_2.H_2O_2$의 무수 과붕산 나트륨 1수화물

PB4 : 식 $NaBO_2.3H_2O.H_2O_2$의 과붕산 나트륨 4수화물

과탄산염 : 식 $2Na_2CO_3.3H_2O_2$의 무수 과탄산 나트륨

NaDCC : 디클로로이소시아누르산 나트륨

TAED : 테트라아세틸에틸렌디아민

NOBS : 나트륨 염 형태의 노나노일옥시벤젠 술포네이트

NACA-OBS : (6-노나미도카프로일) 옥시벤젠 술포네이트

DTPA : 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산

HEDP : 1,1-히드록시에탄 디포스폰산

DETPMP : 디에틸트리아민 펜타 (메틸렌) 포스포네이트, Monsanto사에서 상표명 Dequest 2060으로 시판됨

EDDS : 나트륨 염 형태의 에틸렌디아민-N,N'-디숙신산, (S,S) 이성질체

MnTACN : 망간 1,4,7-트리메틸-1,4,7-트리아자시클로노난

광활성화된 표백제 : 덱스트린 가용성 중합체중에 캡슐화된 술폰화된 아연 프탈로시아닌

광활성화된 표백제 1: 덱스트린 가용성 중합체중에 캡슐화된 술폰화된 알루미노 프탈로시아닌

PAAC : 펜타아민 아세테이트 코발트 (III) 염

파라핀 : Wintershall 사에 의해 상표명 Winog 70으로 시판되는 파라핀 오일

NaBz : 벤조산 나트륨

BzP : 과산화 벤조일

만난나제 : 본원에서 설명된 바와 같음

프로테아제 : Novo Nordisk A/S에서 상표명 Savinase, Alcalase, Durazyme으로 시판되는, 또 Gist-Brocades사에서 Maxacal, Maxapem으로 시판되는 단백질 가수분해효소, 및 WO 91/06637, WO 95/10591 및/또는 EP 251 446에 기재된 프로테아제

아밀라제 : Genecor에 의해 시판되고 WO 94/18314, WO 96/05295에 기재된 상표명 Purafact Ox Am^{R}; Novo Nordisk A/S에서 시판하고 WO 95/26397에 기재되어 있는 상표 Termamyl®, Fungamyl® 및 Duramyl® 하에 시판되는 녹말 가수분해 효소

리파제 : Novo Nordisk A/S에서 상표명 Lipolase, Lipolase Ultra로, Gist-Brocades에서 상표명 Lipomax로 시판되는 지방 분해효소

셀룰라제 : Novo Nordisk A/S에서 상표명 Carezyme, Celluzyme 및/또는 Endolase하에 시판하는 셀룰로스 분해 효소

CMC : 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스

PVP : 평균 분자량이 60,000 인 폴리비닐 중합체

PVNO : 평균 분자량이 50,000 인 폴리비닐피리딘-N-옥사이드

PVPVI : 평균 분자량이 20,000 인 비닐이미다졸과 비닐피롤리돈의 공중합체

증백제 1 : 2나트륨 4,4'-비스(2-술포스티릴)비페닐

증백제 2 : 2나트륨 4,4'-비스(4-아닐리노-6-모르폴리노-1.3.5-트리아진-2-일) 스틸벤-2:2'-디술포네이트

실리콘 항발포제: 분산제로서 실록산-옥시알킬렌 공중합체를 가지고 있는 폴리디메틸실록산 발포 조절제, 상기 분산제에 대한 상기 발포 조절제의 비율은 10:1 내지 100:1 임

비누거품 억제제: 과립형태의 12 % 실리콘/실리카, 18 % 스테아릴 알코올, 70 % 전분

불투명화제 : BASF사에서 상표명 Lytron 621로 시판하는 물 기초 모노스티렌 라텍스 혼합물

SRP 1 : 음이온적으로 단부가 캡핑된 폴리에스테르

SRP 2 : 디에톡실화된 폴리(1,2 프로필렌 테레프탈레이트) 짧은 블록 중합체

QEA : 비스($(C_2H_5O)(C_2H_4O)_n$)(CH_3)-N^+-C_6H_{12}-N^+-(CH_3)비스((C_2H_5O)-(C_2H_4O))$_n$, n = 20 내지 30

PEI : 평균 분자량이 1800 이고 질소당 7 에틸렌옥시 잔기의 평균 에톡실화도를 가지는 폴리에틸렌이민

SCS : 큐멘 술폰산 나트륨

HMWPEO : 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드

PEGx : 분자량 x의 폴리에틸렌 글리콜

PEO : 평균 분자량이 5,000 인 폴리에틸렌 옥사이드

TEPAE : 테트라에틸렌펜타아민 에톡실레이트

BTA : 벤조트리아졸

PH : 20℃의 증류수중의 1 % 용액으로서 측정됨

실시예 16

다음의 고밀도 세탁 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V	VI
LAS	8.0	8.0	8.0	2.0	6.0	6.0
TAS	-	0.5	-	0.5	1.0	0.1
C46(S)AS	2.0	2.5	-	-	-	-
C25AS	-	-	-	7.0	4.5	5.5
C68AS	2.0	5.0	7.0	-	-	-
C25E5	-	-	3.4	10.0	4.6	4.6
C25E7	3.4	3.4	1.0	-	-	-
C25E3S	-	-	-	2.0	5.0	4.5
QAS	-	0.8	-	-	-	-
QAS 1	-	-	-	0.8	0.5	1.0
제올라이트A	18.1	18.0	14.1	18.1	20.0	18.1
시트르산	-	-	-	2.5	-	2.5
탄산염	13.0	13.0	27.0	10.0	10.0	13.0
Na-SKS-6	-	-	-	10.0	-	10.0
규산염	1.4	1.4	3.0	0.3	0.5	0.3
시트르산염	-	1.0	-	3.0	-	-
황산염	26.1	26.1	26.1	6.0	-	-
Mg황산염	0.3	-	-	0.2	-	0.2
MA/AA	0.3	0.3	0.3	4.0	1.0	1.0
CMC	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4
PB4	9.0	9.0	5.0	-	-	-
과탄산염	-	-	-	-	18.0	18.0
TAED	1.5	0.4	1.5	-	3.9	4.2
NACA-OBS	-	2.0	1.0	-	-	-
DETPMP	0.25	0.25	0.25	0.25	-	-
SRP 1	-	-	-	0.2	-	0.2

	I	II	III	IV	V	VI
EDDS	-	0.25	0.4	-	0.5	0.5
CFAA	-	1.0	-	2.0	-	-
HEDP	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4
QEA	-	-	-	0.2	-	0.5
프로테아제	0.009	0.009	0.01	0.04	0.05	0.03
만난나제	0.05	0.009	0.03	0.009	0.03	0.009
아밀라제	0.002	0.002	0.002	0.006	0.008	0.008
셀룰라제	0.0007	-	-	0.0007	0.0007	0.0007
리파제	0.006	-	-	0.01	0.01	0.01
광활성화된 표백제(ppm)	15	15	15	-	20	20
PVNO/PVPVI	-	-	-	0.1	-	-
증백제 1	0.09	0.09	0.09	-	0.09	0.09
방향제	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4
실리콘 항발포제	0.5	0.5	0.5	-	0.3	0.3
밀도, g/l	850	850	850	850	850	850
기타	100%까지					

실시예 17

특별히 유럽의 기계식 세척 조건하에서 사용되는 다음의 과립형 세탁 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V	VI
LAS	5.5	7.5	5.0	5.0	6.0	7.0
TAS	1.25	1.9	-	0.8	0.4	0.3
C24AS/C25AS	-	2.2	5.0	5.0	5.0	2.2
C25E3S	-	0.8	1.0	1.5	3.0	1.0
C45E7	3.25	-	-	-	-	3.0
TFAA	-	-	2.0	-	-	-
C25E5	-	5.5	-	-	-	-
QAS	0.8	-	-	-	-	-
QAS 1	-	0.7	1.0	0.5	1.0	0.7
STPP	19.7	-	-	-	-	-
제올라이트A	-	19.5	25.0	19.5	20.0	17.0
NaSKS-6/ 시트르산(79:21)	-	10.6	-	10.6	-	-
Na-SKS-6	-	-	9.0	-	10.0	10.0
탄산염	6.1	21.4	9.0	10.0	10.0	18.0
중탄산염	-	2.0	7.0	5.0	-	2.0
규산염	6.8	-	-	0.3	0.5	-
시트르산염	-	-	4.0	4.0	-	-
황산염	39.8	-	-	5.0	-	12.0
Mg황산염	-	-	0.1	0.2	0.2	-
MA/AA	0.5	1.6	3.0	4.0	1.0	1.0
CMC	0.2	0.4	1.0	1.0	0.4	0.4
PB4	5.0	12.7	-	-	-	-
과탄산염	-	-	-	-	18.0	15.0
TAED	0.5	3.1	-	-	5.0	-

	I	II	III	IV	V	VI
NACA-OBS	1.0	3.5	-	-	-	2.5
DETPMP	0.25	0.2	0.3	0.4	-	0.2
HEDP	-	0.3	-	0.3	0.3	0.3
QEA	-	-	1.0	1.0	1.0	-
프로테아제	0.009	0.03	0.03	0.05	0.05	0.02
만난나제	0.03	0.03	0.001	0.03	0.005	0.009
리파제	0.003	0.003	0.006	0.006	0.006	0.004
셀룰라제	0.000 6	0.000 6	0.000 5	0.000 5	0.000 7	0.000 7
아밀라제	0.002	0.002	0.006	0.006	0.01	0.003
PVNO/PVPVI	-	-	0.2	0.2	-	-
PVP	0.9	1.3	-	-	-	0.9
SRP 1	-	-	0.2	0.2	0.2	-
광활성화된 표백제(ppm)	15	27	-	-	20	20
광활성화된 표백제(ppm)	15	-	-	-	-	-
증백제1	0.08	0.2	-	-	0.09	0.15
증백제2	-	0.04	-	-	-	-
방향제	0.3	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3
실리콘항발포제	0.5	2.4	0.3	0.5	0.3	2.0
밀도, g/l	750	750	750	750	750	750
기타					100%까지	

실시예 18

특별히 유럽의 기계식 세척 조건하에서 사용되는 다음의 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV
취입분말				
LAS	6.0	5.0	11.0	6.0
TAS	2.0	-	-	2.0
제올라이트 A	24.0	-	-	20.0
STPP	-	27.0	24.0	-
황산염	4.0	6.0	13.0	-
MA/AA	1.0	4.0	6.0	2.0
규산염	1.0	7.0	3.0	3.0
CMC	1.0	1.0	0.5	0.6
증백제 1	0.2	0.2	0.2	0.2
실리콘항발포제	1.0	1.0	1.0	0.3
DETPMP	0.4	0.4	0.2	0.4
분무				
증백제	0.02	-	-	0.02
C45E7	-	-	-	5.0
C45E2	2.5	2.5	2.0	-
C45E3	2.6	2.5	2.0	-
방향제	0.5	0.3	0.5	0.2
실리콘항발포제	0.3	0.3	0.3	-
QEA	-	-	-	1.0
EDDS	0.3	-	-	-
황산염	2.0	3.0	5.0	10.0
탄산염	6.0	13.0	15.0	14.0
시트르산	2.5	-	-	2.0
	I	II	III	IV
QAS 1	0.5	-	-	0.5
Na-SKS-6	10.0	-	-	-
과탄산염	18.5	-	-	-
PB4	-	18.0	10.0	21.5
TAED	2.0	2.0	-	2.0
NACA-OBS	3.0	2.0	4.0	-
프로테아제	0.03	0.03	0.03	0.03
만난나제	0.009	0.01	0.03	0.001
리파제	0.008	0.008	0.008	0.004
아밀라제	0.003	0.003	0.003	0.006
증백제 1	0.05	-	-	0.05
기타				100%까지

실시예 19

다음의 과립형 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V	VI
취입분말						
LAS	23.0	8.0	7.0	9.0	7.0	7.0
TAS	-	-	-	-	1.0	-
C45AS	6.0	6.0	5.0	8.0	-	-
C45AES	-	1.0	1.0	1.0	-	-
C45E35	-	-	-	-	2.0	4.0
제올라이트	10.0	18.0	14.0	12.0	10.0	10.0
MA/AA	-	0.5	-	-	-	2.0
MA/AA 1	7.0	-	-	-	-	-
AA	-	3.0	3.0	2.0	3.0	3.0
황산염	5.0	6.3	14.3	11.0	15.0	19.3
규산염	10.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
탄산염	15.0	20.0	10.0	20.7	8.0	6.0
PEG 4000	0.4	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0
DTPA	-	0.9	0.5	-	-	0.5
증백제 2	0.3	0.2	0.3	-	0.1	0.3
분무						
C45E7	-	2.0	-	-	2.0	2.0
C25E9	3.0	-	-	-	-	-
C23E9	-	-	1.5	2.0	-	2.0
방향제	0.3	0.3	0.3	2.0	0.3	0.3
응집체						
C45AS	-	5.0	5.0	2.0	-	5.0
LAS	-	2.0	2.0	-	-	2.0
제올라이트 A	-	7.5	7.5	8.0	-	7.5

	I	II	III	IV	V	VI
탄산염	-	4.0	4.0	5.0	-	4.0
PEG 4000	-	0.5	0.5	-	-	0.5
기타(물등)	-	2.0	2.0	2.0	-	2.0
건조첨가제						
QAS	-	-	-	-	1.0	-
시트르산	-	-	-	-	2.0	-
PB4	-	-	-	-	12.0	1.0
PB1	4.0	1.0	3.0	2.0	-	-
과탄산염	-	-	-	-	2.0	10.0
탄산염	-	5.3	1.8	-	4.0	4.0
NOBS	4.0	-	6.0	-	-	0.6
메틸셀룰로스	0.2	-	-	-	-	-
Na-SKS-6	8.0	-	-	-	-	-
STS	-	-	2.0	-	1.0	-
쿨멘술폰산	-	1.0	-	-	-	2.0
프로테아제	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02
만난나제	0.009	0.01	0.03	0.009	0.01	0.001
리파제	0.004	-	0.004	-	0.004	0.008
아밀라제	0.003	-	0.002	-	0.003	-
셀룰라제	0.0005	0.0005	0.0005	0.0007	0.0005	0.0005
PVPVI	-	-	-	-	0.5	0.1
PVP	-	-	-	-	0.5	-
PVNO	-	-	0.5	0.3	-	-
QEA	-	-	-	-	1.0	-
SRP 1	0.2	0.5	0.3	-	0.2	-
	I	II	III	IV	V	VI
실리콘항발포제	- 0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	-
Mg황산염	-	-	0.2	-	0.2	-
기타					100%까지	

실시예 20

특히 착색된 의류의 세탁에 사용되는 다음의 표백제를 함유하지 않은 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III
취입분말			
제올라이트A	15.0	15.0	-
황산염	-	5.0	-
LAS	3.0	3.0	-
DETPMP	0.4	0.5	-
CMC	0.4	0.4	-
MA/AA	4.0	4.0	-
응집체			
C45AS	-	-	11.0
LAS	6.0	5.0	-
TAS	3.0	2.0	-
규산염	4.0	4.0	-
제올라이트A	10.0	15.0	13.0
CMC	-	-	0.5
MA/AA	-	-	2.0
탄산염	9.0	7.0	7.0
분무			
방향제	0.3	0.3	0.5
C45E7	4.0	4.0	4.0
C25E3	2.0	2.0	2.0
건조첨가제			
MA/AA	-	-	3.0
Na-SKS-6	-	-	12.0
시트르산염	10.0	-	8.0
중탄산염	7.0	3.0	5.0

	I	II	III
탄산염	8.0	5.0	7.0
PVPVI/PVNO	0.5	0.5	0.5
프로테아제	0.03	0.02	0.05
만난나제	0.001	0.004	0.03
리파제	0.008	0.008	0.008
아밀라제	0.01	0.01	0.01
셀룰라제	0.001	0.001	0.001
실리콘항발포제	5.0	5.0	5.0
황산염	-	9.0	-
밀도(g/l)	700	700	700
기타			100%까지

실시예 21

다음의 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV
기초과립				
제올라이트 A	30.0	22.0	24.0	10.0
황산염	10.0	5.0	10.0	7.0
MA/AA	3.0	-	-	-
AA	-	1.6	2.0	-
MA/AA 1	-	12.0	-	6.0
LAS	14.0	10.0	9.0	20.0
C45AS	8.0	7.0	9.0	7.0
C45AES	-	1.0	1.0	-
규산염	-	1.0	0.5	10.0
비누	-	2.0	-	-
증백제 1	0.2	0.2	0.2	0.2
탄산염	6.0	9.0	10.0	10.0
PEG 4000	-	1.0	1.5	-
DTPA	-	0.4	-	-
분무				
C25E9	-	-	-	5.0
C45E7	1.0	1.0	-	-
C23E9	-	1.0	2.5	-
방향제	0.2	0.3	0.3	-
건조첨가제				
탄산염	5.0	10.0	18.0	8.0
PVPVI/PVNO	0.5	-	0.3	-
프로테아제	0.03	0.03	0.03	0.02
만난나제	0.002	0.009	0.015	0.03
리파제	0.008	-	-	0.008
	I	II	III	IV
아밀라제	0.002	-	-	0.002
셀룰라제	0.0002	0.0005	0.0005	0.0002
NOBS	-	4.0	-	4.5
PB1	1.0	5.0	1.5	6.0
황산염	4.0	5.0	-	5.0
SRP 1	-	0.4	-	-
비누거품 억제제	-	0.5	0.5	-
기타				100%까지

실시예 22

다음의 과립형 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III
취입분말			
제올라이트A	20.0	-	15.0
STPP	-	20.0	-
황산염	-	-	5.0
탄산염	-	-	5.0
TAS	-	-	1.0
LAS	6.0	6.0	6.0
C68AS	2.0	2.0	-
규산염	3.0	8.0	-
MA/AA	4.0	2.0	2.0
CMC	0.6	0.6	0.2
증백제 1	0.2	0.2	0.1
DETPMP	0.4	0.4	0.1
STS	-	-	1.0
분무			
C45E7	5.0	5.0	4.0
실리콘항발포제	0.3	0.3	0.1
방향제	0.2	0.2	0.3
건조첨가제			
QEA	-	-	1.0
탄산염	14.0	9.0	10.0
PB1	1.5	2.0	-
PB4	18.5	13.0	13.0
TAED	2.0	2.0	2.0
QAS	-	-	1.0
	I	II	III
광활성화된 표백제	15 ppm	15 ppm	15 ppm
Na-SKS-6	-	-	3.0
프로테아제	0.03	0.03	0.007
만난나제	0.001	0.005	0.02
리파제	0.004	0.004	0.004
아밀라제	0.006	0.006	0.003
셀룰라제	0.0002	0.0002	0.0005
황산염	10.0	20.0	5.0
밀도(g/l)	700	700	700
기타			100%까지

실시예 23

다음의 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III
취입분말			
제올라이트A	15.0	15.0	15.0
황산염	-	5.0	-
LAS	3.0	3.0	3.0
QAS	-	1.5	1.5
DETPMP	0.4	0.2	0.4
EDDS	-	0.4	0.2
CMC	0.4	0.4	0.4
MA/AA	4.0	2.0	2.0
응집체			
LAS	5.0	5.0	5.0
TAS	2.0	2.0	1.0
규산염	3.0	3.0	4.0
제올라이트	8.0	8.0	8.0
탄산염	8.0	8.0	4.0
분무			
방향제	0.3	0.3	0.3
C45E7	2.0	2.0	2.0
C25E3	2.0	-	-
건조첨가제			
시트르산염	5.0	-	2.0
중탄산염	-	3.0	-
탄산염	8.0	15.0	10.0
TAED	6.0	2.0	5.0
PB1	14.0	7.0	10.0
PEO	-	-	0.2
	I	II	III
벤토나이트점토	-	-	10.0
프로테아제	0.03	0.03	0.03
만난나제	0.001	0.005	0.01
리파제	0.008	0.008	0.008
셀룰라제	0.001	0.001	0.001
아밀라제	0.01	0.01	0.01
실리콘 항발포제	5.0	5.0	5.0
황산염	-	3.0	-
밀도(g/l)	850	850	850
기타			100%까지

실시예 24

다음의 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV
LAS	18.0	14.0	24.0	20.0
QAS	0.7	1.0	-	0.7
TFAA	-	1.0	-	-
C23E56.5	-	-	1.0	-
C45E7	-	1.0	-	-
C45E3S	1.0	2.5	1.0	-
STPP	32.0	18.0	30.0	22.0
규산염	9.0	5.0	9.0	8.0
탄산염	11.0	7.5	10.0	5.0
중탄산염	-	7.5	-	-
PB1	3.0	1.0	-	-
PB4	-	1.0	-	-
NOBS	2.0	1.0	-	-
DETPMP	-	1.0	-	-
DTPA	0.5	-	0.2	0.3
SRP 1	0.3	0.2	-	0.1
MA/AA	1.0	1.5	2.0	0.5
CMC	0.8	0.4	0.4	0.2
PEI	-	-	0.4	-
황산염	20.0	10.0	20.0	30.0
Mg 황산염	0.2	-	0.4	0.9
만난나제	0.001	0.005	0.01	0.015
프로테아제	0.03	0.03	0.02	0.02
아밀라제	0.008	0.007	-	0.004
리피제	0.004	-	0.002	-
셀룰라제	0.0003	-	-	0.0001

		I	II	III	IV
광활성화된 표백제		30 ppm	20 ppm	-	10 ppm
방향제		0.3	0.3	0.1	0.2
증백제	1/2	0.05	0.02	0.08	0.1
기타					100%까지

실시예 25

다음의 액체 세제 제형을 본 발명에 따라 제조하였다 (수준은 중량부로 제공되며, 효소는 순수한 효소로 표시된다):

	I	II	III	IV	V
LAS	11.5	8.8	-	3.9	-
C25E2.5S	-	3.0	18.0	-	16.0
C45E2.25S	11.5	3.0	-	15.7	-
C23E9	-	2.7	1.8	2.0	1.0
C23E7	3.2	-	-	-	-
CFAA	-	-	5.2	-	3.1
TPKFA	1.6	-	2.0	0.5	2.0
시트르산 (50%)	6.5	1.2	2.5	4.4	2.5
Ca 포름산염	0.1	0.06	0.1	-	-
Na 포름산염	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
SCS	4.0	1.0	3.0	1.2	-
붕산염	0.6	-	3.0	2.0	2.9
수산화나트륨	5.8	2.0	3.5	3.7	2.7
에탄올	1.75	1.0	3.6	4.2	2.9
1,2 프로판디올	3.3	2.0	8.0	7.9	5.3
모노에탄올아민	3.0	1.5	1.3	2.5	0.8
TEPAE	1.6	-	1.3	1.2	1.2
만난나제	0.001	0.01	0.015	0.015	0.001
프로테아제	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02
리파제	-	-	0.002	-	-
아밀라제	-	-	-	0.002	-
셀룰라제	-	-	0.0002	0.0005	0.0001
SRP 1	0.2	-	0.1	-	-
DTPA	-	-	0.3	-	-
PVNO	-	-	0.3	-	0.2

	I	II	III	IV	V
증백제 1	0.2	0.07	0.1	-	-
실리콘 항발포제	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
기타					

실시예 26

다음의 액체 세제 제형을 본 발명에 따라 제조하였다 (수준은 중량부로 제공되며, 효소는 순수한 효소로 표시된다):

	I	II	III	IV
LAS	10.0	13.0	9.0	-
C25AS	4.0	1.0	2.0	10.0
C25E3S	1.0	-	-	3.0
C25E7	6.0	8.0	13.0	2.5
TFAA	-	-	-	4.5
APA	-	1.4	-	-
TPKFA	2.0	-	13.0	7.0
시트르산	2.0	3.0	1.0	1.5
도데세닐 /테트라데세닐 숙신산	12.0	10.0	-	-
평지씨 지방산	4.0	2.0	1.0	-
에탄올	4.0	4.0	7.0	2.0
1,2 프로판디올	4.0	4.0	2.0	7.0
모노에탄올아민	-	-	-	5.0
트리에탄올아민	-	-	8.0	-
TEPAE	0.5	-	0.5	0.2
DETPMP	1.0	1.0	0.5	1.0
만난나제	0.001	0.015	0.01	0.03
프로테아제	0.02	0.02	0.01	0.008
리파제	-	0.002	-	0.002
아밀라제	0.004	0.004	0.01	0.008
셀룰라제	-	-	-	0.002
SRP 2	0.3	-	0.3	0.1
붕산	0.1	0.2	1.0	2.0
염화칼슘	-	0.02	-	0.01

	I	II	III	IV
증백제	-	0.4	-	-
비누거품 억제제	0.1	0.3	-	0.1
불투명화제	0.5	0.4	-	0.3
NaOH로 조절 pH	8.0	8.0	7.6	7.7
기타 및 물				

실시예 27

다음의 액체 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다 (수준은 중량부로 제공되며, 효소는 순수한 효소로 표시된다):

	I	II	III	IV
LAS	25.0	-	-	-
C25AS	-	13.0	18.0	15.0
C25E3S	-	2.0	2.0	4.0
C25E7	-	-	4.0	4.0
TFAA	-	6.0	8.0	8.0
APA	3.0	1.0	2.0	-
TPKFA	-	15.0	11.0	11.0
시트르산	1.0	1.0	1.0	1.0
도데세닐/테트라데세닐 숙신산	15.0	-	-	-
평지씨 지방산	1.0	-	3.5	-
에탄올	7.0	2.0	3.0	2.0
1,2프로판디올	6.0	8.0	10.0	13.0
모노에탄올아민	-	-	9.0	9.0
TEPAE	-	-	0.4	0.3
DETPMP	2.0	1.2	1.0	-
만난나제	0.001	0.0015	0.01	0.01
프로테아제	0.05	0.02	0.01	0.02
리파제	-	-	0.003	0.003
아밀라제	0.004	0.01	0.01	0.01
셀룰라제	-	-	0.004	0.003
SRP 2	-	-	0.2	0.1
붕산	1.0	1.5	2.5	2.5
벤토나이트 점토	4.0	4.0	-	-
증백제 1	0.1	0.2	0.3	-
	I	II	III	IV
비누거품 억제제	0.4	-	-	-
불투명화제	0.8	0.7	-	-
NaOH로 조절 pH	8.0	7.5	8.0	8.2
기타 및 물				

실시예 28

다음의 액체 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다 (수준은 중량부로 제공되며, 효소는 순수한 효소로 표시된다):

	I	II
LAS	27.6	18.9
C45AS	13.8	5.9
C13E8	3.0	3.1
올레산	3.4	2.5
시트르산	5.4	5.4
수산화나트륨	0.4	3.6
포름산칼슘	0.2	0.1
포름산나트륨	-	0.5
에탄올	7.0	-
모노에탄올아민	16.5	8.0
1,2 프로판디올	5.9	5.5
크실렌술폰산	-	2.4
TEPAE	1.5	0.8
프로테아제	0.05	0.02
만난나제	0.001	0.01
PEG	-	0.7
증백제 2	0.4	0.1
방향제	0.5	0.3
물 및 기타		

실시예 29

"세척을 통한 연화"능력을 제공하는 다음의 과립형 직물 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II
C45AS	-	10.0
LAS	7.6	-
C68AS	1.3	-
C45E7	4.0	-
C25E3	-	5.0
코코-알킬-디메틸-히드록시에틸 암모늄 클로라이드	1.4	1.0
시트르산염	5.0	3.0
Na-SKS-6	-	11.0
제올라이트 A	15.0	15.0
MA/AA	4.0	4.0
DETPMP	0.4	0.4
PB1	15.0	-
과탄산염	-	15.0
TAED	5.0	5.0
스멕틱점토	10.0	10.0
HMWPEO	-	0.1
만난나제	0.001	0.01
프로테아제	0.02	0.01
리파제	0.02	0.01
아밀라제	0.03	0.005
셀룰라제	0.001	-
규산염	3.0	5.0
탄산염	10.0	10.0
비누거품 억제제	1.0	4.0
	I	II
CMC	0.2	0.1
기타		100%까지

실시예 30

다음의 세정제가 첨가된 직물 연화제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

DEQA (2)	20.0
만난나제	0.0008
셀룰라제	0.001
HCL	0.03
향발포제	0.01
푸른색염료	25ppm
$CaCl_2$	0.20
방향제	0.90
기타 및 물	100%까지

실시예 31

다음의 직물 연화제 및 건조제 첨가 직물 콘디셔너 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V
DEQA	2.6	19.0	-	-	-
DEQA(2)	-	-	-	-	51.8
DTMAMS	-	-	-	26.0	-
SDASA	-	-	70.0	42.0	40.2
IV=0의 스테아르산	0.3	-	-	-	-
네오돌 45-13	-	-	13.0	-	-
염산	0.02	0.02	-	-	-
에탄올	-	-	1.0	-	-
만난나제	0.0008	0.0002	0.0005	0.005	0.0002
방향제	1.0	1.0	0.75	1.0	1.5
글리코퍼스 S-20	-	-	-	-	15.4
글리세롤 모노스테아레이트	-	-	-	26.0	-
디제라닐 숙시네이트	-	-	0.38	-	-
실리콘 항발포제	0.01	0.01	-	-	-
전해질	-	0.1	-	-	-
점토	-	-	-	3.0	-
염료	10ppm	25ppm	0.01	-	-
물 및 기타	100%	100%	-	-	-

실시예 32

다음의 세탁용 바 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다 (수준은 중량부로 제공되며, 효소는 순수한 효소로 표시된다):

	I	II	III	VI	V	III	VI	V
LAS	-	-	19.0	15.0	21.0	6.75	8.8	-
C28AS	30.0	13.5	-	-	-	15.75	11.2	22.5
라우르산 나트륨	2.5	9.0	-	-	-	-	-	-
제올라이트 A	2.0	1.25	-	-	-	1.25	1.25	1.25
탄산염	20.0	3.0	13.0	8.0	10.0	15.0	15.0	10.0
탄산칼슘	27.5	39.0	35.0	-	-	40.0	-	40.0
황산염	5.0	5.0	3.0	5.0	3.0	-	-	5.0
TSPP	5.0	-	-	-	-	5.0	2.5	-
STPP	5.0	15.0	10.0	-	-	7.0	8.0	10.0
벤토나이트점토	-	10.0	-	-	5.0	-	-	-
DETPMP	-	0.7	0.6	-	0.6	0.7	0.7	0.7
CMC	-	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	1.0
탈크	-	-	10.0	15.0	10.0	-	-	-
규산염	-	-	4.0	5.0	3.0	-	-	-
PVNO	0.02	0.03	-	0.01	-	0.02	-	-
MA/AA	0.4	1.0	-	-	0.2	0.4	0.5	0.4
SRP 1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
만난나제	0.001	0.001	0.01	0.01	0.015	0.001	0.05	0.01
아밀라제	-	-	0.01	-	-	-	0.002	-
	I	II	III	VI	V	III	VI	V
프로테아제	0.001	0.004	0.001	0.003	0.003	0.001	0.001	0.003
리파제	-	0.002	-	0.002	-	-	-	-
셀룰라제	-	.0003	-	-	.0003	.0002	-	-
PEO	-	0.2	-	0.2	0.3	-	-	0.3
방향제	1.0	0.5	0.3	0.2	0.4	-	-	0.4
황산마그네슘	-	-	3.0	3.0	3.0	-	-	-
증백제	0.15	0.1	0.15	-	-	-	-	0.1
광활성화된 표백제(ppm)	-	15.0	15.0	15.0	15.0	-	-	15.0

실시예 33

다음의 세제 첨가제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	
LAS	-	5.0	5.0	
STPP	30.0	-	20.0	
제올라이트A	-	35.0	20.0	
PB1	20.0	15.0	-	
TAED	10.0	8.0	-	
만난나제	0.001	0.01	0.01	
프로테아제	0.3	0.3	0.3	
아밀라제	-	0.06	0.06	
물 및 기타				100%까지

실시예 34

다음의 압축형 고밀도 (0.96 Kg/l) 접시세척용 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	-	54.3	51.4	51.4	-	-	50.9
시트르산염	35.0	17.0	-	-	-	46.1	40.2	-
탄산염	-	17.5	14.0	14.0	14.0	-	8.0	32.1
중탄산염	-	-	-	-	-	25.4	-	-
규산염	32.0	14.8	14.8	10.0	10.0	1.0	25.0	3.1
메타규산염	-	2.5	-	9.0	9.0	-	-	-
PB1	1.9	9.7	7.8	7.8	7.8	-	-	-
PB4	8.6	-	-	-	-	-	-	-
과탄산염	-	-	-	-	-	6.7	11.8	4.8
비이온성	1.5	2.0	1.5	1.7	1.5	2.6	1.9	5.3
TAED	5.2	2.4	-	-	-	2.2	-	1.4
HEDP	-	1.0	-	-	-	-	-	-
DETPMP	-	0.6	-	-	-	-	-	-
MnTACN	-	-	-	-	-	-	0.008	-
PAAC	-	-	0.008	0.01	0.007	-	-	-
BzP	-	-	-	-	1.4	-	-	-
파리핀	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	-	-
만난나제	0.001	0.001	0.002	0.002	0.001	0.003	0.002	0.002
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
프로테아제	0.072	0.072	0.029	0.053	0.046	0.026	0.059	0.06
아밀라제	0.012	0.012	0.006	0.012	0.013	0.009	0.017	0.03
리파제	-	0.001	-	0.005	-	-	-	-
BTA	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-	0.3	0.3
MA/AA	-	-	-	-	-	-	4.2	-
480N	3.3	6.0	-	-	-	-	-	0.9
방향제	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
황산염	7.0	20.0	5.0	2.2	0.8	12.0	4.6	-
pH	10.8	11.0	10.8	11.3	11.3	9.6	10.8	10.9
기타 및 물							100%까지	

실시예 35

벌크 밀도가 1.02 Kg/L인 다음의 과립형 접시세척용 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII
STPP	30.0	30.0	33.0	34.2	29.6	31.1	26.6	17.6
탄산염	30.5	30.5	31.0	30.0	23.0	39.4	4.2	45.0
규산염	7.4	7.4	7.5	7.2	13.3	3.4	43.7	12.4
메타규산염	-	-	4.5	5.1	-	-	-	-
과탄산염	-	-	-	-	-	4.0	-	-
PB1	4.4	4.2	4.5	4.5	-	-	-	-
NADCC	-	-	-	-	2.0	-	1.6	1.0
비이온성	1.2	1.0	0.7	0.8	1.9	0.7	0.6	0.3
TAED	1.0	-	-	-	-	0.8	-	-
PAAC	-	0.004	0.004	0.004	-	-	-	-
BzP	-	-	-	1.4	-	-	-	-
파라핀	0.25	0.25	0.25	0.25	-	-	-	-
만난나제	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
프로테아제	0.036	0.015	0.03	0.028	-	0.03	-	-
아밀라제	0.003	0.003	0.01	0.006	-	0.01	-	-
리파제	0.005	-	0.001	-	-	-	-	-
BTA	0.15	0.15	0.15	0.15	-	-	-	-
방향제	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	-
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VII
황산염	23.4	25.0	22.0	18.5	30.1	19.3	23.1	23.6
pH	10.8	10.8	11.3	11.3	10.7	11.5	12.7	10.9
기타 및 물	100%까지							

실시예 36

다음의 정제 세제 조성물을 본 발명에 따라, 과립 접시세척용 세제 조성물을 표준 12 헤드 회전식 프레스를 사용하여 13 KN/cm^2의 압력으로 압착함으로써 제조하였다:

	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	48.8	49.2	38.0	-	46.8
시트르산염	26.4	-	-	-	31.1	-
탄산염	-	5.0	14.0	15.4	14.4	23.0
규산염	26.4	14.8	15.0	12.6	17.7	2.4
만난나제	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.02
프로테아제	0.058	0.072	0.041	0.033	0.052	0.013
아밀라제	0.01	0.03	0.012	0.007	0.016	0.002
리파제	0.005	-	-	-	-	-
PB1	1.6	7.7	12.2	10.6	15.7	-
PB4	6.9	-	-	-	-	14.4
비이온성	1.5	2.0	1.5	1.65	0.8	6.3
PAAC	-	-	0.02	0.009	-	-
MnTACN	-	-	-	-	0.007	-
TAED	4.3	2.5	-	-	1.3	1.8
HEDP	0.7	-	-	0.7	-	0.4
DETPMP	0.65	-	-	-	-	-
파라핀	0.4	0.5	0.5	0.55	-	-
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	-	-
PA30	3.2	-	-	-	-	-
MA/AA	-	-	-	-	4.5	0.55
방향제	-	-	0.05	0.05	0.2	0.2
황산염	24.0	13.0	2.3	-	10.7	3.4
정제의 중량	25g	25g	20g	30g	18g	20g
	I	II	III	IV	V	VI
pH	10.6	10.6	10.7	10.7	10.9	11.2
기타 및 물	100%까지					

실시예 37

밀도가 1.40 Kg/L인 다음의 액체 접시세척용 세제 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV
STPP	17.5	17.5	17.2	16.0
탄산염	2.0	-	2.4	-
규산염	5.3	6.1	14.6	15.7
NaOCl	1.15	1.15	1.15	1.25
폴리겐/카르보폴	1.1	1.0	1.1	1.25
비이온성	-	-	0.1	-
NaBz	0.75	0.75	-	-
만난나제	0.001	0.005	0.01	0.001
NaOH	-	1.9	-	3.5
KOH	2.8	3.5	3.0	-
pH	11.0	11.7	10.9	11.0
황산염, 기타 및 물	100%까지			

실시예 38

다음의 액체 접시세척 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V
C17ES	28.5	27.4	19.2	34.1	34.1
산화아민	2.6	5.0	2.0	3.0	3.0
C12글루코스 아미드	-	-	6.0	-	-
베타인	0.9	-	-	2.0	2.0
크실렌술포네이트	2.0	4.0	-	2.0	-
네오돌 C11E9	-	-	5.0	-	-
다가 지방산 아미드	-	-	-	6.5	6.5
디에틸렌 펜타아세트산 나트륨(40%)	-	-	0.03	-	-
TAED	-	-	-	0.06	0.06
슈크로스	-	-	-	1.5	1.5
에탄올	4.0	5.5	5.5	9.1	9.1
알킬 디페닐 옥사이드 디술포네이트	-	-	-	-	2.3
포름산 칼슘	-	-	-	0.5	1.1
시트르산 암모늄	0.06	0.1	-	-	-
염화나트륨	-	1.0	-	-	-
염화마그네슘	3.3	-	0.7	-	-
염화칼슘	-	-	0.4	-	-
황산나트륨	-	-	0.06	-	-
황산마그네슘	0.08	-	-	-	-
수산화마그네슘	-	-	-	2.2	2.2
수산화나트륨	-	-	-	1.1	1.1
과산화수소	200ppm	0.16	0.006	-	-
	I	II	III	IV	V
만난나제	0.001	0.05	0.001	0.001	0.015
프로테아제	0.017	0.005	0.035	0.003	0.002
방향제	0.18	0.09	0.09	0.2	0.2
물 및 기타				100%까지	

실시예 39

다음의 액체 경질 표면 클리닝 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

	I	II	III	IV	V
만난나제	0.001	0.0015	0.0015	0.05	0.01
아밀라제	0.01	0.002	0.005	-	-
프로테아제	0.05	0.01	0.02	-	-
과산화수소	-	-	-	6.0	6.8
아세틸 트리에틸 시트레이트	-	-	-	2.5	-
DTPA	-	-	-	0.2	-
부틸 히드록시 톨루엔	-	-	-	0.05	-
EDTA*	0.05	0.05	0.05	-	-
시트르산/시트르산염	2.9	2.9	2.9	1.0	-
LAS	0.5	0.5	0.5	-	-
C12 AS	0.5	0.5	0.5	-	-
C10AS	-	-	-	-	1.7
C12(E)S	0.5	0.5	0.5	-	-
C12,13 E6.5비이온성	7.0	7.0	7.0	-	-
네오돌 23-6.5	-	-	-	12.0	-
도바놀 23-3	-	-	-	-	1.5
도바놀 91-10	-	-	-	-	1.6
C25AE1.8S	-	-	-	6.0	
파라핀 술폰산 나트륨	-	-	-	6.0	
방향제	1.0	1.0	1.0	0.5	0.2
프로판디올	-	-	-	1.5	
	I	II	III	IV	V
에톡실화된 테트라에틸렌 펜타아민	-	-	-	1.0	-
2, 부틸 옥타놀	-	-	-	-	0.5
헥실 카르비톨**	1.0	1.0	1.0	-	-
SCS	1.3	1.3	1.3	-	-
pH 조정	7-12	7-12	7-12	4	-
기타 및 물				100% 까지	

*Na4에틸렌디아민 디아세트산

**디에틸렌 글리콜 모노헥실 에테르

실시예 40

경질 표면을 클리닝하고 가정내 곰팡이를 제거하기 위한 다음의 분무 조성물을 본 발명에 따라 제조하였다:

만난나제	0.01
아밀라제	0.01
프로테아제	0.01
옥틸 황산 나트륨	2.0
도데실 황산 나트륨	4.0
수산화 나트륨	0.8
규산염	0.04
부틸 카르비톨*	4.0
방향제	0.35
물/기타	100%까지

*디에틸렌 글리콜 모노부틸 에테르

[참고문헌]

Aviv, H. & Leder, P. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 1408-1412.

Becker, D. M. & Guarante, L. 1991. Methods Enzymol. 194: 182-187.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. 1979. Biochem-
istry 18: 5294-5299.

Gubler, U. & Hoffman, B. J. 1983. Gene 25: 263-269.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5463-5467.

Lever, M. (1972) A new reaction for colormetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. *47*, 273-279.

N. C. Carpita and D. M. Gibeaut (1993) The Plant Journal **3**:1-30.

Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. J. Bacteriol. **172**:4315-4321.

SEQUENCE LISTING

<110> NOVO NORDISK A/S

<120> NOVEL MANNANASES

<130> 5440-WO

<140>

<141>

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1470

<212> DNA

<213> Bacillus sp. I633

<400> 1

ttgaataatg gttttaaaaa aatttttct ataacattat cattactatt agctagctct 60
attctgttcg tttcaggaac ttctacagct aatgcaaatt ccggatttta tgtaagcggt 120
accactctat acgatgccaa tggaaaccca tttgtaatga gagggattaa ccatgggcac 180
gcatggtata aagaccaggc aactactgca attgaaggga ttgcaaatac cggtgctaat 240
acggtccgga ttgtgttatc tgatgggggga caatggacaa aagatgacat ccatacagta 300
agaaacctta tctctttagc ggaagataat catttggttg ctgttcttga agttcatgat 360
gctaccggtt atgattccat tgcttcgctc aatcgtgctg ttgattattg gattgaaatg 420
agaagtgctt taattggaaa ggaagatacc gtcattatta atattgcgaa tgaatggttt 480
ggttcgtggg aaggggatgc ttgggctgac gggtataaac aagcaatccc gcgattgcgt 540
aacgccggtc taaaccatac cttgatggta gatgctgcgg ggtggggaca atttccacaa 600
tcgattcatg attatggaag agaagttttt aatgctgacc ctcaacgaaa tacaatgttt 660
tcgattcata tgtatgaata tgcaggtggt aatgcatcgc aagttcgtac taatattgac 720
cgagttctta atcaagacct cgcattagtc attggtgaat ttggacaccg tcatacaaat 780
ggtgacgtcg atgaagcaac gattatgagc tattctgaac aaagaggagt tgggtggttg 840
gcgtggtcat ggaaagggaa cggcccagaa tgggagtatt tagacctttc gaatgattgg 900
gctggaaata accttacagc ttggggaaat acaatagtga atggtccata tggtttaaga 960
gaaacttcga gattaagcac cgtttttaca ggtggaggat ctgatggagg aacttctccg 1020
acaactcttt atgattttga aggtagtatg caaggatgga ctggaagtag cttgagcgga 1080
ggtccttggg ctgtgacaga gtggtcttct aaaggaagtc attctttaaa agcggatatt 1140
caattgtcgt caaattcaca acattactta catgttattc aaaatacgtc tttacagcag 1200
aatagtagga tacaagctac tgttaaacat gcaaattggg gaagtgttgg taatggaatg 1260
actgcgcgtc tttatgtgaa aacaggacat ggttatacat ggtactctgg aagctttgtg 1320
ccgattaacg gttcatctgg aacaacgcta tctctagatt tatcaaatgt ccaaaatctt 1380
tctcaagtaa gggaaattgg agttcagttc caatcagcga gtgatagtag tggacaaaca 1440
tcgatttata ttgataatgt gattgtagaa 1470

<210> 2

<211> 490

<212> PRT

<213> Bacillus sp. I633

<400> 2

Leu Asn Asn Gly Phe Lys Lys Ile Phe Ser Ile Thr Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ser Ser Ile Leu Phe Val Ser Gly Thr Ser Thr Ala Asn Ala
20 25 30
Asn Ser Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly
35 40 45
Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr Lys
50 55 60
Asp Gln Ala Thr Thr Ala Ile Glu Gly Ile Ala Asn Thr Gly Ala Asn
65 70 75 80
Thr Val Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Thr Lys Asp Asp
85 90 95
Ile His Thr Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Asp Asn His Leu
100 105 110
Val Ala Val Pro Glu Val His Asp Ala Thr Gly Tyr Asp Ser Ile Ala
115 120 125
Ser Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Arg Ser Ala Leu
130 135 140
Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Phe
145 150 155 160
Gly Ser Trp Glu Gly Asp Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala Ile
165 170 175
Pro Arg Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Met Val Asp Ala
180 185 190
Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Arg Glu
195 200 205
Val Phe Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
210 215 220
Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Gln Val Arg Thr Asn Ile Asp
225 230 235 240
Arg Val Leu Asn Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His
245 250 255
Arg His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr Ser
260 265 270
Glu Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Gly
275 280 285
Pro Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ala Gly Asn Asn
290 295 300
Leu Thr Ala Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Gly Pro Tyr Gly Leu Arg
305 310 315 320
Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Gly Gly Gly Ser Asp Gly
325 330 335
Gly Thr Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Met Gln Gly
340 345 350
Trp Thr Gly Ser Ser Leu Ser Gly Gly Pro Trp Ala Val Thr Glu Trp
355 360 365
Ser Ser Lys Gly Ser His Ser Leu Lys Ala Asp Ile Gln Leu Ser Ser

370 375 380

Asn Ser Gln His Tyr Leu His Val Ile Gln Asn Thr Ser Leu Gln Gln
385 390 395 400

Asn Ser Arg Ile Gln Ala Thr Val Lys His Ala Asn Trp Gly Ser Val
405 410 415

Gly Asn Gly Met Thr Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly His Gly Tyr
420 425 430

Thr Trp Tyr Ser Gly Ser Phe Val Pro Ile Asn Gly Ser Ser Gly Thr
435 440 445

Thr Leu Ser Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Arg
450 455 460

Glu Ile Gly Val Gln Phe Gln Ser Ala Ser Asp Ser Ser Gly Gln Thr
465 470 475 480

Ser Ile Tyr Ile Asp Asn Val Ile Val Glu
485 490

<210> 3

<211> 1438

<212> DNA

<213> Bacillus sp. I633

<400> 3

gcaaattccg gattttatgt aagcggtacc actctatacg atgccaatgg aaacccattt 60
gtaatgagag ggattaacca tgggcacgca tggtataaag accaggcaac tactgcaatt 120
gaagggattg caaataccgg tgctaatacg gtccggattg tgttatctga tgggggacaa 180
tggacaaaag atgacatcca tacagtaaga aaccttatct ctttagcgga agataatcat 240
ttggttgctg ttcctgaagt tcatgatgct accggttatg attccattgc ttcgctcaat 300
cgtgctgttg attattggat tgaaatgaga agtgctttaa ttggaaagga agataccgtc 360
attattaata ttgcgaatga atggtttggt tcgtgggaag gggatgcttg ggctgacggg 420
tataaacaag caatcccgcg attgcgtaac gccggtctaa accatacctt gatggtagat 480
gctgcggggt ggggacaatt tccacaatcg attcatgatt atggaagaga agtttttaat 540
gctgaccctc aacgaaatac aatgttttcg attcatatgt atgaatatgc aggtggtaat 600
gcatcgcaag ttcgtactaa tattgaccga gttcttaatc aagacctcgc attagtcatt 660
ggtgaatttg gacaccgtca tacaaatggt gacgtcgatg aagcaacgat tatgagctat 720
tctgaacaaa gaggagttgg gtggttggcg tggtcatgga aagggaacgg cccagaatgg 780
gagtatttag acctttcgaa tgattgggct ggaaataacc ttacagcttg gggaaataca 840
atagtgaatg gtccatatgg tttaagagaa acttcgagat taagcaccgt ttttacagct 900
agcccggaac caacaccaga gccgaccgca aatacaccgg tatcaggcaa tttgaaggtt 960
gaattctaca acagcaatcc ttcagatact actaactcaa tcaatcctca gttcaaggtt 1020
actaataccg gaagcagtgc aattgatttg tccaaactca cattgagata ttattataca 1080
gtagacggac agaaagatca gaccttctgg tgtgaccatg ctgcaataat cggcagtaac 1140
ggcagctaca acggaattac ttcaaatgta aaaggaacat ttgtaaaaat gagttcctca 1200
acaaataacg cagacaccta ccttgaaata agctttacag gcggaactct tgaaccgggt 1260
gcacatgttc agatacaagg tagatttgca aagaatgact ggagtaacta tacacagtca 1320
aatgactact cattcaagtc tcgttcacag tttgttgaat gggatcaggt aacagcatac 1380
ttgaacggtg ttcttgtatg gggtaaagaa cccggtggca gtgtagtata gcggccgc 1438

<210> 4

<211> 476

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 4

```
Ala Asn Ser Gly Phe Tyr Val Ser Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Asn
  1               5                  10                  15
Gly Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr
             20                  25                  30
Lys Asp Gln Ala Thr Thr Ala Ile Glu Gly Ile Ala Asn Thr Gly Ala
         35                  40                  45
Asn Thr Val Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Thr Lys Asp
     50                  55                  60
Asp Ile His Thr Val Arg Asn Leu Ile Ser Leu Ala Glu Asp Asn His
 65                  70                  75                  80
Leu Val Ala Val Pro Glu Val His Asp Ala Thr Gly Tyr Asp Ser Ile
                 85                  90                  95
Ala Ser Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Arg Ser Ala
            100                 105                 110
Leu Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp
        115                 120                 125
Phe Gly Ser Trp Glu Gly Asp Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Lys Gln Ala
    130                 135                 140
Ile Pro Arg Leu Arg Asn Ala Gly Leu Asn His Thr Leu Met Val Asp
145                 150                 155                 160
Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Arg
                165                 170                 175
Glu Val Phe Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Ile His
            180                 185                 190
Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asn Ala Ser Gln Val Arg Thr Asn Ile
        195                 200                 205
Asp Arg Val Leu Asn Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly
    210                 215                 220
His Arg His Thr Asn Gly Asp Val Asp Glu Ala Thr Ile Met Ser Tyr
225                 230                 235                 240
Ser Glu Gln Arg Gly Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn
                245                 250                 255
Gly Pro Glu Trp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Trp Ala Gly Asn
            260                 265                 270
Asn Leu Thr Ala Trp Gly Asn Thr Ile Val Asn Gly Pro Tyr Gly Leu
        275                 280                 285
Arg Glu Thr Ser Arg Leu Ser Thr Val Phe Thr Ala Ser Pro Glu Pro
    290                 295                 300
Thr Pro Glu Pro Thr Ala Asn Thr Pro Val Ser Gly Asn Leu Lys Val
305                 310                 315                 320
Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Pro Ser Asp Thr Thr Asn Ser Ile Asn Pro
```

325 330 335

Gln Phe Lys Val Thr Asn Thr Gly Ser Ser Ala Ile Asp Leu Ser Lys

340 345 350

Leu Thr Leu Arg Tyr Tyr Tyr Thr Val Asp Gly Gln Lys Asp Gln Thr

355 360 365

Phe Trp Cys Asp His Ala Ala Ile Ile Gly Ser Asn Gly Ser Tyr Asn

370 375 380

Gly Ile Thr Ser Asn Val Lys Gly Thr Phe Val Lys Met Ser Ser Ser

385 390 395 400

Thr Asn Asn Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Ile Ser Phe Thr Gly Gly Thr

405 410 415

Leu Glu Pro Gly Ala His Val Gln Ile Gln Gly Arg Phe Ala Lys Asn

420 425 430

Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Lys Ser Arg

435 440 445

Ser Gln Phe Val Glu Trp Asp Gln Val Thr Ala Tyr Leu Asn Gly Val

450 455 460

Leu Val Trp Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Val Val

465 470 475

<210> 5

<211> 1482

<212> DNA

<213> Bacillus agaradhaerens

<400> 5

atgaaaaaaa agttatcaca gatttatcat ttaattattt gcacacttat aataagtgtg 60

ggaataatgg ggattacaac gtccccatca gcagcaagta caggctttta tgttgatggc 120

aatacgttat atgacgcaaa tgggcagcca tttgtcatga gaggtattaa ccatggacat 180

gcttggtata aagacaccgc ttcaacagct attcctgcca ttgcagagca aggcgccaac 240

acgattcgta ttgttttatc agatggcggt caatgggaaa aagacgacat tgacaccatt 300

cgtgaagtca ttgagcttgc ggagcaaaat aaaatggtgg ctgtcgttga agttcatgat 360

gccacgggtc gcgattcgcg cagtgattta aatcgagccg ttgattattg gatagaaatg 420

aaagatgcgc ttatcggtaa agaagatacg gttattatta acattgcaaa cgagtggtat 480

gggagttggg atggctcagc ttgggccgat ggctatattg atgtcattcc gaagcttcgc 540

gatgccggct taacacacac cttaatggtt gatgcagcag gatgggggca atatccgcaa 600

tctattcatg attacggaca agatgtgttt aatgcagatc cgttaaaaaa tacgatgttc 660

tccatccata tgtatgagta tgctggtggt gatgctaaca ctgttagatc aaatattgat 720

agagtcatag atcaagacct tgctctcgta ataggtgaat tcggtcatag acatactgat 780

ggtgatgttg atgaagatac aatccttagt tattctgaag aaactggcac agggtggctc 840

gcttggtctt ggaaaggcaa cagtaccgaa tgggactatt tagacctttc agaagactgg 900

gctggtcaac atttaactga ttgggggaat agaattgtcc acggggccga tggcttacag 960

gaaacctcca aaccatccac cgtatttaca gatgataacg gtggtcaccc tgaaccgcca 1020

actgctacta ccttgtatga ctttgaagga agcacacaag ggtggcatgg aagcaacgtg 1080

accggtggcc cttggtccgt aacagaatgg ggtgcttcag gtaactactc tttaaaagcc 1140

gatgtaaatt taacctcaaa ttcttcacat gaactgtata gtgaacaaag tcgtaatcta 1200

cacggatact ctcagctcaa cgcaaccgtt cgccatgcca attggggaaa tcccggtaat 1260

ggcatgaatg caagacttta cgtgaaaacg ggctctgatt atacatggca tagcggtcct 1320
tttacacgta tcaatagctc caactcagga acaacgttat cttttgattt aaacaacatc 1380
gaaaatagtc atcatgttag ggaaataggc gtgcaatttt cagcggcaga taatagcagt 1440
ggtcaaactg ctctatacgt tgataacgtt actttaagat ag 1482

<210> 6
<211> 493
<212> PRT
<213> Bacillus agaradhaerens
<400> 6

Met Lys Lys Lys Leu Ser Gln Ile Tyr His Leu Ile Ile Cys Thr Leu
1 5 10 15
Ile Ile Ser Val Gly Ile Met Gly Ile Thr Thr Ser Pro Ser Ala Ala
20 25 30
Ser Thr Gly Phe Tyr Val Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly
35 40 45
Gln Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr Lys
50 55 60
Asp Thr Ala Ser Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Gln Gly Ala Asn
65 70 75 80
Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Glu Lys Asp Asp
85 90 95
Ile Asp Thr Ile Arg Glu Val Ile Glu Leu Ala Glu Gln Asn Lys Met
100 105 110
Val Ala Val Val Glu Val His Asp Ala Thr Gly Arg Asp Ser Arg Ser
115 120 125
Asp Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Ala Leu
130 135 140
Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr
145 150 155 160
Gly Ser Trp Asp Gly Ser Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Val Ile
165 170 175
Pro Lys Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala
180 185 190
Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Asp
195 200 205
Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
210 215 220
Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Ser Asn Ile Asp
225 230 235 240
Arg Val Ile Asp Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His
245 250 255
Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr Ser
260 265 270
Glu Glu Thr Gly Thr Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser
275 280 285

Thr Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Glu Asp Trp Ala Gly Gln His
290 295 300
Leu Thr Asp Trp Gly Asn Arg Ile Val His Gly Ala Asp Gly Leu Gln
305 310 315 320
Glu Thr Ser Lys Pro Ser Thr Val Phe Thr Asp Asp Asn Gly Gly His
325 330 335
Pro Glu Pro Pro Thr Ala Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Thr
340 345 350
Gln Gly Trp His Gly Ser Asn Val Thr Gly Gly Pro Trp Ser Val Thr
355 360 365
Glu Trp Gly Ala Ser Gly Asn Tyr Ser Leu Lys Ala Asp Val Asn Leu
370 375 380
Thr Ser Asn Ser Ser His Glu Leu Tyr Ser Glu Gln Ser Arg Asn Leu
385 390 395 400
His Gly Tyr Ser Gln Leu Asn Ala Thr Val Arg His Ala Asn Trp Gly
405 410 415
Asn Pro Gly Asn Gly Met Asn Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser
420 425 430
Asp Tyr Thr Trp His Ser Gly Pro Phe Thr Arg Ile Asn Ser Ser Asn
435 440 445
Ser Gly Thr Thr Leu Ser Phe Asp Leu Asn Asn Ile Glu Asn Ser His
450 455 460
His Val Arg Glu Ile Gly Val Gln Phe Ser Ala Ala Asp Asn Ser Ser
465 470 475 480
Gly Gln Thr Ala Leu Tyr Val Asp Asn Val Thr Leu Arg
485 490

<210> 7
<211> 1407
<212> DNA
<213> Bacillus agaradhaerens
<400> 7
atgaaaaaaa agttatcaca gatttatcat ttaattattt gcacacttat aataagtgtg 60
ggaataatgg ggattacaac gtccccatca gcagcaagta caggctttta tgttgatggc 120
aatacgttat atgacgcaaa tgggcagcca tttgtcatga gaggtattaa ccatggacat 180
gcttggtata aagacaccgc ttcaacagct attcctgcca ttgcagagca aggcgccaac 240
acgattcgta ttgttttatc agatggcggt caatgggaaa aagacgacat tgacaccatt 300
cgtgaagtca ttgagcttgc ggagcaaaat aaaatggtgg ctgtcgttga agttcatgat 360
gccacgggtc gcgattcgcg cagtgattta aatcgagccg ttgattattg gatagaaatg 420
aaagatgcgc ttatcggtaa agaagatacg gttattatta acattgcaaa cgagtggtat 480
gggagttggg atggctcagc ttgggccgat ggctatattg atgtcattcc gaagcttcgc 540
gatgccggct taacacacac cttaatggtt gatgcagcag gatgggggca atatccgcaa 600
tctattcatg attacggaca agatgtgttt aatgcagatc cgttaaaaaa tacgatgttc 660
tccatccata tgtatgagta tgctggtggt gatgctaaca ctgttagatc aaatattgat 720
agagtcatag atcaagacct tgctctcgta ataggtgaat tcggtcatag acatactgat 780
ggtgatgttg atgaagatac aatccttagt tattctgaag aaactggcac agggtggctc 840

gcttggtctt ggaaaggcaa cagtaccgaa tgggactatt tagacctttc agaagactgg 900
gctggtcaac atttaactga ttgggggaat agaattgtcc acggggccga tggcttacag 960
gaaacctcca aaccatccac cgtatttaca gatgataacg gtggtcaccc tgaaccgcca 1020
actgctacta ccttgtatga ctttgaagga agcacacaag ggtggcatgg aagcaacgtg 1080
accggtggcc cttggtccgt aacagaatgg ggtgcttcag gtaactactc tttaaaagcc 1140
gatgtaaatt taacctcaaa ttcttcacat gaactgtata gtgaacaaag tcgtaatcta 1200
cacggatact ctcagctcaa cgcaaccgtt cgccatgcca attggggaaa tcccggtaat 1260
ggcatgaatg caagacttta cgtgaaaacg ggctctgatt atacatggca tagcggtcct 1320
tttacacgta tcaatagctc caactcagga acaacgttat cttttgattt aaacaacatc 1380
gaaaatatca tcatgttagg gaaatag 1407

<210> 8
<211> 468
<212> PRT
<213> Bacillus agaradhaerens
<400> 8

Met Lys Lys Lys Leu Ser Gln Ile Tyr His Leu Ile Ile Cys Thr Leu
1 5 10 15
Ile Ile Ser Val Gly Ile Met Gly Ile Thr Thr Ser Pro Ser Ala Ala
20 25 30
Ser Thr Gly Phe Tyr Val Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Ala Asn Gly
35 40 45
Gln Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Tyr Lys
50 55 60
Asp Thr Ala Ser Thr Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Gln Gly Ala Asn
65 70 75 80
Thr Ile Arg Ile Val Leu Ser Asp Gly Gly Gln Trp Glu Lys Asp Asp
85 90 95
Ile Asp Thr Ile Arg Glu Val Ile Glu Leu Ala Glu Gln Asn Lys Met
100 105 110
Val Ala Val Val Glu Val His Asp Ala Thr Gly Arg Asp Ser Arg Ser
115 120 125
Asp Leu Asn Arg Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Ala Leu
130 135 140
Ile Gly Lys Glu Asp Thr Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr
145 150 155 160
Gly Ser Trp Asp Gly Ser Ala Trp Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Val Ile
165 170 175
Pro Lys Leu Arg Asp Ala Gly Leu Thr His Thr Leu Met Val Asp Ala
180 185 190
Ala Gly Trp Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Ile His Asp Tyr Gly Gln Asp
195 200 205
Val Phe Asn Ala Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met
210 215 220
Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Ser Asn Ile Asp
225 230 235 240

Arg Val Ile Asp Gln Asp Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly His
245 250 255
Arg His Thr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr Ser
260 265 270
Glu Glu Thr Gly Thr Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Lys Gly Asn Ser
275 280 285
Thr Glu Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Glu Asp Trp Ala Gly Gln His
290 295 300
Leu Thr Asp Trp Gly Asn Arg Ile Val His Gly Ala Asp Gly Leu Gln
305 310 315 320
Glu Thr Ser Lys Pro Ser Thr Val Phe Thr Asp Asp Asn Gly Gly His
325 330 335
Pro Glu Pro Pro Thr Ala Thr Thr Leu Tyr Asp Phe Glu Gly Ser Thr
340 345 350
Gln Gly Trp His Gly Ser Asn Val Thr Gly Gly Pro Trp Ser Val Thr
355 360 365
Glu Trp Gly Ala Ser Gly Asn Tyr Ser Leu Lys Ala Asp Val Asn Leu
370 375 380
Thr Ser Asn Ser Ser His Glu Leu Tyr Ser Glu Gln Ser Arg Asn Leu
385 390 395 400
His Gly Tyr Ser Gln Leu Asn Ala Thr Val Arg His Ala Asn Trp Gly
405 410 415
Asn Pro Gly Asn Gly Met Asn Ala Arg Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ser
420 425 430
Asp Tyr Thr Trp His Ser Gly Pro Phe Thr Arg Ile Asn Ser Ser Asn
435 440 445
Ser Gly Thr Thr Leu Ser Phe Asp Leu Asn Asn Ile Glu Asn Ile Ile
450 455 460
Met Leu Gly Lys
465

<210> 9
<211> 1761
<212> DNA
<213> Bacillus halodurans
<400> 9

atgaaaagta taaagaaatt ggtagtcgtt tgcatggcat ttctattaat ttttccatcg 60
acgtcatttg ctttttctgg aagcgtttca gcttcaggtc aagagcttaa aatgacagat 120
caaaacgcat ctcaatatac aaaagagttg tttgcctttt tacgtgatgt aagtggtaaa 180
caagttttat ttggtcaaca acacgcaact gatgagggat taacacttag aggaacaggt 240
aaccgaattg gttcaacaga atcagaagtg aaaaatgctg ttggtgatta tcctgctgtt 300
tttggttggg atacaaacag tctagatggt agagaaaagc ccggtaatga tgaaccgagt 360
caagaacaaa gaatcttaaa tacagcagct tcaatgaagg cagctcacga cttaggtggg 420
attatcacac taagtatgca tcctgataac tttgtaacag gaggggctta tggcgataca 480
actggaaatg ttgtacaaga aattcttcct ggtggatcaa agcatgaaga attcaatgca 540
tggttggata acctagcggc tttagctcac gaattaaagg atgacaacgg gaaacacatt 600

ccaattattt tccgtccttt ccatgagcaa acaggttctt ggttctggtg gggagcaagc 660
acaacaactc cagaacagta taaagctatt tacagatata cggttgaata cttacgtgac 720
gtaaaaggag caaacaactt cttatacggt ttttctcctg gtgcaggtcc agctggcgat 780
ttaaatcgtt atatggaaac ttaccctggt gatgattatg tcgatatctt tggtattgat 840
aactatgaca ataaatcaaa tgctggatca gaagcttgga tacaaggtgt tgtaaccgat 900
ttagctatgc ttgttgattt agctgaagaa aaaggaaaga ttgctgcgtt taccgagtat 960
ggttacagtg caacaggtat gaatcgtact ggtaacacat tggattggta tactcgttta 1020
cttaatgcaa taaaagaaga tccaaaagca agtaagattt cttacatgct tacatgggca 1080
aactttggtt tccctaacaa tatgtatgtt ccttacaaag acattcacgg tgatttaggt 1140
ggagatcatg aactccttcc agatttcatc aaatttttg aagatgatta ctcagctttc 1200
acaggagata tcaagggaaa tgtgtatgat acaggaattg aatatactgt agcaccacat 1260
gaacgtttaa tgtatgtgct ttcgcctatt actggaacaa cgataacaga tactgttaca 1320
ttacgagcta aagtattaaa cgatgataac gcagttgtta cgtacagggt tgaaggttct 1380
gacgttgaac atgaaatgac gttagctgac tcgggatact acacagctaa gtattctccg 1440
acggcagaag taaatggtgg atcagttgat ttaacagtta cgtactggtc tggagaagaa 1500
aaagtacaag atgaagtgat tagactttat gtaaaggctt cagaaatctc actttacaag 1560
cttacgtttg atgaggatat taatggaatt aagtcgaatg gcacttggcc tgaagatggt 1620
attacatctg acgtttctca tgtcagtttt gacggaaatg ggaaattgaa gtttgcagtt 1680
aatggaatgt catccgaaga gtggtggcaa gaacttaaat tagaattaac agatctttct 1740
gatgtgaatt tagccaagta a 1761

<210> 10
<211> 586
<212> PRT
<213> Bacillus halodurans
<400> 10

Met Lys Ser Ile Lys Lys Leu Val Val Val Cys Met Ala Phe Leu Leu
1 5 10 15
Ile Phe Pro Ser Thr Ser Phe Ala Phe Ser Gly Ser Val Ser Ala Ser
20 25 30
Gly Gln Glu Leu Lys Met Thr Asp Gln Asn Ala Ser Gln Tyr Thr Lys
35 40 45
Glu Leu Phe Ala Phe Leu Arg Asp Val Ser Gly Lys Gln Val Leu Phe
50 55 60
Gly Gln Gln His Ala Thr Asp Glu Gly Leu Thr Leu Arg Gly Thr Gly
65 70 75 80
Asn Arg Ile Gly Ser Thr Glu Ser Glu Val Lys Asn Ala Val Gly Asp
85 90 95
Tyr Pro Ala Val Phe Gly Trp Asp Thr Asn Ser Leu Asp Gly Arg Glu
100 105 110
Lys Pro Gly Asn Asp Glu Pro Ser Gln Glu Gln Arg Ile Leu Asn Thr
115 120 125
Ala Ala Ser Met Lys Ala Ala His Asp Leu Gly Gly Ile Ile Thr Leu
130 135 140
Ser Met His Pro Asp Asn Phe Val Thr Gly Gly Ala Tyr Gly Asp Thr
145 150 155 160

Thr Gly Asn Val Val Gln Glu Ile Leu Pro Gly Gly Ser Lys His Glu
165 170 175
Glu Phe Asn Ala Trp Leu Asp Asn Leu Ala Ala Leu Ala His Glu Leu
180 185 190
Lys Asp Asp Asn Gly Lys His Ile Pro Ile Ile Phe Arg Pro Phe His
195 200 205
Glu Gln Thr Gly Ser Trp Phe Trp Trp Gly Ala Ser Thr Thr Thr Pro
210 215 220
Glu Gln Tyr Lys Ala Ile Tyr Arg Tyr Thr Val Glu Tyr Leu Arg Asp
225 230 235 240
Val Lys Gly Ala Asn Asn Phe Leu Tyr Gly Phe Ser Pro Gly Ala Gly
245 250 255
Pro Ala Gly Asp Leu Asn Arg Tyr Met Glu Thr Tyr Pro Gly Asp Asp
260 265 270
Tyr Val Asp Ile Phe Gly Ile Asp Asn Tyr Asp Asn Lys Ser Asn Ala
275 280 285
Gly Ser Glu Ala Trp Ile Gln Gly Val Val Thr Asp Leu Ala Met Leu
290 295 300
Val Asp Leu Ala Glu Glu Lys Gly Lys Ile Ala Ala Phe Thr Glu Tyr
305 310 315 320
Gly Tyr Ser Ala Thr Gly Met Asn Arg Thr Gly Asn Thr Leu Asp Trp
325 330 335
Tyr Thr Arg Leu Leu Asn Ala Ile Lys Glu Asp Pro Lys Ala Ser Lys
340 345 350
Ile Ser Tyr Met Leu Thr Trp Ala Asn Phe Gly Phe Pro Asn Asn Met
355 360 365
Tyr Val Pro Tyr Lys Asp Ile His Gly Asp Leu Gly Gly Asp His Glu
370 375 380
Leu Leu Pro Asp Phe Ile Lys Phe Phe Glu Asp Asp Tyr Ser Ala Phe
385 390 395 400
Thr Gly Asp Ile Lys Gly Asn Val Tyr Asp Thr Gly Ile Glu Tyr Thr
405 410 415
Val Ala Pro His Glu Arg Leu Met Tyr Val Leu Ser Pro Ile Thr Gly
420 425 430
Thr Thr Ile Thr Asp Thr Val Thr Leu Arg Ala Lys Val Leu Asn Asp
435 440 445
Asp Asn Ala Val Val Thr Tyr Arg Val Glu Gly Ser Asp Val Glu His
450 455 460
Glu Met Thr Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Tyr Thr Ala Lys Tyr Ser Pro
465 470 475 480
Thr Ala Glu Val Asn Gly Gly Ser Val Asp Leu Thr Val Thr Tyr Trp
485 490 495
Ser Gly Glu Glu Lys Val Gln Asp Glu Val Ile Arg Leu Tyr Val Lys
500 505 510
Ala Ser Glu Ile Ser Leu Tyr Lys Leu Thr Phe Asp Glu Asp Ile Asn

515 520 525

Gly Ile Lys Ser Asn Gly Thr Trp Pro Glu Asp Gly Ile Thr Ser Asp
530 535 540

Val Ser His Val Ser Phe Asp Gly Asn Gly Lys Leu Lys Phe Ala Val
545 550 555 560

Asn Gly Met Ser Ser Glu Glu Trp Trp Gln Glu Leu Lys Leu Glu Leu
565 570 575

Thr Asp Leu Ser Asp Val Asn Leu Ala Lys
580 585

<210> 11

<211> 995

<212> DNA

<213> Bacillus sp. AAI12

<400> 11

gtgtataagc ttacccatac gtattttgtt gcgttaattt gttctatttt gatctttgct 60
ggggttttaa atacttcttc ttcacaagca gaagcccatc acagtgggtt ccatgttaat 120
ggtacaacat tatatgatgc aaatggaaac ccttttgtta tgagagggat taatcatgga 180
catgcttggt ttaaacaaga actagaaaca tccatgagag ggattagtca aacaggggca 240
aatacgattc gtgtcgtttt gtctaatggg caaagatggc aaaaagatga tcgaaacatg 300
gtagcttcgg ttatttcttt ggcagagcag catcaaatga ttgccgtttt agaagttcat 360
gatgctactg gtagcaataa tttctccgat ctgcaagctg ctgtggacta ttggattgag 420
atgaaggatg ttttgcaggg gaaagaggac atagtgatca ttaatatcgc caatgaatgg 480
tacggtgctt gggacggagg cgcatgggca cgagggtatc agaatgcgat acgtcagctt 540
cgaaatgcag gcttgtcaca tacatttatg gttgacgctg ccggttatgg ccagtaccct 600
caatcggtag ttgattatgg tcaagaagta ttaaatgctg acccacagag aaacacaatg 660
ttttctgttc atatgtatga atatgcaggc ggagatgcta atacagtaag acgaaacatt 720
gactcgatct taagccagaa cttagctctt gtcattggtg aattcgggca ttggcattat 780
gacggtgatg ttgatgagga caccatttta agctattcac agcaaagaaa tgtgggatgg 840
ttggcgtgga gctggcatgg caatagtgaa ggggtcgaat atcttgattt atcgaatgac 900
tttgctggta atcgactgac atggtggggt gatcgaatag taaacggtcc gaatgggatt 960
cgtcaaacct ctaaaagaag cagtgtgttt caata 995

<210> 12

<211> 331

<212> PRT

<213> Bacillus sp. AAI12

<400> 12

Val Tyr Lys Leu Thr His Thr Tyr Phe Val Ala Leu Ile Cys Ser Ile
1 5 10 15

Leu Ile Phe Ala Gly Val Leu Asn Thr Ser Ser Ser Gln Ala Glu Ala
20 25 30

His His Ser Gly Phe His Val Asn Gly Thr Thr Leu Tyr Asp Ala Asn
35 40 45

Gly Asn Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His Gly His Ala Trp Phe
50 55 60

Lys Gln Glu Leu Glu Thr Ser Met Arg Gly Ile Ser Gln Thr Gly Ala

65 70 75 80
Asn Thr Ile Arg Val Val Leu Ser Asn Gly Gln Arg Trp Gln Lys Asp
85 90 95
Asp Arg Asn Met Val Ala Ser Val Ile Ser Leu Ala Glu Gln His Gln
100 105 110
Met Ile Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asn Asn Phe
115 120 125
Ser Asp Leu Gln Ala Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Lys Asp Val
130 135 140
Leu Gln Gly Lys Glu Asp Ile Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp
145 150 155 160
Tyr Gly Ala Trp Asp Gly Gly Ala Trp Ala Arg Gly Tyr Gln Asn Ala
165 170 175
Ile Arg Gln Leu Arg Asn Ala Gly Leu Ser His Thr Phe Met Val Asp
180 185 190
Ala Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Pro Gln Ser Val Val Asp Tyr Gly Gln
195 200 205
Glu Val Leu Asn Ala Asp Pro Gln Arg Asn Thr Met Phe Ser Val His
210 215 220
Met Tyr Glu Tyr Ala Gly Gly Asp Ala Asn Thr Val Arg Arg Asn Ile
225 230 235 240
Asp Ser Ile Leu Ser Gln Asn Leu Ala Leu Val Ile Gly Glu Phe Gly
245 250 255
His Trp His Tyr Asp Gly Asp Val Asp Glu Asp Thr Ile Leu Ser Tyr
260 265 270
Ser Gln Gln Arg Asn Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp His Gly Asn
275 280 285
Ser Glu Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Asn Asp Phe Ala Gly Asn
290 295 300
Arg Leu Thr Trp Trp Gly Asp Arg Ile Val Asn Gly Pro Asn Gly Ile
305 310 315 320
Arg Gln Thr Ser Lys Arg Ser Ser Val Phe Gln
325 330

<210> 13
<211> 1464
<212> DNA
<213> Humicola insolens
<400> 13
atggcaaagg ctctgaagta ctttgcctgg ggccttgctg ccctggcctc gggcgctgtt 60
gccgctcctt actgtgctcc ccagccgtcg acaacctctc aggagcctac gagcactccg 120
tcgcctgtgc ccggtccgcg gaccttcgaa gcggaggatg ccatcctcac gggcacgagg 180
gttgagtcga gcctcgccgg ctactctggt accggatatg tagcgggctt cgacgagccc 240
agtgacaaga tcacgttcca cgtggacagc gagaccacac ggctgtacga cctcaccatc 300
cgcgtggccg ccatctatgg cgagaagcgc accaccgtcg tgctcaataa cggcgcggca 360
agtgaggtct acttcccggc aggcgattcg ttcgtcgaca tcgctgccgg ccaggtcctg 420

ctgaaccagg gcgacaacac catcgacatt gtcaacaact ggggatggta cctgatcgac 480
tccatcacca tcacccccctc cgccccgcga ccccctcacc aaatcaaccc ttcccccgtc 540
aaccctgccg ccgacgacaa cgcgcgggcg ttgtacgcat acctccgctc catctacggc 600
aagaaaatcc tttccggcca gcaggagctt tcctgggcga actggatcgc ccaacagacg 660
ggcaaaactc ccgcgctggt gtccgtcgat atgatggatt attcccctag tcgggtggaa 720
agaggcactg tcgggtctgc cgtcgaggag gccatcgagc atcaccggcg cggcggcatt 780
gtctcggtgt tgtggcactg gaacgcgccc acggggctgt acgacacgcc cgagcgccgg 840
tggtggagcg ggttctacac ggacgcgacc gactttgacg tcgcgcgggc gctggcggat 900
acgacgaatg ccaactacac gctgctgatc cgggatatcg acgcgatcgc ggtgcagctc 960
aagaggttgc gggacgcggg cgtgccggtg ctttggcgcc cgctgcacga ggccgagggc 1020
ggttggtttt ggtggggagc gaagggcccg gaggcataca agaagctgtg ggggattctg 1080
tatgaccgac tcacgaacta ccatgggctg aataacctgc tgtgggtgtg gaactcgatc 1140
ctacccgagt ggtatcccgg agacgaaaca gtagacattg tcagcgcgga cgtgtacgcg 1200
cagggtaatg ggcccatgtc gacgcagtat aaccagctca tcgagctggg caaggacaag 1260
aagatgatcg cggcgactga ggtcggggcc gcgccgctgc cggacctgtt gcaggcctat 1320
gaggctcact ggttgtggtt cgctgtttgg ggagacacgt tcatcaacaa ccctcagtgg 1380
aactcgatcg agaccttgaa gacgatctac aatagcgact atgttctcac tctcgatgag 1440
attcaggggt ggaggaacgc gcaa 1464

<210> 14
<211> 488
<212> PRT
<213> Humicola insolens
<400> 14

Met Ala Lys Ala Leu Lys Tyr Phe Ala Trp Gly Leu Ala Ala Leu Ala
1 5 10 15
Ser Gly Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Ala Pro Gln Pro Ser Thr Thr
20 25 30
Ser Gln Glu Pro Thr Ser Thr Pro Ser Pro Val Pro Gly Pro Arg Thr
35 40 45
Phe Glu Ala Glu Asp Ala Ile Leu Thr Gly Thr Arg Val Glu Ser Ser
50 55 60
Leu Ala Gly Tyr Ser Gly Thr Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Glu Pro
65 70 75 80
Ser Asp Lys Ile Thr Phe His Val Asp Ser Glu Thr Thr Arg Leu Tyr
85 90 95
Asp Leu Thr Ile Arg Val Ala Ala Ile Tyr Gly Glu Lys Arg Thr Thr
100 105 110
Val Val Leu Asn Asn Gly Ala Ala Ser Glu Val Tyr Phe Pro Ala Gly
115 120 125
Asp Ser Phe Val Asp Ile Ala Ala Gly Gln Val Leu Leu Asn Gln Gly
130 135 140
Asp Asn Thr Ile Asp Ile Val Asn Asn Trp Gly Trp Tyr Leu Ile Asp
145 150 155 160
Ser Ile Thr Ile Thr Pro Ser Ala Pro Arg Pro Pro His Gln Ile Asn
165 170 175

Pro Ser Pro Val Asn Pro Ala Ala Asp Asp Asn Ala Arg Ala Leu Tyr
180 185 190
Ala Tyr Leu Arg Ser Ile Tyr Gly Lys Lys Ile Leu Ser Gly Gln Gln
195 200 205
Glu Leu Ser Trp Ala Asn Trp Ile Ala Gln Gln Thr Gly Lys Thr Pro
210 215 220
Ala Leu Val Ser Val Asp Met Met Asp Tyr Ser Pro Ser Arg Val Glu
225 230 235 240
Arg Gly Thr Val Gly Ser Ala Val Glu Glu Ala Ile Glu His His Arg
245 250 255
Arg Gly Gly Ile Val Ser Val Leu Trp His Trp Asn Ala Pro Thr Gly
260 265 270
Leu Tyr Asp Thr Pro Glu Arg Arg Trp Trp Ser Gly Phe Tyr Thr Asp
275 280 285
Ala Thr Asp Phe Asp Val Ala Arg Ala Leu Ala Asp Thr Thr Asn Ala
290 295 300
Asn Tyr Thr Leu Leu Ile Arg Asp Ile Asp Ala Ile Ala Val Gln Leu
305 310 315 320
Lys Arg Leu Arg Asp Ala Gly Val Pro Val Leu Trp Arg Pro Leu His
325 330 335
Glu Ala Glu Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly Ala Lys Gly Pro Glu Ala
340 345 350
Tyr Lys Lys Leu Trp Gly Ile Leu Tyr Asp Arg Leu Thr Asn Tyr His
355 360 365
Gly Leu Asn Asn Leu Leu Trp Val Trp Asn Ser Ile Leu Pro Glu Trp
370 375 380
Tyr Pro Gly Asp Glu Thr Val Asp Ile Val Ser Ala Asp Val Tyr Ala
385 390 395 400
Gln Gly Asn Gly Pro Met Ser Thr Gln Tyr Asn Gln Leu Ile Glu Leu
405 410 415
Gly Lys Asp Lys Lys Met Ile Ala Ala Thr Glu Val Gly Ala Ala Pro
420 425 430
Leu Pro Asp Leu Leu Gln Ala Tyr Glu Ala His Trp Leu Trp Phe Ala
435 440 445
Val Trp Gly Asp Thr Phe Ile Asn Asn Pro Gln Trp Asn Ser Ile Glu
450 455 460
Thr Leu Lys Thr Ile Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Leu Thr Leu Asp Glu
465 470 475 480
Ile Gln Gly Trp Arg Asn Ala Gln
485

<210> 15
<211> 1107
<212> DNA
<213> Bacillus sp. AA349
<400> 15

atgagaagta tgaagctttt atttgctatg tttattttag ttttttcctc ttttactttt 60
aacttagtag ttgcgcaagc tagtggacat gggcaaatgc ataaagtacc ttgggcacca 120
caagctgaag cacctggaaa aacggctgaa aatggagtct gggataaagt tcgaaataat 180
cctggaaaag ccaatcctcc agcaggaaaa gtcaatggtt tttatataga tggaacaacc 240
ttatatgatg caaatggtaa gccatttgtg atgcgtggaa ttaaccacgg tcattcatgg 300
tacaagcctc acatagaaac cgcgatggag gcaattgctg atactggagc aaactccatt 360
cgtgtagttc tctcagatgg acaacagtgg accaaagatg atgttgacga agtagcaaaa 420
attatatctt tagcagaaaa acattcttta gttgctgctc ttgaggtaca tgatgcactc 480
ggaacagatg atattgaacc attacttaaa acagttgatt actggattga gatcaaagat 540
gctttaatcg gaaaagagga caaagtaatt attaacattt ctaatgaatg gtttggttct 600
tggagcagtg aaggttgggc agatggatat aaaaaagcaa ttcctttact aagagaggcg 660
ggtctaaaac atacacttat ggttgacgca gctgggtggg gacaatttcc tagatctatt 720
catgaaaaag gattagaagt ttttaactca gacccattaa agaatacaat gttttccatt 780
catatgtatg aatgggcagc gggtaatcct caacaagtaa aagacaatat tgacggtgtt 840
cttgaaaaga atttagctgt agtaattggt gagttcggtc atcatcacta cggaagagat 900
gttgctgttg atacaatctt aagtcattct gagaagtatg atgtaggttg gcttgcttgg 960
tcttggcacg gaaatagtgg tggtgtagag tatcttgact tagcaacaga tttctcaggg 1020
acacaactaa ctgaatgggg agaaagaatt gtacacggtc cgaatggttt aaaagaaact 1080
tctgaaatcg ttagtgtata caaaaaa 1107

<210> 16
<211> 369
<212> PRT
<213> Bacillus sp. AA349
<400> 16

Met Arg Ser Met Lys Leu Leu Phe Ala Met Phe Ile Leu Val Phe Ser
1 5 10 15
Ser Phe Thr Phe Asn Leu Val Val Ala Gln Ala Ser Gly His Gly Gln
20 25 30
Met His Lys Val Pro Trp Ala Pro Gln Ala Glu Ala Pro Gly Lys Thr
35 40 45
Ala Glu Asn Gly Val Trp Asp Lys Val Arg Asn Asn Pro Gly Lys Ala
50 55 60
Asn Pro Pro Ala Gly Lys Val Asn Gly Phe Tyr Ile Asp Gly Thr Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Asp Ala Asn Gly Lys Pro Phe Val Met Arg Gly Ile Asn His
85 90 95
Gly His Ser Trp Tyr Lys Pro His Ile Glu Thr Ala Met Glu Ala Ile
100 105 110
Ala Asp Thr Gly Ala Asn Ser Ile Arg Val Val Leu Ser Asp Gly Gln
115 120 125
Gln Trp Thr Lys Asp Asp Val Asp Glu Val Ala Lys Ile Ile Ser Leu
130 135 140
Ala Glu Lys His Ser Leu Val Ala Ala Leu Glu Val His Asp Ala Leu
145 150 155 160
Gly Thr Asp Asp Ile Glu Pro Leu Leu Lys Thr Val Asp Tyr Trp Ile

```
                165                 170                 175
Glu Ile Lys Asp Ala Leu Ile Gly Lys Glu Asp Lys Val Ile Ile Asn
            180                 185                 190
Ile Ser Asn Glu Trp Phe Gly Ser Trp Ser Ser Glu Gly Trp Ala Asp
        195                 200                 205
Gly Tyr Lys Lys Ala Ile Pro Leu Leu Arg Glu Ala Gly Leu Lys His
    210                 215                 220
Thr Leu Met Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly Gln Phe Pro Arg Ser Ile
225                 230                 235                 240
His Glu Lys Gly Leu Glu Val Phe Asn Ser Asp Pro Leu Lys Asn Thr
                245                 250                 255
Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Trp Ala Ala Gly Asn Pro Gln Gln
            260                 265                 270
Val Lys Asp Asn Ile Asp Gly Val Leu Glu Lys Asn Leu Ala Val Val
        275                 280                 285
Ile Gly Glu Phe Gly His His His Tyr Gly Arg Asp Val Ala Val Asp
    290                 295                 300
Thr Ile Leu Ser His Ser Glu Lys Tyr Asp Val Gly Trp Leu Ala Trp
305                 310                 315                 320
Ser Trp His Gly Asn Ser Gly Gly Val Glu Tyr Leu Asp Leu Ala Thr
                325                 330                 335
Asp Phe Ser Gly Thr Gln Leu Thr Glu Trp Gly Glu Arg Ile Val His
            340                 345                 350
Gly Pro Asn Gly Leu Lys Glu Thr Ser Glu Ile Val Ser Val Tyr Lys
        355                 360                 365
Lys
```

<210> 17

<211> 915

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

<400> 17

```
atctcaacac tcagaaatgc cggtattcgc aatacaatcg ttgtggatgc atcggggtgg 60
ggacaaaatt catcgccaat taaagcttat ggcaacgaag tgttaaacca tgatccgcag 120
cgcaatgtta tgttctccat acacatgtac ggttcctgga ataatcagtc gcgaatcggc 180
agcgaattgc aggccatcaa agaccttggt cttgctgtca tgattggtga attcggatac 240
aactacaaca acggcaataa caacttgggg agtcaggtta acgcccagga aatcatgaat 300
caggcgcaag caaaaggaat cggctacatg ccgtggtcgt ggactggcaa tgacgcggct 360
aactcttggt tggatatgac aacaaacgat tggcaaacac ttacatcatg ggggaatcta 420
gttgtaaatg gaaccaacgg cattcgagct acgtctgtcc cagcaactgt atttaataca 480
caaacaacaa tttatgattt tgaaggcggc aatgcccagg gctggtcagg ttccggtttg 540
agcgggggggc cttggtctgt taatgaatgg gcggcgagcg gtagttattc tctcaaagcg 600
aatatatctc taggcgccac tcaaaaagct ttgcaaacca cagcgtccca taatttcagc 660
ggccggtcta cattatccgt aagagtaaag catgcagcat ggggaaatca cggcagcggt 720
atgcaagcca agttatatgt gaaaacaggg gccggttacg cctggtatga tggcggcact 780
gtaaacatca acagctcggg caacacattg acgctaaacc tggcaggcat tcctaatctg 840
```

aacgacgtca gagaactcgg aattgaattt ataacacctg caaattcgag tggttctttc 900
gcaatttatg ttgac 915

<210> 18
<211> 305
<212> PRT
<213> Bacillus sp.
<400> 18

```
Ile Ser Thr Leu Arg Asn Ala Gly Ile Arg Asn Thr Ile Val Val Asp
 1               5                  10                  15
Ala Ser Gly Trp Gly Gln Asn Ser Ser Pro Ile Lys Ala Tyr Gly Asn
            20                  25                  30
Glu Val Leu Asn His Asp Pro Gln Arg Asn Val Met Phe Ser Ile His
        35                  40                  45
Met Tyr Gly Ser Trp Asn Asn Gln Ser Arg Ile Gly Ser Glu Leu Gln
    50                  55                  60
Ala Ile Lys Asp Leu Gly Leu Ala Val Met Ile Gly Glu Phe Gly Tyr
65                  70                  75                  80
Asn Tyr Asn Asn Gly Asn Asn Asn Leu Gly Ser Gln Val Asn Ala Gln
                85                  90                  95
Glu Ile Met Asn Gln Ala Gln Ala Lys Gly Ile Gly Tyr Met Pro Trp
            100                 105                 110
Ser Trp Thr Gly Asn Asp Ala Ala Asn Ser Trp Leu Asp Met Thr Thr
        115                 120                 125
Asn Asp Trp Gln Thr Leu Thr Ser Trp Gly Asn Leu Val Val Asn Gly
    130                 135                 140
Thr Asn Gly Ile Arg Ala Thr Ser Val Pro Ala Thr Val Phe Asn Thr
145                 150                 155                 160
Gln Thr Thr Ile Tyr Asp Phe Glu Gly Gly Asn Ala Gln Gly Trp Ser
                165                 170                 175
Gly Ser Gly Leu Ser Gly Gly Pro Trp Ser Val Asn Glu Trp Ala Ala
            180                 185                 190
Ser Gly Ser Tyr Ser Leu Lys Ala Asn Ile Ser Leu Gly Ala Thr Gln
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Gln Thr Thr Ala Ser His Asn Phe Ser Gly Arg Ser Thr
    210                 215                 220
Leu Ser Val Arg Val Lys His Ala Ala Trp Gly Asn His Gly Ser Gly
225                 230                 235                 240
Met Gln Ala Lys Leu Tyr Val Lys Thr Gly Ala Gly Tyr Ala Trp Tyr
                245                 250                 255
Asp Gly Gly Thr Val Asn Ile Asn Ser Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu
            260                 265                 270
Asn Leu Ala Gly Ile Pro Asn Leu Asn Asp Val Arg Glu Leu Gly Ile
        275                 280                 285
Glu Phe Ile Thr Pro Ala Asn Ser Ser Gly Ser Phe Ala Ile Tyr Val
    290                 295                 300
```

Asp
305
<210> 19
<211> 397
<212> DNA
<213> Bacillus clausii
<400> 19
atctctcagg gcttggtagg agtcattatt ctcttataca tggcatttag tcaagagaga 60
ggattggcgc aaactggatt tcaagtaaca gggacccagt tgcttgatgg agagggcaat 120
ccgtatgtga tgcgtggagt caatcacgga cattcatggt tcaaacaaga ccttgataca 180
gcaataccag ctattgcagc gactggcgct aatacggtga gaatcgtttt atcgaatggc 240
caacaatggg agcgagatac cgtagcggaa gttgaaagag tgcttgcagt taccgaagag 300
gaaggcttga cggctgtact tgaagttcat gatgcgacgg gaagtgatga tccaaacgat 360
ttgtttactg cagtggagta ttggtcagag agaggat 397
<210> 20
<211> 132
<212> PRT
<213> Bacillus clausii
<400> 20
Ile Ser Gln Gly Leu Val Gly Val Ile Ile Leu Leu Tyr Met Ala Phe
1 5 10 15
Ser Gln Glu Arg Gly Leu Ala Gln Thr Gly Phe Gln Val Thr Gly Thr
20 25 30
Gln Leu Leu Asp Gly Glu Gly Asn Pro Tyr Val Met Arg Gly Val Asn
35 40 45
His Gly His Ser Trp Phe Lys Gln Asp Leu Asp Thr Ala Ile Pro Ala
50 55 60
Ile Ala Ala Thr Gly Ala Asn Thr Val Arg Ile Val Leu Ser Asn Gly
65 70 75 80
Gln Gln Trp Glu Arg Asp Thr Val Ala Glu Val Glu Arg Val Leu Ala
85 90 95
Val Thr Glu Glu Glu Gly Leu Thr Ala Val Leu Glu Val His Asp Ala
100 105 110
Thr Gly Ser Asp Asp Pro Asn Asp Leu Phe Thr Ala Val Glu Tyr Trp
115 120 125
Ser Glu Arg Gly
130
<210> 21
<211> 960
<212> DNA
<213> Bacillus sp.
<400> 21
atgaatcgta agcggttaca atgggttgga gcactagtgg tggtgttggt tttgtttgta 60
tacagtagcg gtttagcatc tgcacaaagc ggctttcacg taaaaggtac agagttgttg 120
gacaaaaaatg gcgatcctta cgttatgcgt ggcgtcaacc atggacattc ttggtttaaa 180

caagatttag aggaggcaat ccctgccata gcagaaacag gggcgaacac agtgagaatc 240
gtcttatcca atggacagca atgggaaaaa gatgatgcct ctgagcttgc ccgtgtgctt 300
gctgccacag aaacatatgg gttgacaacc gtgctggaag tccacgatgc tacaggaagt 360
gataatcccg atgatttaga taaagcagtc gattactgga tcgaaatggc tgatgttcta 420
aaggggacag aagaccgggt aatcattaac attgccaatg aatggtatgg ggcgtggagg 480
agtgacgttt gggcagaggc atacgcacaa gcgatcccgc gcttgcgcag tgctggcctc 540
gcccatacgt taatagttga tgcggcaggt tggggacagt accctgcctc tatccatgag 600
cggggagccg acgtatttgc ctccgatcca ttaaaaaaca caatgttttc catccatatg 660
tacgaatatg caggagcgga tagggcgaca gtttctgaaa acatcgacgg tgtacttgct 720
gaaaatcttg ctgtggtaat cggtgaattt ggccataggc atcatgatgg cgatgtcgat 780
gaagatgcga ttttggccta tacagcagag cggcaagtgg gctggcttgc ctggtcatgg 840
tatggcaata gcgggggtgt tgaatacttg gatttaactg aaggcccatc aggtccatta 900
acgagttggg gcgaacggat tgtctatggg gaaatgggct taaaagtaat tgatcacttg 960

<210> 22
<211> 320
<212> PRT
<213> Bacillus sp.
<400> 22

Met Asn Arg Lys Arg Leu Gln Trp Val Gly Ala Leu Val Val Val Leu
1 5 10 15
Val Leu Phe Val Tyr Ser Ser Gly Leu Ala Ser Ala Gln Ser Gly Phe
20 25 30
His Val Lys Gly Thr Glu Leu Leu Asp Lys Asn Gly Asp Pro Tyr Val
35 40 45
Met Arg Gly Val Asn His Gly His Ser Trp Phe Lys Gln Asp Leu Glu
50 55 60
Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Thr Gly Ala Asn Thr Val Arg Ile
65 70 75 80
Val Leu Ser Asn Gly Gln Gln Trp Glu Lys Asp Asp Ala Ser Glu Leu
85 90 95
Ala Arg Val Leu Ala Ala Thr Glu Thr Tyr Gly Leu Thr Thr Val Leu
100 105 110
Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp Asn Pro Asp Asp Leu Asp Lys
115 120 125
Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Ala Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu
130 135 140
Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Ala Trp Arg
145 150 155 160
Ser Asp Val Trp Ala Glu Ala Tyr Ala Gln Ala Ile Pro Arg Leu Arg
165 170 175
Ser Ala Gly Leu Ala His Thr Leu Ile Val Asp Ala Ala Gly Trp Gly
180 185 190
Gln Tyr Pro Ala Ser Ile His Glu Arg Gly Ala Asp Val Phe Ala Ser
195 200 205
Asp Pro Leu Lys Asn Thr Met Phe Ser Ile His Met Tyr Glu Tyr Ala

210 215 220

Gly Ala Asp Arg Ala Thr Val Ser Glu Asn Ile Asp Gly Val Leu Ala
225 230 235 240

Glu Asn Leu Ala Val Val Ile Gly Glu Phe Gly His Arg His His Asp
245 250 255

Gly Asp Val Asp Glu Asp Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ala Glu Arg Gln
260 265 270

Val Gly Trp Leu Ala Trp Ser Trp Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Val Glu
275 280 285

Tyr Leu Asp Leu Thr Glu Gly Pro Ser Gly Pro Leu Thr Ser Trp Gly
290 295 300

Glu Arg Ile Val Tyr Gly Glu Met Gly Leu Lys Val Ile Asp His Leu
305 310 315 320

<210> 23

<211> 564

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

<400> 23

atgaatcgta agcggttaca atgggttgga gcactagtgg cggtgttggt tttgtttgta 60
tacagtagcg gtttagcatc tgcacaaagc ggctttcacg taaaaggtac agagttgttg 120
gacaaaaatg gcgatcctta cgttatgcgt ggcgtcaacc atggacattc ttggtttaaa 180
caagatttag aggaggcaat ccctgccata gcagaaacag gggcgaacac agtgagaatc 240
gtcttatcca atggacagca atgggaaaaa gatgatgcct ctgagcttgc ccgtgtgctt 300
gctgccacag aaacatatgg gttgacaacc gtgctggaag tccacgatgc tacaggaagt 360
gataatcccg atgatttaga taaagcagtc gattactgga tcgaaatggc tgatgttcta 420
aaggggacag aagaccgggt aatcattaac attgccaatg aatggtatgg ggcgtggagg 480
agtgaccttt gggcaaaagc atacgcacaa gcgatcccgc gcttgcgcag tgctggcctc 540
gcccatacgt taataattga tgcc 564

<210> 24

<211> 188

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 24

Met Asn Arg Lys Arg Leu Gln Trp Val Gly Ala Leu Val Ala Val Leu
1 5 10 15

Val Leu Phe Val Tyr Ser Ser Gly Leu Ala Ser Ala Gln Ser Gly Phe
20 25 30

His Val Lys Gly Thr Glu Leu Leu Asp Lys Asn Gly Asp Pro Tyr Val
35 40 45

Met Arg Gly Val Asn His Gly His Ser Trp Phe Lys Gln Asp Leu Glu
50 55 60

Glu Ala Ile Pro Ala Ile Ala Glu Thr Gly Ala Asn Thr Val Arg Ile
65 70 75 80

Val Leu Ser Asn Gly Gln Gln Trp Glu Lys Asp Asp Ala Ser Glu Leu
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ala Ala Thr Glu Thr Tyr Gly Leu Thr Thr Val Leu
100 105 110
Glu Val His Asp Ala Thr Gly Ser Asp Asn Pro Asp Asp Leu Asp Lys
115 120 125
Ala Val Asp Tyr Trp Ile Glu Met Ala Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu
130 135 140
Asp Arg Val Ile Ile Asn Ile Ala Asn Glu Trp Tyr Gly Ala Trp Arg
145 150 155 160
Ser Asp Leu Trp Ala Lys Ala Tyr Ala Gln Ala Ile Pro Arg Leu Arg
165 170 175
Ser Ala Gly Leu Ala His Thr Leu Ile Ile Asp Ala
180 185

<210> 25
<211> 2445
<212> DNA
<213> Bacillus sp.
<400> 25

atgaacaaac aaccgttaaa gactgcattt attatgttgt tatgtagcgt gtttatgttt 60
caaagcctac cttactatgt gaacgctatc aatgaaggcg agagagaagc ttttgcatcc 120
gcagggagat atgatgctga acaggcgact acgacaggaa atgccgtatt cacgaccgag 180
cctgttgagg acggcgagta cgccggtccg ggctacattt ccttcttttc tgaagattcc 240
tcgccacctt cttcatcgac aacctttcac attcaggccg ataaaacgga gctctatcat 300
ttatctatcg gatactatgc tccatacgga aacaagggaa ccacaattct ggtgaacggt 360
gcaggtaacg gagagtttat gttgccagcg cccgaggacg gggcagtctc cgccgaagtg 420
gaaattagca aaatcctgct cgaagaagga aataatacga ttacattcac aagaggctgg 480
ggttattacg gcattgaata tattcgggtc gagccggtta atccaacgtt accgactata 540
tttattgaag cagaagaaga ttacgaagcg actggaaatg ttagcgttac caatgaaatc 600
gaaggttatt ccggagcagg ctatttgttc aaccaagagg ggacaattca ttggaatgta 660
acctcaccgg aaacctctat atatgaagta atcgttgcct atgcagctcc ttatggcgac 720
aaacaaacaa atctgacagt gaatggacag ggtaccgtca atcttgactt gaaagagaca 780
gaagtcttcg tggagttgaa tgtcggcatc gtaagtctca atgaaggcga aaacacacta 840
acactccata gtggttgggg atggtacaat atcgattata tcaagcttgt acctgtggtc 900
agttcggatc ccgaaccgca tcaggtcgaa aaaacactgg tgaatccgga cgcctcacct 960
gaggcaagag cgctaattaa ttatctcgta gaccagtacg ggaacaaaat tctatcaggt 1020
caaaccgagt tgaaagacgc caggtggatc catgaacagg tgggcaaata tcctgcggtt 1080
atggcagttg attttatgga ctacagcccg tcccgcgtag tgcatggcgc aactggaact 1140
gcggttgagg aagcgattga gtgggcagag atgggtggga tcattacctt ccactggcat 1200
tggaacgcgc caaaggacct gcttaatgta cccggcaatg agtggtggtc cggtttttat 1260
acccgtgcca caacgtttga tgtggagtac gctttagaga accgggaatc tgaggatttc 1320
caattgttga ttagcgacat ggatgtgatc gccgagcaat tgaagcggct gcaggcagag 1380
aacatccctg tgttatggag accgcttcat gaggcggaag gcggctggtt ctggtggggc 1440
gccaaaggtc cagaggcggc aatagagctc tacaggctga tgtacgatcg ttacaccaat 1500
caccataaac taaacaattt gatatggatg tggaattcgg aagcggaaga atggtatccg 1560
ggcgatgatg tcgtggacat gatcagtacc gatatttata atcctgtcgg agatttcagt 1620
cccagcatca acaagtatga gcatctaaag gaattggtac aggataagaa gctggttgcc 1680

ttgcctgaaa ccggcattat tccggatccc gatcagcttc agctgttcaa tgcgaactgg 1740
agttggttcg ccacctggac tggagactat atcagggacg gcatctccaa ccctatagaa 1800
cacctgcaaa aggtgtttca tcatgactac gtcatcaccc tggatgaatt gccggagaac 1860
ctgtcccgtt acggattatc tgaaggagtc tggaagagcg acgccgatct atccgtaaaa 1920
acgaggacga cctccgaaat tacagtgaac tggtcaaatg ccattcaata tgattccgtt 1980
aatggctata aattaattaa agatggtgta gagaccgttt cagttgaagg cggcgtgcaa 2040
gagtatacct tcacaaattt attgccgggc acgcagtata cgataaaagt agaggcactg 2100
gaccaggatg accgatggac cgccgacgga ccggtcgccg ttgtatctac attatccaac 2160
gctccgatat cctatcctcc ggctgtcact cctgatgagc cgaatgaaga actgtcggag 2220
ggagagtata cgctcttggc agatgactta tccagccagg atggtgttct ggaagtaagt 2280
cttgagccga cagttacgaa gctcattatt ccttctgcac tagccggcac attagacgga 2340
gacttgagaa tcggttatgg ggacgtctgg atcgtcatcc cacacgaaca gcttgggggt 2400
gacgagcagc aatccggcag cgcgtatgag ttagtgctgg agatc 2445

<210> 26
<211> 815
<212> PRT
<213> Bacillus sp.
<400> 26

Met Asn Lys Gln Pro Leu Lys Thr Ala Phe Ile Met Leu Leu Cys Ser
1 5 10 15
Val Phe Met Phe Gln Ser Leu Pro Tyr Tyr Val Asn Ala Ile Asn Glu
20 25 30
Gly Glu Arg Glu Ala Phe Ala Ser Ala Gly Arg Tyr Asp Ala Glu Gln
35 40 45
Ala Thr Thr Thr Gly Asn Ala Val Phe Thr Thr Glu Pro Val Glu Asp
50 55 60
Gly Glu Tyr Ala Gly Pro Gly Tyr Ile Ser Phe Phe Ser Glu Asp Ser
65 70 75 80
Ser Pro Pro Ser Ser Ser Thr Thr Phe His Ile Gln Ala Asp Lys Thr
85 90 95
Glu Leu Tyr His Leu Ser Ile Gly Tyr Tyr Ala Pro Tyr Gly Asn Lys
100 105 110
Gly Thr Thr Ile Leu Val Asn Gly Ala Gly Asn Gly Glu Phe Met Leu
115 120 125
Pro Ala Pro Glu Asp Gly Ala Val Ser Ala Glu Val Glu Ile Ser Lys
130 135 140
Ile Leu Leu Glu Glu Gly Asn Asn Thr Ile Thr Phe Thr Arg Gly Trp
145 150 155 160
Gly Tyr Tyr Gly Ile Glu Tyr Ile Arg Val Glu Pro Val Asn Pro Thr
165 170 175
Leu Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ala Glu Glu Asp Tyr Glu Ala Thr Gly
180 185 190
Asn Val Ser Val Thr Asn Glu Ile Glu Gly Tyr Ser Gly Ala Gly Tyr
195 200 205
Leu Phe Asn Gln Glu Gly Thr Ile His Trp Asn Val Thr Ser Pro Glu

210 215 220

Thr Ser Ile Tyr Glu Val Ile Val Ala Tyr Ala Ala Pro Tyr Gly Asp
225 230 235 240

Lys Gln Thr Asn Leu Thr Val Asn Gly Gln Gly Thr Val Asn Leu Asp
245 250 255

Leu Lys Glu Thr Glu Val Phe Val Glu Leu Asn Val Gly Ile Val Ser
260 265 270

Leu Asn Glu Gly Glu Asn Thr Leu Thr Leu His Ser Gly Trp Gly Trp
275 280 285

Tyr Asn Ile Asp Tyr Ile Lys Leu Val Pro Val Val Ser Ser Asp Pro
290 295 300

Glu Pro His Gln Val Glu Lys Thr Leu Val Asn Pro Asp Ala Ser Pro
305 310 315 320

Glu Ala Arg Ala Leu Ile Asn Tyr Leu Val Asp Gln Tyr Gly Asn Lys
325 330 335

Ile Leu Ser Gly Gln Thr Glu Leu Lys Asp Ala Arg Trp Ile His Glu
340 345 350

Gln Val Gly Lys Tyr Pro Ala Val Met Ala Val Asp Phe Met Asp Tyr
355 360 365

Ser Pro Ser Arg Val Val His Gly Ala Thr Gly Thr Ala Val Glu Glu
370 375 380

Ala Ile Glu Trp Ala Glu Met Gly Gly Ile Ile Thr Phe His Trp His
385 390 395 400

Trp Asn Ala Pro Lys Asp Leu Leu Asn Val Pro Gly Asn Glu Trp Trp
405 410 415

Ser Gly Phe Tyr Thr Arg Ala Thr Thr Phe Asp Val Glu Tyr Ala Leu
420 425 430

Glu Asn Arg Glu Ser Glu Asp Phe Gln Leu Leu Ile Ser Asp Met Asp
435 440 445

Val Ile Ala Glu Gln Leu Lys Arg Leu Gln Ala Glu Asn Ile Pro Val
450 455 460

Leu Trp Arg Pro Leu His Glu Ala Glu Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly
465 470 475 480

Ala Lys Gly Pro Glu Ala Ala Ile Glu Leu Tyr Arg Leu Met Tyr Asp
485 490 495

Arg Tyr Thr Asn His His Lys Leu Asn Asn Leu Ile Trp Met Trp Asn
500 505 510

Ser Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Pro Gly Asp Asp Val Val Asp Met Ile
515 520 525

Ser Thr Asp Ile Tyr Asn Pro Val Gly Asp Phe Ser Pro Ser Ile Asn
530 535 540

Lys Tyr Glu His Leu Lys Glu Leu Val Gln Asp Lys Lys Leu Val Ala
545 550 555 560

Leu Pro Glu Thr Gly Ile Ile Pro Asp Pro Asp Gln Leu Gln Leu Phe
565 570 575

Asn Ala Asn Trp Ser Trp Phe Ala Thr Trp Thr Gly Asp Tyr Ile Arg
580 585 590
Asp Gly Ile Ser Asn Pro Ile Glu His Leu Gln Lys Val Phe His His
595 600 605
Asp Tyr Val Ile Thr Leu Asp Glu Leu Pro Glu Asn Leu Ser Arg Tyr
610 615 620
Gly Leu Ser Glu Gly Val Trp Lys Ser Asp Ala Asp Leu Ser Val Lys
625 630 635 640
Thr Arg Thr Thr Ser Glu Ile Thr Val Asn Trp Ser Asn Ala Ile Gln
645 650 655
Tyr Asp Ser Val Asn Gly Tyr Lys Leu Ile Lys Asp Gly Val Glu Thr
660 665 670
Val Ser Val Glu Gly Gly Val Gln Glu Tyr Thr Phe Thr Asn Leu Leu
675 680 685
Pro Gly Thr Gln Tyr Thr Ile Lys Val Glu Ala Leu Asp Gln Asp Asp
690 695 700
Arg Trp Thr Ala Asp Gly Pro Val Ala Val Val Ser Thr Leu Ser Asn
705 710 715 720
Ala Pro Ile Ser Tyr Pro Pro Ala Val Thr Pro Asp Glu Pro Asn Glu
725 730 735
Glu Leu Ser Glu Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Asp Asp Leu Ser Ser
740 745 750
Gln Asp Gly Val Leu Glu Val Ser Leu Glu Pro Thr Val Thr Lys Leu
755 760 765
Ile Ile Pro Ser Ala Leu Ala Gly Thr Leu Asp Gly Asp Leu Arg Ile
770 775 780
Gly Tyr Gly Asp Val Trp Ile Val Ile Pro His Glu Gln Leu Gly Gly
785 790 795 800
Asp Glu Gln Gln Ser Gly Ser Ala Tyr Glu Leu Val Leu Glu Ile
805 810 815

<210> 27
<211> 1488
<212> DNA
<213> Bacillus sp.
<400> 27

atgaggaatg aaaaaatcag gccatttact aaaataaagg caagtgttgt tactagtgtt 60
ttactattaa ctatttccct aattttcact ataggaaata tagcaaatgc tgaatctgag 120
gtaagaatat ttgaagctga agatgctatt ttaaatgggc tgactattaa aaattctgaa 180
ccaggttttt ctggtaccgg atatgtaggt gactttgaaa atagctctca gagtgtgacg 240
tttcaaattg aggctcctaa agccggttta tacaacttaa atattggata tggcgcgatt 300
tatggaagtg gaaaagtagc taatgttatt gtaaatggag agaagctaag tacttttaca 360
atgggaagtg gctttggtaa agcgtcagca ggaaaggtat tacttaattc aggcttaaat 420
actatctcga ttactcctaa ttggacatgg tttaccattg attatattga agttatacat 480
gcaccggaac cggaaaacca taatgtagaa aagacgttaa ttaacccaaa tgcaacggat 540
gaagccaaag ctttaataag ctatctagtt gataactttg gtgagaaaat tcttgcaggg 600

caacatgatt atccaaatac acgaccacga gatttagaat atatttatga aactactggg 660
aagtatcctg ctgttttagg tttagacttt attgataaca gtccttctag agttgagcgc 720
ggagcctctg ctgatgaaac accagtagct attgactggt ggaataaagg gggaattgtt 780
actttcacct ggcattggaa tgctcccaaa gatttattag atgaaccagg aaatgaatgg 840
tggagtggtt tttatacgag agcaacaact tttgacgtag aatatgcttt aaaacatccg 900
aagtcggagg actacatgct tctaatacgt gatattgatg taatagctgg tgaactaaag 960
aaattgcagg aagcaaatgt tcctgtttta tggaggccac ttcatgaggc tgaaggcggg 1020
tggttctggt ggggggcaaa aggtcctgaa tcaaccaagg agctatggag attaatgtat 1080
gatagaatga cgaactacca taacttaaat aatttaatat gggtatggaa ttccattgaa 1140
gaggattggt atcctggaga tgagtatgtc gatattgtaa gcttcgattc atatccaggt 1200
gaatataact atagtccaat gagccgtgag tatgaagcac ttaaagagtt gtctagtaac 1260
aagaaactta tagcaatagc agaaaatgga ccaataccag atcctgattt actacaactt 1320
taccatgcta actatagttg gtttgctaca tggaatggag atatattaag aaatcaaaat 1380
agcgaagagc acctaagaaa agtatataat catgattatg tgattaccct aaataaatta 1440
cctaacctta aaacatatag gggaagatgc acttatacag acactatc 1488

<210> 28
<211> 496
<212> PRT
<213> Bacillus sp.
<400> 28

Met Arg Asn Glu Lys Ile Arg Pro Phe Thr Lys Ile Lys Ala Ser Val
1 5 10 15
Val Thr Ser Val Leu Leu Leu Thr Ile Ser Leu Ile Phe Thr Ile Gly
20 25 30
Asn Ile Ala Asn Ala Glu Ser Glu Val Arg Ile Phe Glu Ala Glu Asp
35 40 45
Ala Ile Leu Asn Gly Leu Thr Ile Lys Asn Ser Glu Pro Gly Phe Ser
50 55 60
Gly Thr Gly Tyr Val Gly Asp Phe Glu Asn Ser Ser Gln Ser Val Thr
65 70 75 80
Phe Gln Ile Glu Ala Pro Lys Ala Gly Leu Tyr Asn Leu Asn Ile Gly
85 90 95
Tyr Gly Ala Ile Tyr Gly Ser Gly Lys Val Ala Asn Val Ile Val Asn
100 105 110
Gly Glu Lys Leu Ser Thr Phe Thr Met Gly Ser Gly Phe Gly Lys Ala
115 120 125
Ser Ala Gly Lys Val Leu Leu Asn Ser Gly Leu Asn Thr Ile Ser Ile
130 135 140
Thr Pro Asn Trp Thr Trp Phe Thr Ile Asp Tyr Ile Glu Val Ile His
145 150 155 160
Ala Pro Glu Pro Glu Asn His Asn Val Glu Lys Thr Leu Ile Asn Pro
165 170 175
Asn Ala Thr Asp Glu Ala Lys Ala Leu Ile Ser Tyr Leu Val Asp Asn
180 185 190
Phe Gly Glu Lys Ile Leu Ala Gly Gln His Asp Tyr Pro Asn Thr Arg

195 200 205

Pro Arg Asp Leu Glu Tyr Ile Tyr Glu Thr Thr Gly Lys Tyr Pro Ala
210 215 220

Val Leu Gly Leu Asp Phe Ile Asp Asn Ser Pro Ser Arg Val Glu Arg
225 230 235 240

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

Gly Gly Ile Val Thr Phe Thr Trp His Trp Asn Ala Pro Lys Asp Leu
260 265 270

Leu Asp Glu Pro Gly Asn Glu Trp Trp Ser Gly Phe Tyr Thr Arg Ala
275 280 285

Thr Thr Phe Asp Val Glu Tyr Ala Leu Lys His Pro Lys Ser Glu Asp
290 295 300

Tyr Met Leu Leu Ile Arg Asp Ile Asp Val Ile Ala Gly Glu Leu Lys
305 310 315 320

Lys Leu Gln Glu Ala Asn Val Pro Val Leu Trp Arg Pro Leu His Glu
325 330 335

Ala Glu Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly Ala Lys Gly Pro Glu Ser Thr
340 345 350

Lys Glu Leu Trp Arg Leu Met Tyr Asp Arg Met Thr Asn Tyr His Asn
355 360 365

Leu Asn Asn Leu Ile Trp Val Trp Asn Ser Ile Glu Glu Asp Trp Tyr
370 375 380

Pro Gly Asp Glu Tyr Val Asp Ile Val Ser Phe Asp Ser Tyr Pro Gly
385 390 395 400

Glu Tyr Asn Tyr Ser Pro Met Ser Arg Glu Tyr Glu Ala Leu Lys Glu
405 410 415

Leu Ser Ser Asn Lys Lys Leu Ile Ala Ile Ala Glu Asn Gly Pro Ile
420 425 430

Pro Asp Pro Asp Leu Leu Gln Leu Tyr His Ala Asn Tyr Ser Trp Phe
435 440 445

Ala Thr Trp Asn Gly Asp Ile Leu Arg Asn Gln Asn Ser Glu Glu His
450 455 460

Leu Arg Lys Val Tyr Asn His Asp Tyr Val Ile Thr Leu Asn Lys Leu
465 470 475 480

Pro Asn Leu Lys Thr Tyr Arg Gly Arg Cys Thr Tyr Thr Asp Thr Ile
485 490 495

<210> 29

<211> 1086

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

<400> 29

atgtacaaaa aatttggaat ctctttattg cttgctttat taatcgtttc agctttctcg 60

cagacggcat ctgctcatac agtgaatccg gtgaaccaaa atgcccagtc gacaacgaag 120

gagctgatga attggcttgc tcatctgccg aaccgatcgg aaaatcgcgt actgtcaggt 180

gcattcggcg gatattctaa tgcgacgttt tctatgaaag aagccaatcg aatcaaagat 240
gctacagggc agtcacctgt cgtgtatgct tgtgattatt cgagaggatg gctggagaca 300
gctcatattg ctgatgcgat cgattatagc tgtaacagcg atctaatctc tcattggaag 360
agcggaggca tacctcagat cagcatgcat cttcctaacc ctgcgtttca atccggcaat 420
tacaaaacaa agatctcaaa cagtcagtat gaaaaaatct tagactcatc aaccacagaa 480
ggcaaacgat tggatgctgt actgagcaag gttgcagatg gccttcagca gttaaaaaat 540
gaaggcgttc cagttctttt cagacctctt cacgaaatga acggagaatg gttctggtgg 600
gggcttaccg gctataacca aaaggatagc gagcgaatat cactatacaa acagctttac 660
caaaaaatct atcattatat gaccgataca agaggattgg acaacttgat ttgggtttat 720
gcaccagacg ccaaccgcga ctttaagaca gacttttatc ctggggattc atatgttgat 780
attgtcggat tagacgcgta tttctcagat gcttattcga tcaaaggata tgacgagtta 840
acggcgctta ataagccatt tgcctttaca gaagtcggtc cgcaaacaac aaacggcagc 900
ctggattatt ctcaatttat caatgcagtt aaacaaaaat atccgaaaac catttatttc 960
ttagcttggg atgagggttg gagccctgcg gctaatcagg gtgcctttaa tctctataat 1020
gacagttgga cgctgaataa gggagagcta tgggaaggca gctcacttac accggcagcc 1080
gaataa 1086

<210> 30
<211> 361
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis
<400> 30

Met Tyr Lys Lys Phe Gly Ile Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ile Val
1 5 10 15
Ser Ala Phe Ser Gln Thr Ala Ser Ala His Thr Val Asn Pro Val Asn
20 25 30
Gln Asn Ala Gln Ser Thr Thr Lys Glu Leu Met Asn Trp Leu Ala His
35 40 45
Leu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Arg Val Leu Ser Gly Ala Phe Gly Gly
50 55 60
Tyr Ser Asn Ala Thr Phe Ser Met Lys Glu Ala Asn Arg Ile Lys Asp
65 70 75 80
Ala Thr Gly Gln Ser Pro Val Val Tyr Ala Cys Asp Tyr Ser Arg Gly
85 90 95
Trp Leu Glu Thr Ala His Ile Ala Asp Ala Ile Asp Tyr Ser Cys Asn
100 105 110
Ser Asp Leu Ile Ser His Trp Lys Ser Gly Gly Ile Pro Gln Ile Ser
115 120 125
Met His Leu Pro Asn Pro Ala Phe Gln Ser Gly Asn Tyr Lys Thr Lys
130 135 140
Ile Ser Asn Ser Gln Tyr Glu Lys Ile Leu Asp Ser Ser Thr Thr Glu
145 150 155 160
Gly Lys Arg Leu Asp Ala Val Leu Ser Lys Val Ala Asp Gly Leu Gln
165 170 175
Gln Leu Lys Asn Glu Gly Val Pro Val Leu Phe Arg Pro Leu His Glu
180 185 190

Met Asn Gly Glu Trp Phe Trp Trp Gly Leu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys
195 200 205
Asp Ser Glu Arg Ile Ser Leu Tyr Lys Gln Leu Tyr Gln Lys Ile Tyr
210 215 220
His Tyr Met Thr Asp Thr Arg Gly Leu Asp Asn Leu Ile Trp Val Tyr
225 230 235 240
Ala Pro Asp Ala Asn Arg Asp Phe Lys Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Asp
245 250 255
Ser Tyr Val Asp Ile Val Gly Leu Asp Ala Tyr Phe Ser Asp Ala Tyr
260 265 270
Ser Ile Lys Gly Tyr Asp Glu Leu Thr Ala Leu Asn Lys Pro Phe Ala
275 280 285
Phe Thr Glu Val Gly Pro Gln Thr Thr Asn Gly Ser Leu Asp Tyr Ser
290 295 300
Gln Phe Ile Asn Ala Val Lys Gln Lys Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Phe
305 310 315 320
Leu Ala Trp Asp Glu Gly Trp Ser Pro Ala Ala Asn Gln Gly Ala Phe
325 330 335
Asn Leu Tyr Asn Asp Ser Trp Thr Leu Asn Lys Gly Glu Leu Trp Glu
340 345 350
Gly Ser Ser Leu Thr Pro Ala Ala Glu
355 360

<210> 31
<211> 3041
<212> DNA
<213> Caldocellulosiruptor sp.
<400> 31

caatgggctt gaagattggt attcactggg gtgctgattt tgtaatagcc aatatcaagg 60
ttgaagaggt aactcagtaa aagaggcttt ttgctggtga gcacaccgct gaagagaaaa 120
gtaaggttat gttaaagaag cggtgtgccc accggcttta aaaaaataaa aaaggggaga 180
gtgccaggat tatgagaaag ggcttaaaga ttacatcttt aatagtgagc cttgtatttt 240
tacttgggct tttgccgaca ggaatttttg gtgctgttga gacatctgtt caaagctatg 300
ttttcgactt tgaagatggc accacaatga cattcggtga ggcttgggga gactcattaa 360
aatgtatcaa aaaggtgtca gtttctactg atttgcagcg acctggtaac aagtatgcgc 420
tcaggcttga tgttgagttc aacgagaaca atggatggga ccagggcgac cttggtgcat 480
ggataggtgg tgttgtcgaa gggcagtttg actttacaaa ctacaagtct gttgagtttg 540
aaatgtttgt tccatacgac gagtttgcaa aagcaaaagg tggctttgct tacaaggttg 600
tattgaatga tggatggaaa gaacttggaa gcgaatttag cattacagta aatgctggca 660
aaaaggtgaa gataaacggc aaggactata tggtcattca caaggcgttt gcaattccag 720
atgattttag aaccaaaaag cgtgcacagc ttgtgttcca atttgcaggt caaaactgca 780
actacaaagg acctatctac cttgacaata taagagtaag acctgaggat gcgtcaaacc 840
tctcaaaaga agactatgga agtagcgaag aagaggaaat ttctgaggac tttttcacag 900
gggttaccct tgtgtatcca caggaaggca aaaactttgt gtacaatttt gaaaaagaca 960
caatgggatt ttataaatac tcgggtgatg gatttgcaaa gaaaacaaag tcaatggaat 1020
tttcacagga cttgaagaca tcaacaaatg caggcagcct caaactcaat gctaatttcc 1080

agggtactgc gtttgaagaa atgaacattg ctgtaaagct cacagacaaa gaaggaaaac 1140
tttttgacct tggcaaatac tccgcacttg agtatacaat ctacattcca aatccagaca 1200
aagttgcggg gaaaatcatg tctgcaagtg ctgtggacag tccatggaag ataatcaaag 1260
actttacact tcttaactac aaagataaga caacatggaa agagataaac ggaaagactt 1320
atgcggtcat aaagtgcaag gataatcttt acaatgtaaa agaaaaagca ggtgtattgg 1380
ttttgaggat tgcggggtct tatgtaaagt atacaggccc catctacatt gataacgtaa 1440
cattaattgc tggaaagaag gttgcaccaa aggtggagag aatatcactt ccaaatccaa 1500
agacatacta taaagttaag attgaagctg agagtgcaag tgatggctgg gcttacagcg 1560
ttgagaaaga aaatgcaaag ttttctggga aaggctatgt acttttgttt gggaacaaca 1620
tgggcaatac cctttataac atcaaggttc cgaagacagg acattacatc ttcactcttg 1680
caatctcaac ccttgggctt gtaaaggatg gtagcattga tatctggata gacggtgatt 1740
tgaaaggtgg ggcaaaggtt ccaaacgtaa agggcaagtt ccaggaagtt gttgtcagaa 1800
aaaagattta tttaacagcg ggtgagcaca caatatcact gcaaaaatct ggcggataca 1860
caattgcagt tgactatttt gtgatagaag agcttgttgc ggcaaataaa tcaaagcttt 1920
cggtttcttc aaagttagtg accccaaatc cacaccccaa tgcccaaagg ctcataaatt 1980
atttgtcaag catttacggt gaaaagattt tgtctggtca gcagagcagc ggtgaaggca 2040
aagaggttca gatgattttt gatgtcacaa agagatatcc agctgttaga agctttgatt 2100
tcatggacta ctcaccaagc agagtgcagc atggtacaaa aggtacagat gttgatgagg 2160
caataaagtg gtggaagagc ggcggcatag ttgcattttg ctggcactgg aacgcaccaa 2220
caggtcttat tgaccagccg ggcaaagagt ggtggagagg tttttacaca gaggctacaa 2280
catttgacct caagaaagcc atggacaatc caaattctga agaatataaa ctcattttga 2340
gagatataga cgctattgct gagcagctca aaaaattgca ggctgaaggt gtgccagttc 2400
ttttcagacc gcttcacgag gcctctggcg gctggttctg gtggggtgca aaaggtccag 2460
agccgtatat aaagctttgg aagctcatgt ttgacaggct tgtaaactat cacaaaatca 2520
acaacctaat atgggtatgg aacggtcagg atgctgcctg gtatccgggt gaccagtatg 2580
ttgatataat tgcagaagat atatatgagg aaaaagctca gtactcacca tatacagaga 2640
ggttcgtgaa agctctcaag tacacaaatg caaacaagat gatagcactt tctgagtgcg 2700
gaactattcc tgacccggct gtgctaaaac aagaaggtgt ttcgtggctg tggttttctg 2760
tatgggcagg aagctatgtc atgacaggca gcaagtacaa cgatgaatgg aacgacaatc 2820
acatgctaag aaagatttac aacaatgact atgtaataac aaaagatgaa ctacctgata 2880
taaagagcat tccactcaaa tagaatgaga tatattttgg aatatccaaa atcaactgtc 2940
agcctgtgag aggagagaag ttcaaaaaag acctcctccc tttttggttc ttgcaaaata 3000
atcaattttt ggttttgaca tctcaaacat gttaattaaa a 3041

<210> 32
<211> 903
<212> PRT
<213> Caldocellulosiruptor sp.
<400> 32

Met Arg Lys Gly Leu Lys Ile Thr Ser Leu Ile Val Ser Leu Val Phe
1 5 10 15
Leu Leu Gly Leu Leu Pro Thr Gly Ile Phe Gly Ala Val Glu Thr Ser
20 25 30
Val Gln Ser Tyr Val Phe Asp Phe Glu Asp Gly Thr Thr Met Thr Phe
35 40 45
Gly Glu Ala Trp Gly Asp Ser Leu Lys Cys Ile Lys Lys Val Ser Val

```
     50                  55                  60
Ser Thr Asp Leu Gln Arg Pro Gly Asn Lys Tyr Ala Leu Arg Leu Asp
 65                  70                  75                  80
Val Glu Phe Asn Glu Asn Asn Gly Trp Asp Gln Gly Asp Leu Gly Ala
                85                  90                  95
Trp Ile Gly Gly Val Val Glu Gly Gln Phe Asp Phe Thr Asn Tyr Lys
            100                 105                 110
Ser Val Glu Phe Glu Met Phe Val Pro Tyr Asp Glu Phe Ala Lys Ala
        115                 120                 125
Lys Gly Gly Phe Ala Tyr Lys Val Val Leu Asn Asp Gly Trp Lys Glu
    130                 135                 140
Leu Gly Ser Glu Phe Ser Ile Thr Val Asn Ala Gly Lys Lys Val Lys
145                 150                 155                 160
Ile Asn Gly Lys Asp Tyr Met Val Ile His Lys Ala Phe Ala Ile Pro
                165                 170                 175
Asp Asp Phe Arg Thr Lys Lys Arg Ala Gln Leu Val Phe Gln Phe Ala
            180                 185                 190
Gly Gln Asn Cys Asn Tyr Lys Gly Pro Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Arg
        195                 200                 205
Val Arg Pro Glu Asp Ala Ser Asn Leu Ser Lys Glu Asp Tyr Gly Ser
    210                 215                 220
Ser Glu Glu Glu Glu Ile Ser Glu Asp Phe Phe Thr Gly Val Thr Leu
225                 230                 235                 240
Val Tyr Pro Gln Glu Gly Lys Asn Phe Val Tyr Asn Phe Glu Lys Asp
                245                 250                 255
Thr Met Gly Phe Tyr Lys Tyr Ser Gly Asp Gly Phe Ala Lys Lys Thr
            260                 265                 270
Lys Ser Met Glu Phe Ser Gln Asp Leu Lys Thr Ser Thr Asn Ala Gly
        275                 280                 285
Ser Leu Lys Leu Asn Ala Asn Phe Gln Gly Thr Ala Phe Glu Glu Met
    290                 295                 300
Asn Ile Ala Val Lys Leu Thr Asp Lys Glu Gly Lys Leu Phe Asp Leu
305                 310                 315                 320
Gly Lys Tyr Ser Ala Leu Glu Tyr Thr Ile Tyr Ile Pro Asn Pro Asp
                325                 330                 335
Lys Val Ala Gly Lys Ile Met Ser Ala Ser Ala Val Asp Ser Pro Trp
            340                 345                 350
Lys Ile Ile Lys Asp Phe Thr Leu Leu Asn Tyr Lys Asp Lys Thr Thr
        355                 360                 365
Trp Lys Glu Ile Asn Gly Lys Thr Tyr Ala Val Ile Lys Cys Lys Asp
    370                 375                 380
Asn Leu Tyr Asn Val Lys Glu Lys Ala Gly Val Leu Val Leu Arg Ile
385                 390                 395                 400
Ala Gly Ser Tyr Val Lys Tyr Thr Gly Pro Ile Tyr Ile Asp Asn Val
                405                 410                 415
```

Thr Leu Ile Ala Gly Lys Lys Val Ala Pro Lys Val Glu Arg Ile Ser
420 425 430
Leu Pro Asn Pro Lys Thr Tyr Tyr Lys Val Lys Ile Glu Ala Glu Ser
435 440 445
Ala Ser Asp Gly Trp Ala Tyr Ser Val Glu Lys Glu Asn Ala Lys Phe
450 455 460
Ser Gly Lys Gly Tyr Val Leu Leu Phe Gly Asn Asn Met Gly Asn Thr
465 470 475 480
Leu Tyr Asn Ile Lys Val Pro Lys Thr Gly His Tyr Ile Phe Thr Leu
485 490 495
Ala Ile Ser Thr Leu Gly Leu Val Lys Asp Gly Ser Ile Asp Ile Trp
500 505 510
Ile Asp Gly Asp Leu Lys Gly Gly Ala Lys Val Pro Asn Val Lys Gly
515 520 525
Lys Phe Gln Glu Val Val Val Arg Lys Lys Ile Tyr Leu Thr Ala Gly
530 535 540
Glu His Thr Ile Ser Leu Gln Lys Ser Gly Gly Tyr Thr Ile Ala Val
545 550 555 560
Asp Tyr Phe Val Ile Glu Glu Leu Val Ala Ala Asn Lys Ser Lys Leu
565 570 575
Ser Val Ser Ser Lys Leu Val Thr Pro Asn Pro His Pro Asn Ala Gln
580 585 590
Arg Leu Ile Asn Tyr Leu Ser Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Ile Leu Ser
595 600 605
Gly Gln Gln Ser Ser Gly Glu Gly Lys Glu Val Gln Met Ile Phe Asp
610 615 620
Val Thr Lys Arg Tyr Pro Ala Val Arg Ser Phe Asp Phe Met Asp Tyr
625 630 635 640
Ser Pro Ser Arg Val Gln His Gly Thr Lys Gly Thr Asp Val Asp Glu
645 650 655
Ala Ile Lys Trp Trp Lys Ser Gly Gly Ile Val Ala Phe Cys Trp His
660 665 670
Trp Asn Ala Pro Thr Gly Leu Ile Asp Gln Pro Gly Lys Glu Trp Trp
675 680 685
Arg Gly Phe Tyr Thr Glu Ala Thr Thr Phe Asp Leu Lys Lys Ala Met
690 695 700
Asp Asn Pro Asn Ser Glu Glu Tyr Lys Leu Ile Leu Arg Asp Ile Asp
705 710 715 720
Ala Ile Ala Glu Gln Leu Lys Lys Leu Gln Ala Glu Gly Val Pro Val
725 730 735
Leu Phe Arg Pro Leu His Glu Ala Ser Gly Gly Trp Phe Trp Trp Gly
740 745 750
Ala Lys Gly Pro Glu Pro Tyr Ile Lys Leu Trp Lys Leu Met Phe Asp
755 760 765
Arg Leu Val Asn Tyr His Lys Ile Asn Asn Leu Ile Trp Val Trp Asn

770 775 780

Gly Gln Asp Ala Ala Trp Tyr Pro Gly Asp Gln Tyr Val Asp Ile Ile

785 790 795 800

Ala Glu Asp Ile Tyr Glu Glu Lys Ala Gln Tyr Ser Pro Tyr Thr Glu

805 810 815

Arg Phe Val Lys Ala Leu Lys Tyr Thr Asn Ala Asn Lys Met Ile Ala

820 825 830

Leu Ser Glu Cys Gly Thr Ile Pro Asp Pro Ala Val Leu Lys Gln Glu

835 840 845

Gly Val Ser Trp Leu Trp Phe Ser Val Trp Ala Gly Ser Tyr Val Met

850 855 860

Thr Gly Ser Lys Tyr Asn Asp Glu Trp Asn Asp Asn His Met Leu Arg

865 870 875 880

Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Tyr Val Ile Thr Lys Asp Glu Leu Pro Asp

885 890 895

Ile Lys Ser Ile Pro Leu Lys

900

<210> 33

<211> 1450

<212> RNA

<213> Bacillus sp. I633

<400> 33

gcucccugau guuagcggcg gacgggugag uaacacgugg gcaaccugcc cuguagacug 60

ggauaacauc gagaaaucgg ugcuaauacc ggauaauaga uggaauugca uaauucuauu 120

uuaaaagaug gcuccggcua ucacuacagg augggcccgc ggcgcauuag cuaguuggua 180

agguaacggc uuaccaaggc gacgaugcgu agccgaccug agagggugau cggccacacu 240

gggacugaga cacggcccag acuccuacgg gaggcagcag uagggaaucu uccgcaaugg 300

acgaaagucu gacggagcaa cgccgcguga gcgaugaagg ccuucggguu guaaagcucu 360

guuguuaggg aagaacaagu gccauucaaa uaggguggca ccuugacggu accuaaccag 420

aaagccacgg cuaacuacgu gccagcagcc gcgguaauac guagguggca agcguugucc 480

ggaauuauug ggcguaaagc gcgcgcaggc gguuucuuaa gucugaugug aaagcccccg 540

gcucaaccgg ggagggucau uggaaacugg gagacuugag uacagaagag gagaguggaa 600

uuccacgugu agcggugaaa ugcguagaua uguggaggaa caccaguggc gaaggcgacu 660

cucuggucug uaacugacgc ugaggcgcga aagcgugggg agcaaacagg auuagauacc 720

cugguagucc acgccguaaa cgaugagugc uagguguuag ggguuucgau gcccuuagug 780

ccgaaguuaa cacaguaagc acuccgccug gggaguacgg ccgcaaggcu gaaacucaaa 840

ggaauugacg ggggcccgca caagcggugg agcauguggu uuaauucgaa gcaacgcgaa 900

gaaccuuacc aggucuugac auccuuugac aacccuagag auagggcguu ccccuucggg 960

ggacaaagug acagguggug caugguuguc gucagcucgu gucgugagau guuggguuaa 1020

gucccgcaac gagcgcaacc cuugaucuua guugccagca uuuaguuggg cacucuaagg 1080

ugacugccgg ugacaaaccg gaggaaggug gggaugacgu caaaucauca ugccccuuau 1140

gaccugggcu acacacgugc uacaauggau gguacaaagg gcagcaaaac cgcgaggucg 1200

agccaauccc auaaaaccau ucucaguucg gauuguaggc ugcaacucgc cuacaugaag 1260

ccggaaucgc uaguaaucgc ggaucagcau gccgcgguga auacguuccc gggccuugua 1320

cacaccgccc gucacaccac gagaguuugu aacacccgaa gucggugggg uaaccuuuug 1380

gagccagccg ccuaaggugg gacagaugau uggggugaag ucguaacaag guagccguau 1440

cggaaggugc 1450

<210> 34

<211> 1508

<212> RNA

<213> Bacillus sp. AAI12

<400> 34

gacgaacgcu ggcggcgugc cuaauacaug caagucgagc ggacauuuag gagcuugcuc 60

cuaaauguua gcggcggacg ggugaguaac acgugggcaa ccugcccugu agacugggau 120

aacaucgaga aaucggugcu aauaccggau aaucuugagg auugcauaau ccucuuguaa 180

aagauggcuc cggcuaucac uacgggaugg gcccgcggcg cauuagcuag uugguaaggu 240

aacggcuuac caaggcgacg augcguagcc gaccugagag ggugaucggc cacacuggga 300

cugagacacg gcccagacuc cuacgggagg cagcaguagg gaaucuuccg caauggacga 360

aagucugacg gagcaacgcc gcgugaguga ugaaggguuu cggcucguaa agcucuguug 420

uuagggaaga acaagugccg uucaaauagg gcggcaccuu gacgguaccu aaccagaaag 480

ccacggcuaa cuacgugcca gcagccgcgg uaauacguag guggcaagcg uuguccggaa 540

uuauugggcg uaaagcgcgc gcaggcgguc uuuuaagucu gaugugaaau cucggggcuc 600

aaccccgagc ggucauugga aacugggaga cuugaguaca gaagaggaga guggaauucc 660

acguguagcg gugaaaugcg uagauaugug gaggaacacc aguggcgaag gcgacucucu 720

ggucuguaac ugacgcugag gcgcgaaagc gugggggagca aacaggauua gauacccugg 780

uaguccacgc cguaaacgau gagugcuagg uguuaggggu uucgaugccc uuagugccga 840

aguuaacaca uuaagcacuc cgccuggggа guacgaccgc aagguugaaa cucaaaggaa 900

uugacggggg cccgcacaag caguggagca ugugguuuaa uucgaagcaa cgcgaagaac 960

cuuaccaggu cuugacaucc uuaugaccuc ccuagagaua gggauuuccc uucggggaca 1020

uaagugacag guggugcaug guugucguca gcucgugucg ugagauguug gguuaagucc 1080

cgcaacgagc gcaacccuug aucuuaguug ccagcauuua guugggcacu cuaaggugac 1140

ugccggugau aaaccggagg aaggugggga ugacgucaaa ucaucaugcc ccuuaugacc 1200

ugggcuacac acgugcuaca auggauggua caaagagcag caaaaccgcg aggucgagcc 1260

aaucucauaa agccauucuc aguucggauu guaggcugca acucgccuac augaagccgg 1320

aauugcuagu aaucgcggau cagcaugccg cggugaauac guucccgggc cuuguacaca 1380

ccgcccguca caccacgaga guuuguaaca cccgaagucg guggaguaac ccuuacggga 1440

gcuagccgcc uaaggуggga cagaugauug gggugaaguc guaacaaggu agccguaucg 1500

gaaggugc 1508

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 대장균 DSM 12197에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의해 코드화될 수 있는 폴리펩티드이거나, 또는

(b) SEQ ID NO: 2의 위치 31에서 330에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이거나, 또는

(c) SEQ ID NO: 1의 위치 91에서 990 또는 위치 91에서 1470에 도시된 DNA 서열에 의해 코드화될 수 있는 폴리펩티드이거나, 또는

(d) 상기 폴리펩티드와 최소한 65 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a), (b) 또는 (c)의 단편인

단리된 만난나제.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 바실루스 sp.의 스트레인으로부터 유도될 수 있는 것을 특징으로 하는 만난나제.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

i) 40 ℃에서 측정했을 때, 7.5 내지 10 의 pH 범위에서 최소한 60 %의 상대적인 만난나제 활성을 가지고;

ii) SDS-PAGE에 의해 측정되는 바 34±10 kDa 의 분자량을 가지며, 및/또는

iii) N-말단 서열 ANSGFYVSGTTLYDANG를 가지는

것을 특징으로 하는 만난나제.

청구항 4

만난나제 활성을 나타내는 효소를 코드화하는 DNA 서열을 포함하고 있는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자로, 상기 DNA 서열이

(a) 대장균 DSM 12197에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제;

(b) SEQ ID NO: 1의 위치 91에서 1470, 바람직하게는 위치 91에서 990에 제시된 DNA 서열, 또는 그것에 상보하는 가닥;

(c) 상기 DNA 서열에 최소한 65 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 DNA 서열의 유사체;

(d) 낮은 엄격도에서 SEQ ID NO:1의 위치 91에서 990에 제시된 서열을 포함하는 이중 가닥의 DNA 프로브와 혼성화하는 DNA 서열;

(e) 유전자 코드의 축퇴성 때문에 (b) 또는 (c)의 서열과 혼성화하지 않지만, 이들 서열중 어느 것에 의해 코드화된 폴리펩티드와 정확하게 동일한 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드하는 DNA 서열; 또는

(a), (b), (c), (d) 또는 (e)에서 구체화된 DNA 서열의 단편인 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 만난나제 활성을 나타내는 효소를 코드화하는 DNA 서열이 미생물, 바람직하게는 필라멘트형 진균, 효모, 또는 박테리아로부터; 바람직하게는 바실루스, 칼디셀룰로시룹터 또는 휴미콜라로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 클론된 DNA 서열.

청구항 6

중간의 엄격한 조건하에서 변성된 이중 가닥의 DNA 프로브에 혼성화하는, 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자로, 상기 프로브는 SEQ ID NO:1의 위치 91에서 990에 제시된 서열을 포함하는 DNA 프로브, SEQ ID NO:1의 위치 91에서 1470에 제시된 서열을 포함하는 DNA 프로브 및 약 100 염기쌍의 길이를 가지는 SEQ ID NO:1의 위치 91에서 990의 하위서열을 포함하는 DNA 프로브로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 7

작동가능하게 연결되어 있는 다음의 엘레먼트들을 포함하고 있는 발현 벡터:

전사 프로모터; (a) 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하고 SEQ ID NO:1에 도시된 뉴클레오티드 서열을 뉴클레오티드 91부터 뉴클레오티드 990 까지 포함하고 있는 폴리뉴클레오티드 분자; (b) SEQ ID NO:2의 아미노산 잔기 31부터 아미노산 잔기 330 까지의 아미노산 서열에 최소한 65 % 동일한 만난나제 활성을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자 및 (c) (a) 또는 (b)의 축퇴성 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 DNA 절편; 및 전사 터미네이터.

청구항 8

제 7 항에 따르는 발현 벡터가 도입된 배양된 세포로, 상기 세포는 DNA 절편에 의해 코드화된 폴리펩티드를 발현하는 것을 특징으로 하는 배양된 세포.

청구항 9

(a) SEQ ID NO:2 의 아미노산 잔기 31에서 잔기 330에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 분자; 및

(b) SEQ ID NO:2의 아미노산 잔기 31에서 아미노산 잔기 330의 아미노산에 최소한 65 % 동일한 폴리펩티드 분자

로 이루어지는 군으로부터 선택된 만난나제 활성을 가지고 있는 단리된 폴리펩티드.

청구항 10

바실루스 sp. I633 에 의해 생성되는 제 9 항에 따르는 폴리펩티드.

청구항 11

제 9 항에 따르는 정제된 폴리펩티드를 포함하는 효소 제제.

청구항 12

제 7 항에 따르는 발현 벡터가 도입된 세포를 배양하고, 그로써 상기 세포가 DNA 절편에 의해 코드화된 폴리펩티드를 발현하는 단계; 그리고 그 폴리펩티드를 회수하는 단계로 이루어지는, 만난나제 활성을 가지는 폴리펩티드의 제조방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 추가로 프로테아제, 셀룰라제 (엔도글루카나제), β-글루카나제, 헤미셀룰라제, 리파제, 퍼옥시다제, 라카제, α-아밀라제, 글루코아밀라제, 큐티나제, 펙티나제, 환원효소, 산화효소, 페놀 산화효소, 리그니나제, 풀룰라나제, 펙테이트 리아제, 크실로글루카나제, 크실라나제, 펙틴 아세틸 에스테라제, 폴리갈락투로나제, 람노갈락투로나제, 펙틴 리아제, 다른 만난나제, 펙틴 메틸에스테라제, 셀로비오 가수분해효소, 트란스글루타미나제; 또는 그것들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 14

효소가 (i) 동종성 불순물이 없고, (ii) 제 12 항의 방법에 의해 생성되는, 만난나제 활성을 가지고 있는 단리된 효소.

청구항 15

섬유, 실 또는 직물이 유효량의 제 11 항에 따르는 제제 또는 유효량의 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소로 처리되는, 셀룰로스성 또는 합성 섬유, 실, 제직된 또는 부직 직물의 성질을 개선시키는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 효소 제제 또는 효소가 디사이징 처리 단계에서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

식물 물질이 유효량의 제 11 항에 따르는 제제 또는 유효량의 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소로 처리되는, 식물 물질의 분해 또는 변형 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 식물 물질이 재순환된 폐지; 기계적, 화학적, 반화학적 크래프트 또는 다른 종이 제조용 펄프; 침수 처리를 받는 섬유; 또는 구아르 고무 또는 구주콩깍지 고무 함유 물질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

커피 추출물이 유효량의 제 11 항에 따르는 제제 또는 유효량의 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소로 처리되는, 액체 커피 추출물의 처리 방법.

청구항 20

제 11 항에 따르는 효소 제제 또는 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소를 포함하고 있는 클리닝 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 추가로 셀룰라제, 프로테아제, 리파제, 아밀라제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로부터 선택되는 효소; 및 종래의 세제 성분을 포함하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 22

제 20 항에 있어서, 상기 효소 또는 효소 제제가 총 조성물의 0.0001 내지 2 중량 %, 바람직하게는 0.0005 내지 0.5 중량 %, 보다 바람직하게는 0.001 내지 0.1 중량 % 의 순수한 효소 수준으로 존재하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 효소가 총 조성물의 0.0001 내지 2 중량 %, 바람직하게는 0.0005 내지 0.5 중량 %, 보다 바람직하게는 0.001 내지 0.1 중량 %의 순수한 효소의 수준으로 존재하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 효소가 아밀라제인 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 추가로 셀룰라제, 프로테아제, 리파제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 다른 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 26

제 21 항에 있어서, 음이온성, 비이온성, 양이온성 계면활성제, 및/또는 그것들의 혼합물로부터 선택되는 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 27

제 21 항에 있어서, 표백제를 포함하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 28

제 21 항에 있어서, 증후제를 포함하는 것을 특징으로 하는 클리닝 조성물.

청구항 29

두 개의 긴 사슬 길이를 포함하는 양이온성 계면활성제를 포함하는, 제 21 항에 따르는 직물 연화 조성물.

청구항 30

기계 세척 공정의 세척 사이클중에 있는 직물을 제 11 항에 따르는 효소 제제 또는 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소를 함유하고 있는 세척 용액으로 처리하는 것으로 이루어지는, 직물의 기계 처리 방법.

청구항 31

셀룰라제, 프로테아제, 리파제, 아밀라제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로부터 선택된 효소와 함께, 직물 클리닝 및/또는 직물 얼룩 제거를 위한 클리닝 조성물에 사용되는 제 11 항에 따르는 효소 제제 또는 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소의 용도.

청구항 32

셀룰라제, 아밀라제, 프로테아제, 리파제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로부터 선택되는 효소와 함께 계단, 벽, 욕실 타일 등과 같은 경질 표면을 클리닝하기 위한 클리닝 조성물에 사용되는 제 11 항에 따르는 효소 제제 또는 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소의 용도.

청구항 33

셀룰라제, 아밀라제, 프로테아제, 리파제, 펙틴 분해 효소 및 크실로글루카나제로부터 선택되는 효소와 함께, 손 및 기계식 접시세척을 위한 클리닝 조성물에 사용되는 제 11 항에 따르는 효소 제제 또는 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소의 용도.

청구항 34

셀룰라제, 아밀라제, 프로테아제, 리파제, 펙틴 분해 효소 및/또는 크실로글루카나제로부터 선택되는 효소와 함께, 구강, 치아, 콘택트 렌즈 및 개인용 클리닝 적용을 위한 클리닝 조성물에 사용되는 제 11 항에 따르는 효소 제제 또는 제 1 항 또는 2 항에 따르는 효소의 용도.

청구항 35

(a1) 대장균 DSM 12180에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b1) SEQ ID NO: 6의 위치 32에서 344에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c1) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a1), (b1) 또는 (c1)의 단편;

(a2) 대장균 DSM 12433에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b2) SEQ ID NO: 10의 위치 32에서 362에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c2) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a2), (b2) 또는 (c2)의 단편;

(a3) 대장균 DSM 12441에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b3) SEQ ID NO: 12의 위치 33에서 331에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c3) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a3), (b3) 또는 (c3)의 단편;

(a4) 대장균 DSM 9984에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b4) SEQ ID NO: 14의 위치 166에서 488에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c4) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a4), (b4) 또는 (c4)의 단편;

(a5) 대장균 DSM 12432에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소

에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b5) SEQ ID NO: 16의 위치 68에서 369에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c5) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a5), (b5) 또는 (c5)의 단편;

(a6) 대장균 DSM 12849에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b6) SEQ ID NO: 22의 위치 29에서 320에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c6) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a6), (b6) 또는 (c6)의 단편;

(a7) 대장균 DSM 12180에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b7) SEQ ID NO: 26의 위치 301에서 625에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c7) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a7), (b7) 또는 (c7)의 단편;

(a8) 대장균 DSM 12851에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b8) SEQ ID NO: 28의 위치 166에서 496에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c8) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a8), (b8) 또는 (c8)의 단편;

(a9) 대장균 DSM 12852에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

(b9) SEQ ID NO: 30의 위치 26에서 361에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c9) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a9), (b9) 또는 (c9)의 단편;

(a10) 대장균 DSM 12436에 존재하는 플라스미드안에 클론된 DNA 서열의 일부를 코드화하는 만난나제 효소에 의하여 코드화된 폴리펩티드, 또는

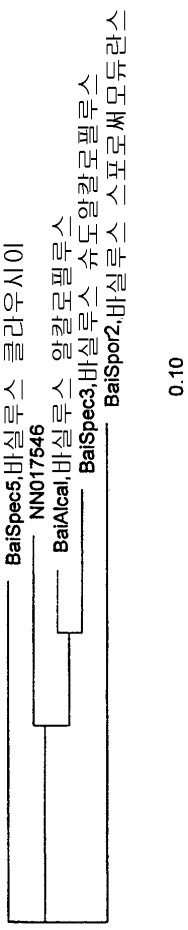
(b10) SEQ ID NO: 32의 위치 593에서 903에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는

(c10) 상기 폴리펩티드와 최소한 85 % 상동하는 (a) 또는 (b)에서 규정된 폴리펩티드의 유사체, 또는 (a10), (b10) 또는 (c10)의 단편인

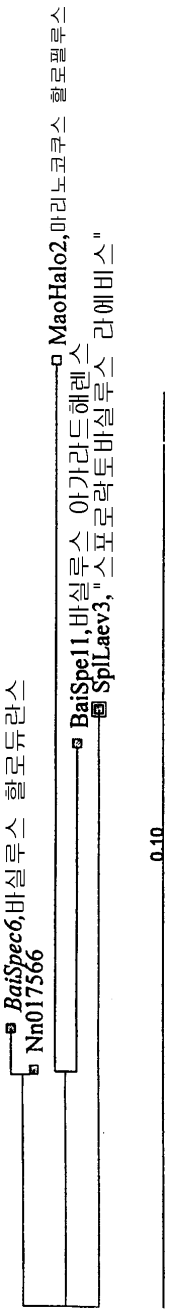
단리된 만난나제.

도면

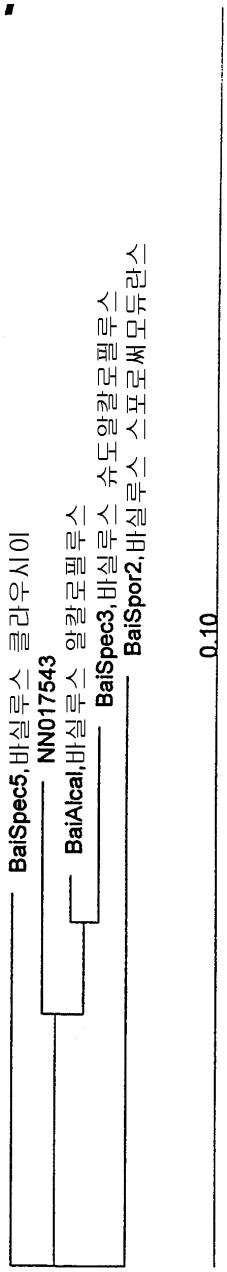
도면1


BaiSpec5,바실루스 클라우시이
NN017546
BaiAlcal,바실루스 알칼로필루스
BaiSpec3,바실루스 슈도알칼로필루스
BaiSpor2,바실루스 스포로씨모듀란스
0.10

도면2


BaiSpec6,바실루스 할로듀란스
Nn017566
MaoHalo2,마리노코쿠스 할로필루스
BaiSpe11,바실루스 아가라드해렌스
SpiLaev3,"스포로락토바실루스 라에비스"
0.10

도면3


BaiSpec5, 바실루스 클라우시이
NN017543
BaiAlcal, 바실루스 알칼로필루스
BaiSpec3, 바실루스 슈도알칼로필루스
BaiSpor2, 바실루스 스포로써모듀란스
0.10