

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0024365 (43) 공개일자 2014년02월28일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C11D 3/386 (2006.01) C12N 9/20 (2006.01) C07K 14/37 (2006.01)		(71) 출원인 다니스코 유에스 인크. 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토 페이지 밀 로드 925
(21) 출원번호 10-2013-7029372		(72) 발명자 시포브스코프 스테판 덴마크 디케이-8250 예가 퀴스트파르크바이 18 젠센 레네 보이센 덴마크 디케이-8270 호이베르 프로브스테파르크바이 26
(22) 출원일자(국제) 2012년04월04일 심사청구일자 없음		치안 전 중국 200125 상하이 안중 로드 레인 47 넘버 19 룸 502
(85) 번역문제출일자 2013년11월05일		(74) 대리인 특허법인코리어나
(86) 국제출원번호 PCT/IB2012/051660		
(87) 국제공개번호 WO 2012/137147 국제공개일자 2012년10월11일		
(30) 우선권주장 61/561,044 2011년11월17일 미국(US) PCT/CN2011/000614 2011년04월08일 중국(CN)		

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 조성물

(57) 요약

(a) 지방 분해 효소; (b) 본 명세서에 정의된 하이드로포빈; 및 선택적으로 (c) 세제를 포함하는 조성물이 제공된다. 본 조성물은 지질-기재의 얼룩을 표면으로부터 제거하기 위한 세정 조성물로서 유용하다.

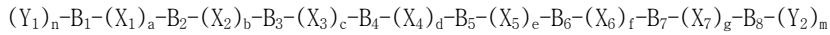
특허청구의 범위

청구항 1

(a) 지방 분해 효소; 및

(b) 하기 화학식 I을 갖는 하이드로포빈을 포함하는 조성물:

[화학식 I]



(여기서,

m 및 n은 독립적으로 0 내지 2000이며;

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 이상은 Cys이며;

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, Y₁ 및 Y₂는 독립적으로 임의의 아미노산을 나타내고;

a는 1 내지 50이며;

b는 0 내지 5이고;

c는 1 내지 100이며;

d는 1 내지 100이고;

e는 1 내지 50이며;

f는 0 내지 5이고;

g는 1 내지 100임).

청구항 2

제1항에 있어서, 지방 분해 효소는 트라이아실글리세롤 가수분해 활성 (E.C. 3.1.1.3)을 갖는 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 지방 분해 효소는 G가 글라이신이고 X가 옥시음이온 구멍(oxyanion hole)-형성 아미노산 잔기인 GX 지방 분해 효소이며, GX 지방 분해 효소는 abH23, abH25 및 abH15로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리(superfamily)에 속하는 조성물.

청구항 4

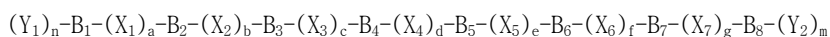
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (c) 세제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 5

(a) G가 글라이신이고 X가 옥시음이온 구멍-형성 아미노산 잔기인 GX 지방 분해 효소;

(b) 하기 화학식 I을 갖는 하이드로포빈:

[화학식 I]



(여기서,

m 및 n은 독립적으로 0 내지 2000이며;

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택

되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 이상은 Cys이며;

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, Y₁ 및 Y₂는 독립적으로 임의의 아미노산을 나타내고;

a는 1 내지 50이며;

b는 0 내지 5이고;

c는 1 내지 100이며;

d는 1 내지 100이고;

e는 1 내지 50이며;

f는 0 내지 5이고;

g는 1 내지 100임); 및

(c) 세제를 포함하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 abH23, abH25, abH16 및 abH15로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리에 속하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 abH23.01, abH 25.01, abH16.01 및 abH15.02로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리에 속하는 조성물.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 옥시음이온 구멍 형성 잔기 X는 M, Q, F, S, T, A, L 및 I로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 9

제3항 또는 제4항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 abH23.01, abH 25.01 및 abH15.02로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리에 속하는 조성물.

청구항 10

제3항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 사상균(filamentous fungus)으로부터 수득되거나 또는 수득가능한 조성물.

청구항 11

제3항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 리조푸스 메이헤이(*Rhizopus meihei*) 유사 상동 패밀리 abH23.01에 속하는 조성물.

청구항 12

제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 상동 패밀리 abH23.01로 분류되며, 써모마이세스(*Thermomyces*), 푸사륨(*Fusarium*), 아스페르길루스(*Aspergillus*) 및 리조푸스(*Rhizopus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 속의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능한 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, GX 지방 분해 효소는 상동 패밀리 abH23.01로 분류되며, 써모마이세스 라누기노수스(*Thermomyces lanuginosus*), 푸사륨 헤테레오스포룸(*Fusarium heterosporum*), 아스페르길루스 투비엔기시스(*Aspergillus tubiengisis*), 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 및 리조푸스 아리주스(*Rhizopus arrizus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 진균류 종으로부터 수득되거나 또는 수득가능한 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 지방 분해 효소는 조성물의 총 중량의 0.001 내지 20 중량ppm의 농도로 존재하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 지방 분해 효소는 조성물의 총 중량의 0.01 내지 2 중량ppm의 농도로 존재하는 조성물.

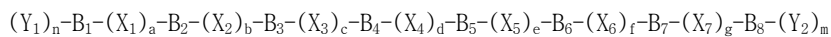
청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 하이드로포빈 코어 내에 40 내지 120개 아미노산의 서열을 갖는 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 하기 화학식 II를 갖는 조성물:

[화학식 II]



(여기서,

m 및 n은 독립적으로 0 내지 20이며;

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상은 Cys이며;

a는 3 내지 25이고;

b는 0 내지 2이며;

c는 5 내지 50이고;

d는 2 내지 35이며;

e는 2 내지 15이고;

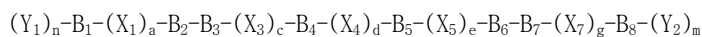
f는 0 내지 2이며;

g는 3 내지 35임).

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 하기 화학식 III을 갖는 조성물:

[화학식 III]



(여기서,

m 및 n은 독립적으로 0 내지 20이며;

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상은 Cys이며;

a는 5 내지 15이고;

c는 5 내지 40이며;

d는 4 내지 23이고;

e는 5 내지 12이며;

g는 6 내지 21임).

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 8개 전부는 Cys인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 하이드로포빈 융합 단백질인 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 사상균으로부터 수득되거나 또는 수득가능한 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 하이드로포빈은 클라도스포룸(*Cladosporium*), 오피스토마(*Ophistoma*), 크리포넥트리아(*Cryphonectria*), 트리코테르마(*Trichoderma*), 지베렐라(*Gibberella*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 마가나포르테(*Maganaporthe*), 하이포크레아(*Hypocrea*), 잔토리아(*Xanthoria*), 에메리셀라(*Emericella*), 아스페르길루스, 파라코시오이데스(*Paracoccidioides*), 메타리지움(*Metarhizium*), 플레우로투스(*Pleurotus*), 코프리누스(*Coprinus*), 디코타이오네마(*Dicotyonema*), 플람물리나(*Flammulina*), 쉬조필룸(*Schizophyllum*), 아가리쿠스(*Agaricus*), 피솔리투스(*Pisolithus*), 트리콜로마(*Tricholoma*), 폴리오카(*Pholioka*), 탈라로마이세스(*Talaromyces*) 및 아그로사이베(*Agrocybe*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 속의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능한 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 조성물 내에서 원위치(*in situ*)에서 생성되는 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 사용 중, 하이드로포빈은 물/공기 계면에서의 평형 표면 장력이 45 mN/m 미만으로 감소되게 하는 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 사용 중, 하이드로포빈은 물/공기 계면에서의 표면 전단 탄성이 300-700 mN/m로 증가되게 하는 조성물.

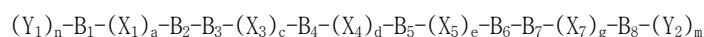
청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 클래스(class) II 하이드로포빈인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 하이드로포빈은 하기 화학식 IV를 갖는 클래스 II 하이드로포빈인 조성물:

[화학식 IV]



(여기서,

m 및 n은 독립적으로 0 내지 200이며;

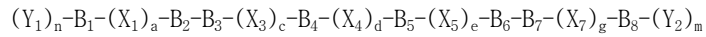
B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 이상은 Cys이며;

a는 6 내지 12이고;
c는 8 내지 16이며;
d는 2 내지 20이고;
e는 4 내지 12이며;
g는 5 내지 15임).

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 하이드로포빈은 하기 화학식 V를 갖는 클래스 II 하이드로포빈인 조성물:

[화학식 V]



(여기서,

m 및 n은 독립적으로 0 내지 10이며;

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu 또는 Ser으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상은 Cys이며;

a는 7 내지 11이고;
c는 11이며;
d는 4 내지 18이고;
e는 6 내지 10이며;
g는 7 내지 10임).

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 8개 전부는 Cys인 조성물.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 기 (X₃)_c는 Z가 지방족 아미노산이고; X가 임의의 아미노산인 서열 모티프 ZZXX를 포함하는 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 하이드로포빈은 조성물의 총 중량의 0.001 중량% 내지 5 중량%의 농도로 존재하는 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 하이드로포빈은 조성물의 총 중량의 0.01 중량% 내지 0.5 중량%의 농도로 존재하는 조성물.

청구항 33

제4항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 세제는 0.001 내지 5 g/L의 농도로 존재하는 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 세제는 0.01 내지 0.5 g/L의 농도로 존재하는 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 프로테아제, 아밀라아제, 글루코아밀라아제, 말토스 생성

(maltogenic) 아밀라아제, 말토스 비생성(non-maltogenic) 아밀라아제, 리파아제, 큐티나아제, 카보하이드라아제, 셀룰라아제, 펙티나아제, 만난아제, 아라비나아제, 갈락타나아제, 자일라나아제, 옥시다아제, 락카아제 및 퍼옥시다아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소를 추가로 함유하는 조성물.

청구항 36

제4항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 세제는 하나 이상의 계면활성제를 포함하는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 계면활성제는 비이온성 (반극성을 포함함), 음이온성, 양이온성 및 썬비터이온성 계면활성제로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 분말 형태의 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 형태의 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 조성물과 표면을 접촉시키는 단계에 의해 지질-기재 얼룩(stain)을 표면으로부터 제거하는 방법.

청구항 41

지질 얼룩을 표면으로부터 감소시키거나 또는 제거하기 위한 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

청구항 42

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 조성물과 표면을 접촉시키는 단계를 포함하는, 표면을 세정하는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 조성물과 물품을 접촉시키는 단계를 포함하는, 물품을 세정하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 물품은 의류 물품인 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 물품은 식탁용 식기류 물품인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 조성물에 관한 것이지만, 이는 특별히 배타적으로 세제로 사용하기 위한 것은 아니다. 또한 본 발명은 표면 및 물품, 예를 들어 의류 물품 및 식탁용 식기류 물품을 본 조성물을 사용하여 세정하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 문헌[Wösten, *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 625-646]에 기재된 바와 같이, 일반적으로 하이드로포빈은 사상균(filamentous fungi)의 성장 및 발달에 있어서 광범위한 역할을 하는 진균류 기원의 단백질이다. 예를 들어, 하이드로포빈은 기중 구조체(aerial structure)의 형성에 그리고 소수성 표면에서의 군사의 부착에 연루되어 있다.

- [0003] 하이드로포빈이 그의 기능을 수행하는 기작은 소수성-친수성 계면 (특히 공기-물 계면)에서 양친매성 필름으로 자기-조립되는 그의 특성을 기반으로 한다.
- [0004] 전형적으로, 하이드로포빈은 클래스 I 및 II로 분류된다. 본 명세서에 더욱 상세하게 기재된 바와 같이, 클래스 II 하이드로포빈의 조립된 양친매성 필름은 실온에서 일련의 용매에 재용해될 수 있다 (그러나 상기 용매는 특별히 배타적으로 수성 에탄올인 것은 아니다). 이와는 대조적으로, 클래스 I 하이드로포빈의 조립된 양친매성 필름은 훨씬 덜 용해성이어서, 단지 강산, 예를 들어 트라이플루오로아세트산 또는 포름산에 재용해된다.
- [0005] 하이드로포빈을 함유하는 세제 조성물은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2009/0101167호 (국제특허 공개 WO 2007/014897호에 대응)에는 텍스타일 세척에 있어서의 하이드로포빈, 특히 융합 하이드로포빈의 사용과 이를 함유하는 세척 조성물이 개시되어 있다.
- [0006] 더욱 적은 양으로 사용될 수 있고 이럼으로써 환경에 대한 영향을 최소화시킬 수 있는 계면활성제를 함유하는 세제 조성물에 대한 필요성이 본 기술 분야에 남아 있다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명의 일 태양에 따르면, 하기를 포함하는 조성물이 제공된다:
- [0008] (a) 지방 분해 효소; 및
- [0009] (b) 본 명세서에 정의된 하이드로포빈.
- [0010] 본 발명의 다른 태양에 따르면, 하기를 포함하는 조성물이 제공된다:
- [0011] (a) 지방 분해 효소;
- [0012] (b) 본 명세서에 정의된 하이드로포빈; 및
- [0013] (c) 세제.
- [0014] 본 발명의 일 태양에 따르면, 하기를 포함하는 조성물이 제공된다:
- [0015] (a) G가 글라이신이고 X가 옥시음이온 구멍(oxyanion hole)-형성 아미노산 잔기인 GX 지방 분해 효소로서, abH23, abH25 및 abH15로 이루어진 군으로부터 선택되는 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리(superfamily)에 속하는 GX 지방 분해 효소; 및(b) 본 명세서에 정의된 하이드로포빈.
- [0016] 본 발명의 다른 태양에 따르면, 하기를 포함하는 조성물이 제공된다:
- [0017] (a) G가 글라이신이고 X가 옥시음이온 구멍-형성 아미노산 잔기인 GX 지방 분해 효소;
- [0018] (b) 본 명세서에 정의된 하이드로포빈; 및
- [0019] (c) 세제.
- [0020] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 표면을 본 명세서에 정의된 조성물과 접촉시키는 단계에 의해 지질-기재 얼룩(stain)을 표면으로부터 제거하는 방법이 제공된다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 지질 얼룩을 표면으로부터 감소시키거나 또는 제거하기 위한 본 명세서에 정의된 조성물의 용도가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 추가의 태양에 따르면, 표면을 본 명세서에 정의된 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 표면을 세정하는 방법이 제공된다.
- [0023] 본 발명의 추가의 태양에 따르면, 물품, 특히 의류 물품 또는 식탁용 식기류 물품을 세정하는 방법이 제공되며, 이는 상기 물품을 본 명세서에 정의된 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0024] 이전
- [0025] 놀랍게도, 하이드로포빈, 지방 분해 효소 및 선택적으로 세제의 조합물이 표면, 예를 들어 텍스타일, 의류 또는 식탁용 식기류 표면으로부터 지성 오염물(oily soil)을 제거할 수 있음이 밝혀졌는데; 이러한 오염물을 기존의 상업적 세제를 사용하여 제거하는 것은 일반적으로 문제가 많다. 이러한 효과는 세척 조성물에 본 조합물을 사용할 가능성을 부여한다.

[0026] 특히, 놀랍게도, 하이드로포빈과, 상기에 언급된 abH 수퍼패밀리로부터 선택되는 GX 지방 분해 효소의 조합물이, 단독으로 사용될 때의 이들 단백질 중 어느 하나의 상가 효과에서 예상되는 것보다 크게 향상된 세정 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌다. 이들 특성은 본 조합물을 세척 조성물에서의 세제의 대체재로 사용하고 이럼으로써 이러한 조성물의 환경 영향을 최소화하는 가능성을 부여한다.

[0027] 또한, 놀랍게도 하이드로포빈, GX 지방 분해 효소 및 세제의 조합물이, 단독으로 사용될 때의 이들 세 성분 중 임의의 것의 상가 효과에서 예상되는 것보다 크게 향상된 세정 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌다. 이들 특성은 본 조합물을 세척 조성물에서 필요한 세제의 양을 최소화하고 이럼으로써 이러한 조성물의 환경 영향을 최소화 하기 위하여 사용하는 가능성을 부여한다.

도면의 간단한 설명

[0028] <도 1a>

도 1a는 열불활성화 액체 세제 아리엘(ARIEL)TM 컬러(Color)의 존재 하에, 그러나 지방 분해 효소의 부재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 얼룩 제거 지수(Stain Removal index; SRI)의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 1b>

도 1b는 열불활성화 액체 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에, 그러나 지방 분해 효소의 부재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 1c>

도 1c는 열불활성화 분말 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에, 그러나 지방 분해 효소의 부재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 2a>

도 2a는 지방 분해 효소 리펙스(LIPEX)TM 및 열불활성화 액체 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 2b>

도 2b는 지방 분해 효소 리펙스TM 및 열불활성화 액체 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 2c>

도 2c는 지방 분해 효소 리펙스TM 및 열불활성화 분말 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 2d>

도 2d는 지방 분해 효소 리펙스TM 및 열불활성화 분말 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 2e>

도 2e는 지방 분해 효소 리펙스TM의 존재 하에 그러나 세제의 부재 하에 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 3a>

도 3a는 지방 분해 효소 리포맥스(LIPOMAX)TM 및 열불활성화 액체 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 3b>

도 3b는 지방 분해 효소 리포맥스TM 및 열불활성화 액체 세제 아리엘TM 컬러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 3c>

도 3c는 지방 분해 효소 리포맥스™ 및 열불활성화 분말 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 3d>

도 3d는 지방 분해 효소 리포맥스™ 및 열불활성화 분말 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 3e>

도 3e는 지방 분해 효소 리포맥스™의 존재 하에 그러나 세제의 부재 하에 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 4a>

도 4a는 지방 분해 효소 SprLip2 및 열불활성화 액체 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 4b>

도 4b는 지방 분해 효소 SprLip2 및 열불활성화 액체 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 4c>

도 4c는 지방 분해 효소 SprLip2 및 열불활성화 분말 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 4d>

도 4d는 지방 분해 효소 SprLip2 및 열불활성화 분말 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 4e>

도 4e는 지방 분해 효소 SprLip2의 존재 하에 그러나 세제의 부재 하에 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 5a>

도 5a는 지방 분해 효소 TfuLip2 및 열불활성화 액체 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 5b>

도 5b는 지방 분해 효소 TfuLip2 및 열불활성화 액체 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 5c>

도 5c는 지방 분해 효소 TfuLip2 및 열불활성화 분말 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 하이드로포빈 농도에서의 세제 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 5d>

도 5d는 지방 분해 효소 TfuLip2 및 열불활성화 분말 세제 아리엘™ 켈러의 존재 하에 다양한 특정 세제 농도에서의 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 5e>

도 5e는 지방 분해 효소 TfuLip2의 존재 하에 그러나 세제의 부재 하에 하이드로포빈 농도의 함수로서의 SRI의 변화율 (%)을 나타내며;

<도 6>

도 6은 서열 번호 1의, 하이드로포빈 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) HFBII (Y11894.1)를 코딩하는 DNA 서열을 나타내며;

<도 7>

도 7은 서열 번호 2의, 하이드로포빈 트리코데르마 레에세이 HFBII (P79073.1)의 아미노산 서열을 나타내며;

<도 8>

도 8은 서열 번호 3의, 하이드로포빈 트리코데르마 레에세이 HFBI (Z68124.1)을 코딩하는 DNA 서열을 나타내며;

<도 9>

도 9는 서열 번호 4의, 하이드로포빈 트리코데르마 레에세이 HFBI (P52754.1)의 아미노산 서열을 나타내며;

<도 10>

도 10은 서열 번호 5의, 하이드로포빈 쉬조필름 콤문(*Schizophyllum commune*) SC3 (M32329.1)을 코딩하는 DNA 서열을 나타내며;

<도 11>

도 11은 서열 번호 6의, 하이드로포빈 쉬조필름 콤문 SC3 (AAA96324.1)의 아미노산 서열을 나타내며;

<도 12>

도 12는 서열 번호 7의, 하이드로포빈 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) EAS (X67339.1)를 코딩하는 DNA 서열을 나타내며;

<도 13>

도 13은 서열 번호 8의, 하이드로포빈 뉴로스포라 크라사 EAS (AAB24462.1)의 아미노산 서열을 나타내며;

<도 14>

도 14는 서열 번호 9의, 탈라로마이세스 서모필루스(*Talaromyces thermophilus*) TT1 (전구체형 TT1 하이드로포빈을 코딩하는 DNA 서열, 미국 특허 제7241734호의 서열 번호 4)을 나타내며;

<도 15>

도 15는 서열 번호 10의, 탈라로마이세스 서모필루스 TT1 (전구체형 TT1 하이드로포빈의 아미노산 서열, 미국 특허 제7241734호의 서열 번호 3)을 나타내며;

<도 16>

도 16은 서열 번호 11의, 리팩스™의 성숙 아미노산 서열을 나타내며;

<도 17>

도 17은 서열 번호 12의, 볼드체로 나타낸 신호 서열을 포함하는 SprLip2 (스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스(*Streptomyces pristinaespiralis*) ATCC 25486 Uniprot B5H9Q8, NCBI: ZP_06912654.1)의 전 아미노산 서열을 나타내며;

<도 18>

도 18은 서열 번호 13의, 푸사륨 헤테로스포룸(*Fusarium heterosporum*) 포스포리파아제 (국제특허 공개 WO 2005/087918호에 개시되어 있으며 다니스코 에이/에스(Danisco A/S)로부터 그라인드아밀 파워베이크(GRINDAMYL POWERBAKE) 4100™으로 입수가 가능함)의 성숙 아미노산 서열을 나타내며;

<도 19>

도 19는 서열 번호 29의, 국제특허 공개 WO 98/45453호에 개시된 리파아제 3의 전 아미노산 서열을 나타내고, 잔기 1 내지 270은 본 명세서에서 서열 번호 14의 서열로 칭해지는 성숙 서열을 포함하며;

<도 19a>

도 19a는 서열 번호 14의, 리파아제 3의 성숙 아미노산 서열을 나타내며;

<도 20>

도 20은 서열 번호 15의, 리포맥스™의 성숙 아미노산 서열을 나타내며;

<도 21>

도 21은 서열 번호 16의, TfuLip2의 성숙 아미노산 서열을 나타내며;

<도 22>

도 22는 서열 번호 17의, SprLip2의 성숙 아미노산 서열을 나타내며;

<도 23>

도 23은 서열 번호 18의, 리팩스의 전 아미노산 서열을 나타내고, 이는 신호 서열 (아미노산 잔기 1 내지 17), 프로펩티드 (아미노산 잔기 18 내지 22) 및 성숙 서열 (아미노산 잔기 23 내지 291 - 도 16에 서열 번호 11로 나타냄)을 포함하며;

<도 24>

도 24는 서열 번호 19의, 리포맥스의 전 아미노산 서열을 나타내고, 이는 신호 서열 (아미노산 잔기 1 내지 24) 및 성숙 서열 (아미노산 잔기 25 내지 313 - 도 20에 서열 번호 15로 나타냄)을 포함하며;

<도 25>

도 25는 서열 번호 20의, TfuLip2의 전 아미노산 서열을 나타내고, 이는 신호 서열 (아미노산 잔기 1 내지 40) 및 성숙 서열 (아미노산 잔기 41 내지 301 - 도 21에 서열 번호 16으로 나타냄)을 포함하며;

<도 26>

도 26은 국제특허 공개 WO 2005/087918호에 개시된 푸사륨 헤테로스포룸 CBS 782.83 (야생형) 유래의 지방 분해 효소의 서열 번호 21의 단백질 프리프로서열(preprosequence)을 나타내며, 상기 프리프로서열은 상기 효소의 성숙 형태가 바람직하게는 도 18에 서열 번호 13으로 나타낸 효소를 포함하도록 번역 변형을 겪고; 일부 숙주 유기체에서, 상기 단백질은 다수의 추가의 아미노산이 N 또는 C 말단에 부가되도록 N-말단 프로세싱될 수 있으며;

<도 27>

도 27은 서열 번호 22의, 합성 *SprLip2* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 나타내며;

<도 28>

도 28은 서열 번호 23의, 발현 플라스미드 pZQ205 유래의 *SprLip2* 유전자의 뉴클레오티드 서열을 나타내며 (celA 신호 서열은 밑줄이 그어져 있음);

<도 29>

도 29는 서열 번호 24의, 플라스미드 pZQ205로부터 생성된 *SprLip2*의 아미노산 서열을 나타내며 (신호 서열은 밑줄이 그어져 있음);

<도 30>

도 30은 pZQ205 발현 벡터의 플라스미드 지도를 나타내며;

<도 31>

도 31은 *SprLip2*에 의한 pNB의 가수분해를 나타내며;

<도 32>

도 32는 *SprLip2*에 의한 pNPP의 가수분해를 나타내며;

<도 33>

도 33은 세제의 부재 하에서의 *SprLip2*에 의한 트라이옥타노에이트의 가수분해를 나타내며;

<도 34>

도 34는 세제의 존재 하에서의 SprLip2에 의한 트라이옥타노에이트의 가수분해를 나타내며;

<도 35>

도 35는 세제의 존재 및 부재 하에서의 SprLip2의 성능을 나타내며;

<도 36>

도 36은 서열 번호 25의, NCBI 데이터베이스에서 등록 번호 JC8061로 입수가 가능한 지오바실러스 스테아로써모필루스(*Geobacillus stearothermophilus*) 주 T1 (GeoT1) 유래의 리파아제의 아미노산 서열을 나타내며 (신호 서열은 밑줄이 그어져 있음);

<도 37>

도 37은 서열 번호 26의, BCE-GeoT1 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타내고, 상기 융합 단백질은 서열 번호 25의 서열과, 박테리아 셀룰라아제의 촉매 도메인의 카르복시 말단의 융합물이며;

<도 38>

도 38은 서열 번호 27의, 젠뱅크(GENBANK) 등록 번호 P37957로 입수가 가능한, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 168 (LipA) 유래의 리파아제의 아미노산 서열을 나타내며 (신호 서열은 밑줄이 그어져 있음);

<도 39>

도 39는 서열 번호 28의, BCE-LipA 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타내고, 상기 융합 단백질은 서열 번호 27의 서열과, 박테리아 셀룰라아제의 촉매 도메인의 카르복시 말단의 융합물이며;

<도 40>

도 40은 서열 번호 30의, BamHI 부위 앞의 NsiI-MluI-HpaI 효소 제한 부위의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 하이드로포빈
- [0030] 본 명세서에서, 용어 "하이드로포빈"은 친수성/소수성 계면에서 자기-조립이 가능한 그리고 하기 화학식 I을 갖는 폴리펩티드를 의미하는 것으로 정의된다:
- [0031] [화학식 I]
- [0032] $(Y_1)_n-B_1-(X_1)_a-B_2-(X_2)_b-B_3-(X_3)_c-B_4-(X_4)_d-B_5-(X_5)_e-B_6-(X_6)_f-B_7-(X_7)_g-B_8-(Y_2)_m$
- [0033] 여기서,
- [0034] m 및 n은 독립적으로 0 내지 2000이며;
- [0035] B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 이상은 Cys이며;
- [0036] X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, Y₁ 및 Y₂는 독립적으로 임의의 아미노산을 나타내고;
- [0037] a는 1 내지 50이며;
- [0038] b는 0 내지 5이고;
- [0039] c는 1 내지 100이며;
- [0040] d는 1 내지 100이고;
- [0041] e는 1 내지 50이며;
- [0042] f는 0 내지 5이고;
- [0043] g는 1 내지 100이다.

- [0044] 적합하게는, 하이드로포빈은 하이드로포빈 코어 내에 40 내지 120개의 아미노산의 서열을 갖는다. 더 바람직하게는, 하이드로포빈은 하이드로포빈 코어 내에 45 내지 100개의 아미노산의 서열을 갖는다. 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 하이드로포빈 코어 내에 50 내지 90개, 바람직하게는 50 내지 75개, 그리고 더 바람직하게는 55 내지 65개의 아미노산의 서열을 갖는다. 본 명세서에서, 어구 "하이드로포빈 코어"는 잔기 B₁로부터 시작하여 잔기 B₈로 종결되는 서열을 의미한다.
- [0045] 화학식 I에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 이상, 바람직하게는 7개 이상, 그리고 가장 바람직하게는 8개 전부가 Cys 이다.
- [0046] 화학식 I에서, 일 실시 형태에서 m은 적합하게는 0 내지 500, 바람직하게는 0 내지 200, 더 바람직하게는 0 내지 100, 더욱 더 바람직하게는 0 내지 20, 더욱 더 바람직하게는 0 내지 10, 더욱 더 바람직하게는 0 내지 5, 그리고 가장 바람직하게는 0이다.
- [0047] 화학식 I에서, 일 실시 형태에서 n은 적합하게는 0 내지 500, 바람직하게는 0 내지 200, 더 바람직하게는 0 내지 100, 더욱 더 바람직하게는 0 내지 20, 더욱 더 바람직하게는 0 내지 10, 그리고 가장 바람직하게는 0 내지 3이다.
- [0048] 화학식 I에서, a는 바람직하게는 3 내지 25, 더 바람직하게는 5 내지 15이다. 일 실시 형태에서, a는 5 내지 9 이다.
- [0049] 화학식 I에서, b는 바람직하게는 0 내지 2, 더 바람직하게는 0이다.
- [0050] 화학식 I에서, c는 바람직하게는 5 내지 50, 더 바람직하게는 5 내지 40이다. 일 실시 형태에서, c는 11 내지 39이다.
- [0051] 화학식 I에서, d는 바람직하게는 2 내지 35, 더 바람직하게는 4 내지 23이다. 일 실시 형태에서, d는 8 내지 23이다.
- [0052] 화학식 I에서, e는 바람직하게는 2 내지 15, 더 바람직하게는 5 내지 12이다. 일 실시 형태에서, e는 5 내지 9 이다.
- [0053] 화학식 I에서, f는 바람직하게는 0 내지 2, 더 바람직하게는 0이다.
- [0054] 화학식 I에서, g는 바람직하게는 3 내지 35, 더 바람직하게는 6 내지 21이다. 일 실시 형태에서, g는 6 내지 18 이다.
- [0055] 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈은 하기 화학식 II를 갖는다:
- [0056] [화학식 II]
- [0057] $(Y_1)_n-B_1-(X_1)_a-B_2-(X_2)_b-B_3-(X_3)_c-B_4-(X_4)_d-B_5-(X_5)_e-B_6-(X_6)_f-B_7-(X_7)_g-B_8-(Y_2)_m$
- [0058] 여기서,
- [0059] m 및 n은 독립적으로 0 내지 20이며;
- [0060] B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택 되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상은 Cys이며;
- [0061] a는 3 내지 25이고;
- [0062] b는 0 내지 2이며;
- [0063] c는 5 내지 50이고;
- [0064] d는 2 내지 35이며;
- [0065] e는 2 내지 15이고;
- [0066] f는 0 내지 2이며;
- [0067] g는 3 내지 35이다.

- [0068] 화학식 II에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상, 그리고 바람직하게는 8개 전부가 Cys이다.
- [0069] 더 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈은 하기 화학식 III을 갖는다:
- [0070] [화학식 III]
- [0071] $(Y_1)_n-B_1-(X_1)_a-B_2-B_3-(X_3)_c-B_4-(X_4)_d-B_5-(X_5)_e-B_6-B_7-(X_7)_g-B_8-(Y_2)_m$
- [0072] 여기서,
- [0073] m 및 n은 독립적으로 0 내지 20이며;
- [0074] B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Pro, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상은 Cys이며;
- [0075] a는 5 내지 15이고;
- [0076] c는 5 내지 40이며;
- [0077] d는 4 내지 23이고;
- [0078] e는 5 내지 12이며;
- [0079] g는 6 내지 21이다.
- [0080] 화학식 III에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상, 그리고 바람직하게는 8개가 Cys이다.
- [0081] 화학식 I, 화학식 II 및 화학식 III에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 또는 7개가 Cys일 때, 잔기 B₃ 내지 B₇은 Cys인 것이 바람직하다.
- [0082] 화학식 I, 화학식 II 및 화학식 III에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개가 Cys일 때, (a) B₁ 및 B₃ 내지 B₈은 Cys이고, B₂는 Cys 이외의 것이며; (b) B₁ 내지 B₇은 Cys이고, B₈은 Cys 이외의 것이며, (c) B₁은 Cys 이외의 것이고, B₂ 내지 B₈은 Cys인 것이 바람직하다. 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개가 Cys일 때, 다른 잔기는 Ser, Pro 또는 Leu인 것이 바람직하다. 일 실시 형태에서, B₁ 및 B₃ 내지 B₈은 Cys이며, B₂는 Ser이다. 다른 실시 형태에서, B₁ 내지 B₇은 Cys이며, B₈은 Leu이다. 추가의 실시 형태에서, B₁은 Pro이며, B₂ 내지 B₈은 Cys이다.
- [0083] 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈의 시스테인 잔기는 환원된 형태로 존재하거나 또는 임의의 가능한 조합으로 서로와 다이설파이드(-S-S-) 가교체를 형성할 수 있다. 특히 바람직한 일 실시 형태에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 8개 전부가 Cys일 때, 다이설파이드 가교체가 시스테인 잔기들의 하기 쌍들 중 하나 이상 (바람직하게는 2개 이상, 더 바람직하게는 3개 이상, 가장 바람직하게는 4개 전부) 사이에서 형성될 수 있다: B₁과 B₆; B₂와 B₅; B₃과 B₄; B₇과 B₈. 하나의 대안적인 바람직한 실시 형태에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 8개 전부가 Cys일 때, 다이설파이드 가교체가 시스테인 잔기들의 하기 쌍들 중 하나 이상 (바람직하게는 2개 이상, 더 바람직하게는 3개 이상, 가장 바람직하게는 4개 전부) 사이에서 형성될 수 있다: B₁과 B₂; B₃과 B₄; B₅와 B₆; B₇과 B₈.
- [0084] 본 발명에서 유용한 특정 하이드로포빈의 예에는 하기 간행물에 기재되고 예시된 것이 포함되며, 이들의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다: 문헌[Linder *et al.*, *FEMS Microbiology Rev.* 2005, 29, 877-896]; 문헌[Kubicek *et al.*, *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8, 4]; 문헌[Sunde *et al.*, *Micron*, 2008, 39, 773-784]; 문헌[Wessels, *Adv. Micr. Physiol.* 1997, 38, 1-45]; 문헌[Wösten, *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 625-646]; 문헌[Hektor and Scholtmeijer, *Curr. Opin. Biotech.* 2005, 16, 434-439]; 문헌[Szilvay *et al.*, *Biochemistry*, 2007, 46, 2345-2354]; 문헌[Kisko *et al.*, *Langmuir*, 2009, 25, 1612-1619]; 문헌[Blijdenstein, *Soft Matter*, 2010, 6, 1799-1808]; 문헌[Wösten *et al.*, *EMBO J.* 1994, 13, 5848-5854]; 문헌[Hakanpää *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 534-539]; 문헌[Wang *et al.*; *Protein Sci.*, 2004, 13, 810-821]; 문헌[De Vocht *et al.*, *Biophys. J.* 1998, 74, 2059-2068]; 문헌[Askolin *et al.*, *Biomacromolecules* 2006, 7, 1295-1301]; 문헌[Cox *et al.*; *Langmuir*, 2007, 23, 7995-8002]; 문헌[Linder *et al.*, *Biomacromolecules* 2001, 2, 511-517]; 문헌[Kallio *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 28733-28739];

문헌[Scholtmeijer *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56, 1-8]; 문헌[Lumsdon *et al.*, *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 44, 172-178]; 문헌[Palomo *et al.*, *Biomacromolecules* 2003, 4, 204-210]; 문헌[Kirkland and Keyhani, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, July 17 2010 (전자 출판)]; 문헌[Stübner *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.*, 30 June 2010 (전자 출판)]; 문헌[Laaksonen *et al.* *Langmuir*, 2009, 25, 5185-5192]; 문헌[Kwan *et al.* *J. Mol. Biol.* 2008, 382, 708-720]; 문헌[Yu *et al.* *Microbiology*, 2008, 154, 1677-1685]; 문헌[Lahtinen *et al.* *Protein Expr. Purif.*, 2008, 59, 18-24]; 문헌[Szilvay *et al.*, *FEBS Lett.*, 2007, 5811, 2721-2726]; 문헌[Hakanpää *et al.*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2006, 62, 356-367]; 문헌[Scholtmeijer *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 1367-1373]; 문헌[Yang *et al.*, *BMC Bioinformatics*, 2006, 7 Supp. 4, S16]; 국제특허 공개 WO 01/57066호; 국제특허 공개 WO 01/57528호; 국제특허 공개 WO 2006/082253호; 국제특허 공개 WO 2006/103225호; 국제특허 공개 WO 2006/103230호; 국제특허 공개 WO 2007/014897호; 국제특허 공개 WO 2007/087967호; 국제특허 공개 WO 2007/087968호; 국제특허 공개 WO 2007/030966호; 국제특허 공개 WO 2008/019965호; 국제특허 공개 WO 2008/107439호; 국제특허 공개 WO 2008/110456호; 국제특허 공개 WO 2008/116715호; 국제특허 공개 WO 2008/120310호; 국제특허 공개 WO 2009/050000호; 미국 특허 출원 공개 제2006/0228484호; 및 유럽 특허 제 2042156A호.

[0085] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 서열 번호 2, 4, 6, 8 또는 10의 서열로부터 선택되는 폴리펩티드, 또는 이의 임의의 것에 대하여 하이드로포빈 코어 내에서 서열 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 또는 99% 이상이고 하이드로포빈의 상기에 기재된 자기-조립 특성을 유지하는 폴리펩티드이다.

[0086] 하이드로포빈의 공급원

[0087] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 미생물로부터 수득되거나 또는 수득가능하다. 미생물은 바람직하게는 박테리아 또는 진균류, 더 바람직하게는 진균류일 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 하이드로포빈은 사상균으로부터 수득되거나 또는 수득가능하다.

[0088] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 담자균문 또는 자낭균문의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능하다.

[0089] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 클라도스포륨(*Cladosporium*)속 (특히 씨. 풀름(*C. fulvum*) 또는 씨. 헤르바룸(*C. herbarum*)), 오피스토마(*Ophistoma*)속 (특히 오. 울미(*O. ulmi*)), 크리폰넥트리아(*Cryphonectria*)속 (특히 씨. 파라시티카(*C. parasitica*)), 트리코데르마속 (특히 티. 하르지아눔(*T. harzianum*)), 티. 롱기브리치아툼(*T. longibrichiatum*)), 티. 아스페렐름, 티. 코닝기옵시스(*T. Koningiopsis*), 티. 아그레시븀(*T. aggressivum*)), 티. 스트로마티쿰(*T. stromaticum*) 또는 티. 레에세이), 지베렐라(*Gibberella*)속 (특히 지. 모닐리포르미스(*G. moniliiformis*)), 뉴로스포라(*Neurospora*)속 (특히 엔. 크라사), 마가나포르테(*Maganaporthe*)속 (특히 엠. 그리세아(*M. grisea*)), 하이포크레아(*Hypocrea*)속 (특히 에이치. 제코리나(*H. jecorina*)), 에이치. 아트로비리디스(*H. atroviridis*)), 에이치. 비렌스(*H. virens*) 또는 에이치. 릭시이(*H. lixii*)), 잔토리아(*Xanthoria*)속 (특히 엑스. 엑타노이데스(*X. ectanoides*)) 및 엑스. 파리에티나(*X. parietina*)), 에메리셀라(*Emericella*)속 (특히 이. 니둘란스(*E. nidulans*)), 아스페르길루스(*Aspergillus*)속 (특히 에이. 푸미가투스(*A. fumigatus*)), 에이. 오리자에(*A. oryzae*)), 파라코키오이데스(*Paracoccidioides*)속 (특히 피. 브라실리엔시스(*P. brasiliensis*)), 메타리지움(*Metarhizium*)속 (특히 엠. 아니소플라이에(*M. anisoplaie*)), 플레우로투스(*Pleurotus*)속 (특히 피. 오스트레아투스(*P. ostreatus*)), 코프리누스(*Coprinus*)속 (특히 씨. 시네레우스(*C. cinereus*)), 디코타이오네마(*Dicotyonema*)속 (특히 디. 글라브라툼(*D. glabratum*)), 플람물리나(*Flammulina*)속 (특히 에프. 벨루티페스(*F. velutipes*)), 쉬조필름속 (특히 에스. 콤문), 아가리쿠스(*Agaricus*)속 (특히 에이. 비스포루스(*A. bisporus*)), 피솔리투스(*Pisolithus*)속 (특히 피. 틴크토리우스(*P. tinctorius*)), 트리콜로마(*Tricholoma*)속 (특히 티. 테레움(*T. terreum*)), 폴리오카(*Pholioka*)속 (특히 피. 나메코(*P. nameko*)), 탈라로마이세스(*Talaromyces*)속 (특히 티. 서모필루스) 또는 아그로사이베(*Agrocybe*)속 (특히 에이. 아에게리타(*A. aegerita*)))의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능하다.

[0090] 분석

[0091] 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈의 하나의 특성으로는 친수성/소수성 계면에서의 하이드로포빈의 자기-조립 특성이 있다.

[0092] 본 발명의 정의에 따르면, 자기-조립은 단백질을 폴리테트라플루오로에틸렌 (테플론(TEFLON)(등록상표))에 흡착

시킴으로써 그리고 원편광 이색성(Circular Dichroism; CD)을 이용하여 새롭게 형성된 α -나선에 상응하는 CD 스펙트럼에서의 모티프의 출현에 의해 예시되는 이차 구조의 변화를 확립함으로써 검출될 수 있다 (문헌[De Vocht *et al.*, *Biophys. J.* 1998, 74, 2059-2068]). CD 스펙트럼 분석을 실시하는 전 절차는 문헌[Askolin *et al.* *Biomacromolecules*, 2006, 7, 1295-1301]에서 찾아볼 수 있다.

[0093] 일 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈은 계면에서의 표면 특성에 대한 그의 영향에 의해 특성화되지만, 상기 계면은 특별히 배타적으로 공기/물 계면인 것은 아니다. 표면 특성은 표면 장력 (특히 평형 표면 장력) 또는 표면 전단 리올로지(rheology), 특히 표면 전단 탄성 (저장 탄성률)일 수 있다.

[0094] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 물/공기 계면에서의 평형 표면 장력이 45 mN/m 미만, 바람직하게는 40 mN/m 미만, 그리고 더 바람직하게는 35 mN/m 미만으로 감소되게 할 수 있다. 이와는 대조적으로, 순수한 물의 표면 장력은 실온에서 72 mN/m이다. 전형적으로, 물/공기 계면에서의 평형 표면 장력의 이러한 감소는 5×10^{-8} M 내지 2×10^{-6} M, 더 바람직하게는 1×10^{-7} M 내지 1×10^{-6} M의 하이드로포빈 농도를 이용하여 성취될 수 있다. 전형적으로, 물/공기 계면에서의 평형 표면 장력의 이러한 감소는 0°C 내지 50°C의 범위의 온도, 특히 실온에서 성취될 수 있다. 평형 표면 장력의 변화는 문헌[Cox *et al.*, *Langmuir*, 2007, 23, 7995-8002]에 기재된 방법에 따라 장력계를 사용하여 측정될 수 있다.

[0095] 다른 실시 형태에서, 하이드로포빈은 물/공기 계면에서의 표면 전단 탄성이 300-700 mN/m, 바람직하게는 400-600 mN/m로 증가되게 할 수 있다. 전형적으로, 물/공기 계면에서의 이러한 표면 전단 탄성은 1×10^{-4} M 내지 0.01 M, 바람직하게는 5×10^{-4} M 내지 2×10^{-3} M, 특히 1×10^{-3} M의 하이드로포빈 농도를 이용하여 성취될 수 있다. 전형적으로, 물/공기 계면에서의 이러한 표면 전단 탄성은 0°C 내지 50°C의 범위의 온도, 특히 실온에서 성취될 수 있다. 평형 표면 장력의 변화는 문헌[Cox *et al.*, *Langmuir*, 2007, 23, 7995-8002]에 기재된 방법에 따라 유량계를 사용하여 측정될 수 있다.

[0096] 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈은 생물계면활성제이다. 생물계면활성제는 살아 있는 세포에 의해 합성되는 표면 활성 물질이다. 생물계면활성제는 표면 장력을 감소시키는 특성, 에멀전을 안정화시키는 특성, 발포를 촉진하는 특성을 가지며, 일반적으로 비독성이고 생분해성이다.

[0097] 본 발명의 조성물에서 유용한 특정 하이드로포빈의 예가 하기 표 1에 열거되어 있다.

표 1

유기체	유전자, 단백질명	NCBI 접근 암호 및 버전 번호
아가리쿠스 비스포루스	ABH3	Y14602.1
아가리쿠스 비스포루스	HYPB	Y15940.1
아스페르길루스 푸미가투스	HYP1/RODA	L25258.1, U06121.1
아스페르길루스 푸미가투스	RODB	AY057385.1
아스페르길루스		
니게르(<i>Aspergillus niger</i>)	A_NIG1	XM_001394993.1
아스페르길루스 오리자에	HYPB	AB097448.1
아스페르길루스 오리자에	ROLA	AB094496.1
아스페르길루스		
테레우스(<i>Aspergillus terreus</i>)	A_TER	XM_001213908.1
클라도스포룸 풀룸	HCF-5	AJ133703.1
클라도스포룸 풀룸	HCF-6	AJ251294.1
클라도스포룸 풀룸	HCF-3	AJ566186.1
클라도스포룸 풀룸	HCF-1	X98578.1
클라도스포룸 풀룸	HCF-2	AJ133700.1
클라도스포룸 풀룸	HCF-4	AJ566187.1
클라도스포룸 헤르바룸	HCH-1	AJ496190.1
클라비셉스		
푸시포르미스(<i>Claviceps fusiformis</i>)	CFTH1_I-III	AJ133774.1
클라비셉스 푸시포르미스	CLF	CAB61236.1
클라비셉스		
푸르푸레아(<i>Claviceps purpurea</i>)	CLP	CAD10781.1
클라비셉스 푸르푸레아	CPPH1_I-V	AJ418045.1
코프리누스 시네레우스	COH1	Y10627.1
코프리누스 시네레우스	COH2	Y10628.1
크리포넥트리아 파라시티카	CRP	L09559.1
딕티오네마		
글라브라툼(<i>Dictyonema</i>)	DGH3	AJ320546.1

[0098]

<i>glabratum</i>)		
딕티오네마 글라브라툼	DGH2	AJ320545.1
딕티오네마 글라브라툼	DGH1	AJ320544.1
에메리셀라 니들란스	RODA	M61113.1
에메리셀라 니들란스	DEWA	U07935.1
플람볼리나 벨루티페스	FVH1	AB026720.1
플람볼리나 벨루티페스	FvHYD1	AB126686.1
지베렐라 모닐리포르미스	HYD5, GIM	AY158024.1
지베렐라 모닐리포르미스	HYD4	AY155499.1
지베렐라 모닐리포르미스	HYD1	AY155496.1
지베렐라 모닐리포르미스	HYD2	AY155497.1
지베렐라 모닐리포르미스	HYD3	AY155498.1
지베렐라 제아에(<i>Gibberella zeae</i>)	GiZ, FG01831.1	XP_382007.1
렌티놀라 에도데스(<i>Lentinula edodes</i>)	Le.HYD1	AF217807.1
렌티놀라 에도데스	Le.HYD2	AF217808.1
마그나포르테		
그리세아(<i>Magnaporthe grisea</i>)	MGG4	XM_364289.1
마그나포르테 그리세아	MGG2	XM_001522792.1
마그나포르테 그리세아	MHP1, MGG1	AF126872.1
마그나포르테 그리세아	MPG1	L20685.2
메타리지움		
아니소플리아에(<i>Metarhizium anisopliae</i>)	SSGA	M85281.1
뉴로스포라 크라사	NCU08192.1	AABX01000408.1
뉴로스포라 크라사	EAS	AAB24462.1
오파오스토마 울미	Cu	U00963.1
파라쿠시디오이데스		
브라실렌시스(<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	PbHYD2	AY427793.1
파라쿠시디오이데스		
브라실렌시스	PbHYD1	AF526275.1
파살로라 풀바(<i>Passalora fulva</i>)	PF3	CAC27408.1
파살로라 풀바	PF1	CAC27407.1
파살로라 풀바	PF2	CAB39312.1
폴리오타 나메코(<i>Pholiota</i>)	PNH2	AB079129.1

[0099]

<i>nameko</i>		
폴리오타 나메코	PNH1	AB079128.1
피슬리투스 토크토리우스	HYDPt-1	U29605.1
피슬리투스 토크토리우스	HYDPt-2	U29606.1
피슬리투스 토크토리우스	HYDPt-3	AF097516.1
플레우로투스 오스트레아투스	POH2	Y14657.1
플레우로투스 오스트레아투스	POH3	Y16881.1
플레우로투스 오스트레아투스	VMH3	AJ238148.1
플레우로투스 오스트레아투스	POH1	Y14656.1
플레우로투스 오스트레아투스	FBH1	AJ004883.1
쉬조필룸 콤포	SC4	M32330.1
쉬조필룸 콤포	SC1, 1G2	X00788.1
쉬조필룸 콤포	SC6	AJ007504.1
쉬조필룸 콤포	SC3	AAA96324.1
탈라로마이세스 서모필루스	TT1	
트리코테르마 하르시아눔	QID3	X71913.1
트리코테르마 하르시아눔	SRH1	Y11841.1
트리코테르마 레에세이	HFBH	P79073.1
트리코테르마 레에세이	HFB1	P52754.1
트리콜로마 테레움	HYD1	AY048578.1
베르티실리움		
달리아에(<i>Verticillium dahliae</i>)	VED	AAAY89101.1
잔토리아		
엑타네오이데스(<i>Xanthoria</i> <i>ectaneoides</i>)	XEH1	AJ250793.1
잔토리아 파리에티나	XPH1	AJ250794.1

[0100]

[0101] 융합 단백질

[0102] 본 발명의 맥락에서 하이드로포빈의 정의는 하이드로포빈과 다른 분자, 예를 들어 다당류의 콘주게이트 (conjugate) 뿐만 아니라 하이드로포빈과 다른 폴리펩티드의 융합 단백질도 포함한다.

[0103] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 하이드로포빈 융합 단백질이다. 본 명세서에서, 어구 "융합 단백질"은 하이드로포빈에서 천연적으로 나타나는 것이 아닌 추가의 펩티드 서열 (본 명세서에서 "융합 파트너"로 기재됨)에 결합된 하이드로포빈 서열 (상기에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.

[0104] 일 실시 형태에서, 융합 파트너는 하이드로포빈 코어의 아미노 말단에 결합되고 이럼으로써 기 $(Y_1)_m$ 을 형성할 수 있다. 이 실시 형태에서, m은 1 내지 2000, 바람직하게는 2 내지 1000, 더 바람직하게는 5 내지 500, 더욱 더 바람직하게는 10 내지 200, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 100의 범위일 수 있다.

[0105] 일 실시 형태에서, 융합 파트너는 하이드로포빈 코어의 카르복실 말단에 결합되고 이럼으로써 기 $(Y_2)_n$ 을 형성할 수 있다. 이 실시 형태에서, n은 1 내지 2000, 바람직하게는 2 내지 1000, 더 바람직하게는 5 내지 500, 더욱 더 바람직하게는 10 내지 200, 더욱 더 바람직하게는 20 내지 100의 범위일 수 있다.

[0106] 다른 실시 형태에서, 융합 파트너는 하이드로포빈 코어의 아미노 말단 및 카르복실 말단 둘 모두에 결합될 수 있다. 이 실시 형태에서, 융합 파트너는 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 바람직하게는 m 및 n의 바람직한 값으로 상기에 정의된 수의 아미노산을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0107] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 융합 단백질이 아니며, m 및 n은 0이다.

[0108] 클래스 I 및 II의 하이드로포빈

[0109] 본 기술 분야에서, 하이드로포빈은 클래스 I 및 II로 분류된다. 클래스 I 및 II의 하이드로포빈은 용해도를 비롯하여 다수의 이유로 구별될 수 있음이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 하이드로포빈은 계면 (특히, 물/공기 계면)에서 양친매성 계면 필름으로 자기-조립된다. 클래스 I 하이드로포빈의 상기 조립된 양친매성 필름은 일반적으로 단지 강산 (전형적으로, pK_a 가 4 미만인 것, 예를 들어 포름산 또는 트라이플루오로아세트산)에 재가용화되며, 반면에, 클래스 II의 것은 더욱 넓은 범위의 용매에 용해성이다.

[0110] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 클래스 II 하이드로포빈이다. 다른 실시 형태에서, 하이드로포빈은 클래스 I 하이드로포빈이다.

[0111] 일 실시 형태에서, 어구 "클래스 II 하이드로포빈"은 물/공기 계면에서 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖는 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미하며, 상기 조립된 양친매성 필름은 실온에서 수성 에탄올 용액 (60% (v/v))에서 0.1% (w/w) 이상의 농도로 재용해될 수 있다. 이와는 대조적으로, 이 실시 형태에서, 어구 "클래스 I 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖지만 이러한 특정한 재용해 특성은

갖지 않는 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.

- [0112] 다른 실시 형태에서, 어구 "클래스 II 하이드로포빈"은 물/공기 계면에서 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖는 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미하며, 상기 조립된 양친매성 필름은 실온에서 수성 소듐 도데실 설페이트 용액 (2% (w/w))에서 0.1% (w/w) 이상의 농도로 재용해될 수 있다. 이와는 대조적으로, 이 실시 형태에서, 어구 "클래스 I 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖지만 이러한 특정한 재용해 특성은 갖지 않는 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.
- [0113] 클래스 I 및 II의 하이드로포빈은 또한 하이드로포빈 단백질의 다수의 영역의 소수성/친수성에 의해 구별될 수 있다.
- [0114] 일 실시 형태에서, 어구 "클래스 II 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 가지며 잔기 B₃과 잔기 B₄ 사이의 영역, 즉 모이어티 (X₃)_c가 주로 소수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다. 이와는 대조적으로, 이 실시 형태에서, 어구 "클래스 I 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖지만 잔기 B₃과 잔기 B₄ 사이의 영역, 즉 기 (X₃)_c이 주로 친수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.
- [0115] 일 실시 형태에서, 어구 "클래스 II 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 가지며 잔기 B₇과 잔기 B₈ 사이의 영역, 즉 모이어티 (X₇)_g가 주로 소수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다. 이와는 대조적으로, 이 실시 형태에서, 어구 "클래스 I 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖지만 잔기 B₇과 잔기 B₈ 사이의 영역, 즉 모이어티 (X₇)_g가 주로 친수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.
- [0116] 하이드로포빈 단백질의 다양한 영역들의 상대적인 소수성/친수성은 문헌[Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 1982, 157, 105-132]에 기술된 방법을 이용하여 하이드로포빈의 소수도(hydropathy) 패턴을 비교함으로써 확립될 수 있다. 이 참고 문헌의 교시에 따르면, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 단백질의 아미노산 서열을 따라 단백질의 친수성 및 소수성을 계속해서 평가할 수 있다. 이 목적을 위하여, 상기 방법은 소수도 척도 (문헌으로부터 유래된 다수의 실험적 관찰에 기초함)를 이용하여 20개 아미노산 측쇄들 각각의 친수성 및 소수성 특성을 비교한다. 상기 프로그램은 이동-절편 접근법을 이용하며, 상기 접근법은 소정 길이의 절편 내에서 이것이 서열을 통하여 진행할 때 평균 소수도를 계속적으로 결정한다. 연속 스코어들을 아미노 말단으로부터 카복시 말단으로 도시한다. 이와 동시에, 중심점 선이 인쇄되며, 이는 대부분의 서열결정된 단백질에서 발견되는 아미노산 조성들의 소수도의 대평균(grand average)에 상응한다. 상기 방법이 하이드로포빈에 대하여 문헌[Wessels, *Adv. Microbial Physiol.* 1997, 38, 1-45]에 추가로 기재되어 있다.
- [0117] 일 실시 형태에서, 어구 "클래스 II 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 가지며 잔기 B₃과 잔기 B₄ 사이의 영역, 즉 모이어티 (X₃)_c가 주로 소수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다. 이와는 대조적으로, 이 실시 형태에서, 어구 "클래스 I 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖지만 잔기 B₃과 잔기 B₄ 사이의 영역, 즉 기 (X₃)_c이 주로 친수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.
- [0118] 일 실시 형태에서, 어구 "클래스 II 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 가지며 잔기 B₇과 잔기 B₈ 사이의 영역, 즉 모이어티 (X₇)_g가 주로 소수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다. 이와는 대조적으로, 이 실시 형태에서, 어구 "클래스 I 하이드로포빈"은 상기에 기재된 자기-조립 특성을 갖지만 잔기 B₇과 잔기 B₈ 사이의 영역, 즉 모이어티 (X₇)_g가 주로 친수성인 하이드로포빈 (본 명세서에 정의되고 예시된 바와 같음)을 의미한다.
- [0119] 하이드로포빈 단백질의 다양한 영역들의 상대적인 소수성/친수성은 문헌[Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 1982, 157, 105-132]에 기술된 그리고 문헌[Wessels, *Adv. Microbial Physiol.* 1997, 38, 1-45]에 하이드로포빈에 대하여 설명된 방법을 이용하여 하이드로포빈의 소수도 패턴을 비교함으로써 확립될 수 있다.
- [0120] 클래스 II 하이드로포빈은 또한 그의 보존된 서열을 특징으로 할 수 있다.
- [0121] 일 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 클래스 II 하이드로포빈은 하기 화학식 IV를 갖는다:

- [0122] [화학식 IV]
- [0123] $(Y_1)_n-B_1-(X_1)_a-B_2-B_3-(X_3)_c-B_4-(X_4)_d-B_5-(X_5)_e-B_6-B_7-(X_7)_g-B_8-(Y_2)_m$
- [0124] 여기서,
- [0125] m 및 n은 독립적으로 0 내지 200이며;
- [0126] B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu, Ala, Ser, Thr, Met 또는 Gly으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 6개 이상은 Cys이며;
- [0127] a는 6 내지 12이고;
- [0128] c는 8 내지 16이며;
- [0129] d는 2 내지 20이고;
- [0130] e는 4 내지 12이며;
- [0131] g는 5 내지 15이다.
- [0132] 화학식 IV에서, a는 바람직하게는 7 내지 11이다.
- [0133] 화학식 IV에서, c는 바람직하게는 10 내지 12, 더 바람직하게는 11이다.
- [0134] 화학식 IV에서, d는 바람직하게는 4 내지 18, 더 바람직하게는 4 내지 16이다.
- [0135] 화학식 IV에서, e는 바람직하게는 6 내지 10, 더 바람직하게는 9 또는 10이다.
- [0136] 화학식 IV에서, g는 바람직하게는 6 내지 12, 더 바람직하게는 7 내지 10이다.
- [0137] 일 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 클래스 II 하이드로포빈은 하기 화학식 V를 갖는다:
- [0138] [화학식 V]
- [0139] $(Y_1)_n-B_1-(X_1)_a-B_2-B_3-(X_3)_c-B_4-(X_4)_d-B_5-(X_5)_e-B_6-B_7-(X_7)_g-B_8-(Y_2)_m$
- [0140] 여기서,
- [0141] m 및 n은 독립적으로 0 내지 10이며;
- [0142] B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇ 및 B₈은 각각 독립적으로 Cys, Leu 또는 Ser으로부터 선택되는 아미노산이고, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상은 Cys이며;
- [0143] a는 7 내지 11이고;
- [0144] c는 11이며;
- [0145] d는 4 내지 18이고;
- [0146] e는 6 내지 10이며;
- [0147] g는 7 내지 10이다.
- [0148] 화학식 IV 및 화학식 V에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개 이상, 그리고 바람직하게는 8개 전부가 Cys이다.
- [0149] 화학식 IV 및 화학식 V에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개가 Cys일 때, 잔기 B₃ 내지 B₇은 Cys인 것이 바람직하다.
- [0150] 화학식 IV 및 화학식 V에서, 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개가 Cys일 때, (a) B₁ 및 B₃ 내지 B₈은 Cys이고, B₂는 Cys 이외의 것이며; (b) B₁ 내지 B₇은 Cys이고, B₈은 Cys 이외의 것이거나, 또는 (c) B₁은 Cys 이외의 것이고, B₂ 내지 B₈은 Cys인 것이 바람직하다. 잔기 B₁ 내지 B₈ 중 7개가 Cys일 때, 다른 잔기는 Ser, Pro 또는 Leu인 것이 바람직하다. 일 실시 형태에서, B₁ 및 B₃ 내지 B₈은 Cys이며, B₂는 Ser이다. 또는 다른 실시 형태에서, B₁ 내지 B₇은 Cys이며, B₈은 Leu이다. 추가의 실시 형태에서, B₁은 Pro이며, B₂ 내지 B₈은 Cys이다.

- [0151] 화학식 IV 및 화학식 V에서, 바람직하게는 기 $(X_3)_c$ 는 서열 모티프 ZZXZ를 포함하며, 여기서, Z는 지방족 아미노산이고; X는 임의의 아미노산이다. 본 명세서에서, 어구 "지방족 아미노산"은 글리신(G), 알라닌(A), 류신(L), 아이소류신(I), 발린(V) 및 프롤린(P)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 의미한다.
- [0152] 더 바람직하게는, 기 $(X_3)_c$ 는 LLXV, ILXV, ILXL, VLXL 및 VLXV로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열 모티프를 포함한다. 가장 바람직하게는, 기 $(X_3)_c$ 는 서열 모티프 VLXV를 포함한다.
- [0153] 화학식 IV 및 화학식 V에서, 바람직하게는 기 $(X_3)_c$ 는 서열 모티프 ZZXZZXZ를 포함하며, 여기서, Z는 지방족 아미노산이고; X는 임의의 아미노산이다. 더 바람직하게는, 기 $(X_3)_c$ 는 서열 모티프 VLZVZXL을 포함하며, 여기서, Z는 지방족 아미노산이고; X는 임의의 아미노산이다.
- [0154] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 서열 번호 2, 4, 6, 8 또는 10의 서열로부터 선택되는 폴리펩티드, 또는 이의 임의의 것에 대하여 하이드로포빈 코어 내에서 서열 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 또는 99% 이상인 폴리펩티드이다. "하이드로포빈 코어"는 잔기 B₁로부터 시작하여 잔기 B₈로 종결되는 서열을 의미한다.
- [0155] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 자낭균문의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능하다. 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 클라도스포룸속 (특히 씨. 폴룸), 오피스토마속 (특히 오. 올미), 크리포넥트리아속 (특히 씨. 파라시티카), 트리코테르마속 (특히 티. 하르지아눔, 티. 롱기브리치아툼, 티. 아스페렐룸, 티. 코닝기웁시스, 티. 아그레시붐, 티. 스트로마티쿰 또는 티. 레에세이), 지베렐라속 (특히 지. 모닐리포르미스), 뉴로스포라속 (특히 엔. 크라사), 마가나포르테속 (특히 엠. 그리세아) 또는 하이포크레아속 (특히 에이치. 체코리나, 에이치. 아트로비리디스, 에이치. 비렌스 또는 에이치. 릭시이)의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능하다.
- [0156] 바람직한 실시 형태에서, 하이드로포빈은 트리코테르마속 (특히 티. 하르지아눔, 티. 롱기브리치아툼, 티. 아스페렐룸, 티. 코닝기웁시스, 티. 아그레시붐, 티. 스트로마티쿰 또는 티. 레에세이)의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능하다. 특히 바람직한 실시 형태에서, 하이드로포빈은 티. 레에세이 종의 진균류로부터 수득되거나 또는 수득가능하다.
- [0157] 더 바람직한 실시 형태에서, 하이드로포빈은 하기:
- [0158] (a) HFBII (서열 번호 2; 진균류 트리코테르마 레에세이로부터 수득가능함);
- [0159] (b) HFBI (서열 번호 4; 진균류 트리코테르마 레에세이)로부터 수득가능함;
- [0160] (c) SC3 (서열 번호 6; 진균류 쉬조필룸 콤문)으로부터 수득가능함;
- [0161] (d) EAS (서열 번호 8; 진균류 뉴로스포라 크라사로부터 수득가능함); 및
- [0162] (e) TT1 (서열 번호 10; 진균류 탈라로마이세스 서모필루스로부터 수득가능함)로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질, 또는 이의 임의의 것에 대하여 하이드로포빈 코어 내에서 서열 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 또는 99% 이상인 단백질이다.
- [0163] 더 바람직한 실시 형태에서, 하이드로포빈은 하기:
- [0164] (a) HFBII (서열 번호 1; 진균류 트리코테르마 레에세이로부터 수득가능함);
- [0165] (b) HFBI (서열 번호 3; 진균류 트리코테르마 레에세이로부터 수득가능함);
- [0166] (c) SC3 (서열 번호 5; 진균류 쉬조필룸 콤문)으로부터 수득가능함;
- [0167] (d) EAS (서열 번호 7; 진균류 뉴로스포라 크라사로부터 수득가능함);
- [0168] (e) TT1 (서열 번호 9; 진균류 탈라로마이세스 서모필루스로부터 수득가능함)로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드로 코딩되는 단백질,
- [0169] 또는 유전자 암호의 결과로서 상기 (a) 내지 (e)에서 정의된 폴리뉴클레오티드로 축퇴되는 폴리뉴클레오티드로 코딩되는 단백질이다.

- [0170] 특히 바람직한 실시 형태에서, 하이드로포빈은 단백질 "HFBI" (서열 번호 2; 트리코테르마 레에세이로부터 수득가능함) 또는 이의 하이드로포빈 코어 내에서 서열 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 또는 99% 이상인 단백질이다.
- [0171] 일 실시 형태에서, 하이드로포빈은 조성물의 초기 성분으로서 존재할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 하이드로포빈은 (예를 들어, 하이드로포빈 융합 단백질의 원위치 가수분해에 의해) 조성물 내에서 원위치에서 생성될 수 있다.
- [0172] 대안적인 실시 형태에서, 하이드로포빈은 차플린(chaplin)으로 전적으로 또는 부분적으로 대체될 수 있다. 차플린류는 하이드로포빈 유사 단백질로서, 이것도 소수성-친수성 계면에서 자기-조립할 수 있고 따라서 하이드로포빈에 대하여 기능적 등가물이다. 차플린이 사상균 및 사상 박테리아(filamentous bacteria), 예를 들어 방선균류(*Actinomycetes*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에서 또한 확인되었다. 하이드로포빈과는 다르게, 차플린은 단지 2개의 시스테인 잔기를 가질 수 있으며, 단지 하나의 다이설파이드 가교체를 형성할 수 있다. 차플린의 예는 국제특허 공개 WO 01/74864호, 미국 특허 출원 공개 제2010/0151525호 및 미국 특허 출원 공개 제2010/0099844호와, 문헌[Talbot, *Curr. Biol.* 2003, 13, R696-R698]에 기재되어 있다.
- [0173] 지방 분해 효소
- [0174] 본 명세서에서, 어구 '지방 분해 효소'는 지질 기질에 작용하여 자유 지방산 분자를 유리할 수 있는 효소로 정의된다. 바람직하게는, 지방 분해 효소는 지질 기질 (그러나 이는 특별히 배타적으로 트라이글리세라이드, 당지질 및/또는 인지질인 것은 아님) 내의 에스테르 결합을 가수분해시켜 자유 지방산 분자가 유리되게 할 수 있는 효소이다. 가능한 지질 기질의 예가 하기에 기재되어 있다.
- [0175] 본 발명에서 사용되는 지방 분해 효소는 바람직하게는 비극성 지질 및 극성 지질 둘 모두에서 활성을 갖는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "극성 지질"은 인지질 및/또는 당지질을 의미한다. 바람직하게는, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "극성 지질"은 인지질 및 당지질 둘 모두를 의미한다. 극성 및 비극성 지질은 문헌[Eliasson and Larsson, "Cereals in Breadmaking: A Molecular Colloidal Approach", publ. Marcel Dekker, 1993]에 논의되어 있다.
- [0176] 특히, 본 발명에서 사용되는 지방 분해 효소는 바람직하게는 하기 부류의 지질에서 활성을 갖는다: 트라이글리세라이드; 인지질, 특히, 그러나 배타적인 것은 아닌 포스파티딜콜린 (PC) 및/또는 N-아실포스파티딜에탄올아민 (APE); 및 특별히 배타적으로 다이갈락토실 다이글리세라이드 (DGDG)인 것은 아닌 당지질.
- [0177] 본 명세서에서, 어구 "자유 지방산"은 하기 화학식의 화합물: $R-C(=O)-OH$ (여기서, R은 직쇄 또는 분지쇄, 포화 또는 불포화 하이드로카르빌 기임)을 의미하며, 이 화합물은 총 4 내지 40개의 탄소 원자, 바람직하게는 6 내지 40개의 탄소 원자, 예를 들어 적어도 10 내지 40개의 탄소 원자, 예를 들어 12 내지 40개, 예를 들어 14 내지 40개, 16 내지 40개, 18 내지 40개, 20 내지 40개 또는 22 내지 40개의 탄소 원자, 더 바람직하게는 10 내지 24개, 특히 12 내지 22개, 특히 14 내지 18개, 예를 들어 16 또는 18개의 탄소 원자를 갖는다. 특별한 일 실시 형태에서, 이러한 아실 기는 알카노일 기이다. 대안적으로, 이러한 아실 기는 예를 들어 1 내지 5개의 이중 결합, 바람직하게는 1, 2 또는 3개의 이중 결합을 가질 수 있는 알케노일 기를 포함한다.
- [0178] 적합하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 지방 분해 효소는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하기 활성들 중 하나 이상을 가질 수 있다: 포스포리파아제 활성 (예를 들어 포스포리파아제 A1 활성 (E.C. 3.1.1.32) 또는 포스포리파아제 A2 활성 (E.C. 3.1.1.4)); 글리코리파아제 활성 (E.C. 3.1.1.26), 트리아실글리세롤 가수분해 활성 (E.C. 3.1.1.3), 지질 아실트랜스퍼라아제 활성 (문헌[Enzyme Nomenclature Recommendations (1992) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology]에 따르면 일반적으로 E.C. 2.3.1.x로 분류됨), 및 이의 임의의 조합. 이러한 지방 분해 효소는 본 기술 분야 내에 잘 알려져 있다.
- [0179] 적합하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 지방 분해 효소는 포스포리파아제 (예를 들어 포스포리파아제 A1 (E.C. 3.1.1.32) 또는 포스포리파아제 A2 (E.C. 3.1.1.4)); 글리코리파아제 또는 갈락토리파아제 (E.C. 3.1.1.26), 트리아실글리세라이드 리파아제 (E.C. 3.1.1.3)일 수 있다. 이러한 효소는 추가의 부활성(side activity), 예를 들어 지질 아실트랜스퍼라아제 부활성을 나타낼 수 있다.
- [0180] 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 지방 분해 효소는 트리아실글리세롤 가수분해 활성 (E.C. 3.1.1.3)을 갖는다.

- [0181] 지방 분해 효소는 효소의 옥시음이온 구멍의 구조 및 서열 분석을 기초로 하여 세 부류 (GX, GGGX 또는 Y) 중 하나에 속하는 것으로 분류될 수 있다.
- [0182] "GX 지방 분해 효소"는 효소의 옥시음이온 구멍-형성 잔기 X가 구조적으로 잘 보존되어 있고, 엄격하게 보존된 글리신이 상기 X에 선행하는 것이다.
- [0183] "GGGX 효소"는 잘 보존된 GGG 패턴, 이어서 보존된 소수성 아미노산 X가 있고, 잔기 X에 선행하는 글리신의 골격 아미드가 옥시음이온 구멍을 형성하는 것이다.
- [0184] "Y 지방 분해 효소"는 옥시음이온 구멍이 골격 아미드에 의해 형성되는 것이 아니라 타이로신 측쇄의 하이드록실기에 의해 형성되는 것이다.
- [0185] 일 태양에서, 본 발명은 GX 지방 분해 효소의 용도에 관한 것이다.
- [0186] 적합하게는, 옥시음이온 구멍 형성 잔기 X는 M, Q, F, S, T, A, L 또는 I일 수 있다. 바람직하게는, 옥시음이온 구멍 형성 잔기 X는 M, Q, F, S 또는 T일 수 있다.
- [0187] 일 실시 형태에서, 지방 분해 효소는 하기 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리 abH23 (바람직하게는 abH23.01), abH25 (바람직하게는 25.01), abH16 (바람직하게는 16.01), abH18 (바람직하게는 abH18.01) 및 abH15 (바람직하게는 15.01 또는 15.02) 중 하나에 속할 수 있다.
- [0188] 일 실시 형태에서, 지방 분해 효소는 하기 알파/베타 하이드롤라아제 슈퍼패밀리 abH23 (바람직하게는 abH23.01), abH25 (바람직하게는 25.01), abH16 (바람직하게는 16.01) 및 abH15 (바람직하게는 15.02) 중 하나에 속할 수 있다.
- [0189] 일 실시 형태에서, 바람직하게는 지방 분해 효소는 리파아제 엔지니어링 데이터베이스(Lipase Engineering Database)에서 abH23 슈퍼패밀리의 구성원, 바람직하게는 abH23.01 상동 패밀리의 구성원으로 분류된다.
- [0190] 이들 슈퍼패밀리에 관한 상세 사항은 리파아제 엔지니어링 데이터베이스(<http://www.led.uni-stuttgart.de/>)에서 찾아볼 수 있다. 본 명세서에서 리파아제 엔지니어링 데이터베이스를 언급할 때, 2009년 12월 10일자로 공개된 데이터베이스의 버전 3.0을 언급하는 것이다.
- [0191] 특히, 일 실시 형태에서 지방 분해 효소는, 이것이 사상균 유래의 GX 지방 분해 효소일 경우 abH23 슈퍼패밀리에 속하는 것으로 간주될 수 있다. 바람직하게는, 지방 분해 효소는, 스위스프로트(swissprot) P19515와 같이, 이 효소의 촉매 트라이어드(catalytic triad)가 리조푸스 미에헤이(*Rhizopus miehei*) 유래의 리파아제의 것에 맞추어질 경우 GX 지방 분해 효소이다.
- [0192] abH23 슈퍼패밀리에 속하는 지방 분해 효소의 예에는 표 2에 나타낸 것들이 포함된다.

표 2

abH23	유기체	NCBI 접근 암호 및 버전 번호* OR gi 번호
abH23.01 (리조무코르 미에헤이(<i>Rhizomucor miehei</i>) 리파아제 유사)	아라비도시스 탈리아나(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_197365.1
		AAL24204.1
		42570528
		145362642
	아스페르길루스 아와모리(<i>Aspergillus awamori</i>)	BAA92937.3
		84028205
	아스페르길루스 클라바투스(<i>Aspergillus clavatus</i>)	121719262
	아스페르길루스 플라부스(<i>Aspergillus flavus</i>)	27525628
	아스페르길루스 푸미카투스	70985264
		70987066
	아스페르길루스 니들란스(<i>Aspergillus nidulans</i>)	67902118
		67537354
	아스페르길루스 니게르	AAK60631.1
		O42807.1
		1UWC_A
		2HL6_A
		1USW_A
		2BJH_A
		145252728

[0193]

		110431975
		145241772
		109677003
		145251976
		110431973
	아스페르길루스 오리자에	83766610
		169771817
		169768448
		169780130
		169774351
		BAA12912.1
	아스페르길루스 파라시티쿠스(<i>Aspergillus parasiticus</i>)	27525626
	아스페르길루스 타마리아(<i>Aspergillus tamarii</i>)	124108031
	아스페르길루스 테레우스	115402833
		115385463
		115400761
		115443274
	아스페르길루스 튜빙겐시스(<i>Aspergillus tubingensis</i>)	O42815.1
	브루기아 말라이어(<i>Brugia malayi</i>)	170592511
	카에노라브디티스 브리그사에(<i>Caenorhabditis briggsae</i>)	157761233
		157761241
		157755883
		157771698
		157763172

[0194]

		157747253
		157759179
		157759177
		157772997
		157773105
		157773031
		157774613
		157774617
		157772605
		157774619
		157774601
	카에노라브디티스 엘레강스(<i>Caenorhabditis elegans</i>)	115534096
		17552584
		71983228
		71983230
		71983236
		193207843
		115534067
		158518185
		86575143
		115534303
		72000668
		AAF60431.2

[0195]

		71994497
		T27056
		71994547
		CAB61137.3
	케토미움 글로보수(<i>Chaetomium globosum</i>)	193247829
		116206442
		시아노비움(<i>Cyanobium</i>) 종
		197627310
		시아노테세(<i>Cyanothece</i>) 종
	딕티오스텔리움 디스코이테움(<i>Dictyostelium discoideum</i>)	172037675
		177663915
		196246404
		60463496
		66825791
	딕티오스텔리움 디스코이테움 AX4	AAM43784.1
		66802624
		푸사륨 옥시스포룸(<i>Fusarium oxysporum</i>)
		148791375
	지베렐라 제아에	33621223
		46123057
	마그나포르테 그리세아	39978263
	넥트리아 헤마토코카(<i>Nectria haematococca</i>)	CAC19602.1
	네오사르토르야 피셰리(<i>Neosartorya fischeri</i>)	119499143
		119480389
	뉴로스포라 크라사	CAC28687.1

[0196]

[0197]

뉴로스포라 크라사OR74A	EAA32130.1
오리자 사티바(<i>Oryza sativa</i>)	115463525
	125552085
	125577937
	115486491
	115473965
	125586239
	125543854
	125535166
	125559538
	115442095
	115453007
	BAB64204.1
	125529023
페니실륨 알리이(<i>Penicillium allii</i>)	31872092
페니실륨 카멤베르티(<i>Penicillium camemberti</i>)	P25234
	1TIA
	1TIA_A
페니실륨 사이클로퍽(<i>Penicillium cyclopium</i>)	48429006
	AAF82375.1
페니실륨 엑스판숨(<i>Penicillium expansum</i>)	AAG22769.1
페오스페리아 노도룸(<i>Phaeosphaeria nodorum</i>)	169595748
	169606904
피스코비트렐라 파텐스	168020609
	168040480
	168037728

[0198]

포도스포라 안세리나(<i>Podospora anserina</i>)	171693635
포플루스 트리코카르파(<i>Populus trichocarpa</i>)	118482274
파이레노포라 트리티시-레펜티스(<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>)	189192516
	189202058
리조무코르 비에헤이	P19515.2
	3TGL
	5TGL
	4TGL
	1TGL
	5TGL_A
	4TGL_A
	1TGL_A
리조푸스 아리쿠스(<i>Rhizopus arrhizus</i>)	3TGL_A
	1TIC_A
	AAF32408.1
리조푸스 자바니쿠스(<i>Rhizopus javanicus</i>)	1TIC_B
	73621144
리조푸스 마이크로스포루스(<i>Rhizopus microsporus</i>)	156470335
	166078592
리조푸스 니베우스(<i>Rhizopus niveus</i>)	P21811
	1LG_Y_A
	BAA31548.1
	1LG_Y_B
	1LG_Y_C

리조푸스 오리자에(<i>Rhizopus oryzae</i>)	AAS84458.1
	P61872.1
	1TIC_A
	94962082
	71390109
리조푸스 스톨로니페르(<i>Rhizopus stolonifer</i>)	AAZ66864.1
사이네코코커스(<i>Synechococcus</i>) 종	87301494
써모마이세스 라누기노수스(<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	O59952.1
	1TIB
	1DTE_A
	1DT5_D
	1DU4_B
	1DT3_A
	1EIN_B
	1DT3_B
	1DT5_E
	1DT5_B
	1DT5_G
	1DT5_F
	1DT5_H
	1DT5_A
	1DT5_C
	1DTE_B
	1DU4_A
	1DU4_D
	1DU4_C

[0199]

	1EIN_C
	1EIN_A
	1GT6_A
	CAD32696.1
	CAD32695.1
트리티쿰 아에스티BUM(<i>Triticum aestivum</i>)	
비티스 비니페라(<i>Vitis vinifera</i>)	157336329
제아 마이스(<i>Zea mays</i>)	194691896
	194690642
	194706432
	194694588
	194694210

[0200]

[0201]

[0202]

이 실시 형태에서, 바람직하게는 옥시음이온 구멍 형성 잔기는 세린 또는 트레오닌이다.

바람직하게는, 지방 분해 효소는 리조푸스 미에헤이(*Rhizopus miehei*) 유사 상동 패밀리 abH23.01에 속한다. 적합하게는, 본 발명에서 사용하기에 특히 바람직한 효소는 써모마이세스 (바람직하게는, 티. 라누기노수스), 푸사륨 (바람직하게는 에프. 헤테레오스포룸), 아스페르길루스 (바람직하게는 에이. 투비엔기시스 및/또는 에이. 푸미가투스) 및 리조푸스 (바람직하게는, 알. 아리주스) 유래의, 바람직하게는 써모마이세스 (바람직하게는, 티. 라누기노수스), 푸사륨 (바람직하게는 에프. 헤테레오스포룸), 또는 아스페르길루스 (바람직하게는 에이. 투비엔기시스) 유래의 상동 패밀리 abH23.01로 분류되는 임의의 지방 분해 효소를 포함할 수 있다. 이러한 지방 분해 효소의 예에는 리펙스™ (국제특허 공개 WO 94/02617호에 개시되고 본 명세서에 서열 번호 11로 나타낸 써모마이세스 라누기노수스 지방 분해 효소), 국제특허 공개 WO 2005/087918호에 개시되고 본 명세서에 서열 번호 13으로 나타낸 푸사륨 헤테로스포룸 지방 분해 효소 (다니스코 에이/에스로부터 그라인드아밀 파워베이크 4100™으로 입수가능함) 및 리파아제 3 (국제특허 공개 WO 98/45453호에 개시되고 본 명세서에 서열 번호 14로 나타낸 아스페르길루스 투비겐시스(*Aspergillus tubigensis*) 지방 분해 효소가 포함된다.

[0203]

본 발명의 일 실시 형태에서, 지방 분해 효소는, 2005년 7월 26일자 버전의, 접근 번호 P19833 하에서의 스위스프로트 단백질 지식 베이스(<http://www.expasy.org/sprot/> and <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>)에 나타낸

바와 같이 촉매 트라이어드가 모락셀라(*Moraxella*) 리파아제 1 유사 지방 분해 효소의 것에 맞추어질 경우 abH25 슈퍼패밀리에 속하는 것으로 간주될 수 있다.

[0204] 이 패밀리에 속하는 지방 분해 효소의 예에는 표 3에 열거된 것들이 포함된다.

표 3

abH25	유기체	NCBI 접근 암호 및 버전 번호* OR gi 번호
abH25.01 (모락셀라 리파아제 1 유사)	아시도보락스 델라피엘다이(<i>Acidovorax delafieldii</i>)	BAB86909.1
	키네오코커스 라디오톨레란스(<i>Kineococcus radiotolerans</i>)	152967773
	키네오코커스 라디오톨레란스 SRS30216	EAM75386.1
	모락셀라 종	P19833.1
	스트렙토마이세스 알부스(<i>Streptomyces albus</i>)	AAA53485.1
	스트렙토마이세스 암보파시엔스(<i>Streptomyces ambofaciens</i>)	117164910
	스트렙토마이세스 코엘리콜로르(<i>Streptomyces coelicolor</i>)	AAD09315.1
	스트렙토마이세스 엑스폴리아투스(<i>Streptomyces exfoliatus</i>)	CAB69685.1
	스트렙토마이세스	1JFR_B
	스트렙토마이세스	1JFR_A
	스트렙토마이세스 그리세우스(<i>Streptomyces griseus</i>)	182439251
	써모비피다 푸스카(<i>Thermobifida fusca</i>)	72161287
		72161286
		CAH17553.1
	써모비피다 푸스카 DSM 43793	CAH17554.1

[0205]

[0206] 이 실시 형태에서, 바람직하게는 옥시음이온 구멍 형성 잔기는 M, Q, A, F, L 또는 I이다.

[0207] 본 발명의 일 실시 형태에서, 지방 분해 효소는, 촉매 트라이어드가 스트렙토마이세스의 것에 맞추어질 경우 abH16 슈퍼패밀리에 속하는 것으로 간주될 수 있다.

[0208] 이 패밀리에 속하는 지방 분해 효소의 예에는 표 4에 나타난 것들이 포함된다.

표 4

abH16	유기체	NCBI 접근 암호 및 버전 번호* OR gi 번호
	아트로박터 클로로페놀리쿠스(<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>)	169176591
	아트로박터 종 FB24	116669612
	코리네박테리움 디프테리애(<i>Corynebacterium diphtheriae</i>)	38232746
	코리네박테리움 에피시엔스(<i>Corynebacterium efficiens</i>)	25026650
		25026649
	코리네박테리움 에피시엔스 YS-314	BAC16904.1
		BAC16903.1
	코리네박테리움 글루타미쿰(<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	19551331
		145294142
		19551330
		145294141
	프랑키아(<i>Frankia</i>) 종	158312565
	프랑키아 종 EAN1pec	EAN12331.1
	노카르디아 파르시니카(<i>Nocardia farcinica</i>)	54025580
	노카르디아오이데스(<i>Nocardioideis</i>) 종	119715399
	노카르디아오이데스 종 JS614	EAO07564.1
abH16.01 (스트렙토마이세스 리파아제)	프로피오니박테리움 아크네스(<i>Propionibacterium acnes</i>)	50843543
	프로피오니박테리움 아크네스 P-37	50843256
	로도코쿠스(<i>Rhodococcus</i>) 종	CAA67627.1
		111021394

[0209]

		111024112
		111025204
		111025876
		111022422
		111024917
		40787231
	루브로박터 자일라노필루스(<i>Rubrobacter xylanophilus</i>)	108805093
	루브로박터 자일라노필루스 DSM 9941	EAN36909.1
	스트렙토마이세스 아베르미틸리스(<i>Streptomyces avermitilis</i>)	29833101
	스트렙토마이세스 아베르미틸리스 MA-4680	BAC74270.1
	스트렙토마이세스 신나모네우스(<i>Streptomyces cinnamomeus</i>)	AAB71210.1
	스트렙토마이세스 코엘리콜로르	NP606008
	스트렙토마이세스 프라디아(<i>Streptomyces fradiae</i>)	148832709
	스트렙토마이세스 그리세우스	182439565
	스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스(<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>)	YP002199726
	스트렙토마이세스 종	197333608
	스트렙토마이세스 스비세우스(<i>Streptomyces sviveus</i>)	197781872
	합성 제작물	AAO92397.1

[0210]

[0211] 이 실시 형태에서, 바람직하게는 옥시음이온 구멍 형성 잔기는 T 또는 Q이다.

[0212] 본 발명의 일 실시 형태에서, 지방 분해 효소는, 촉매 트라이어드가 GX 부르크홀데리아(*Burkholderia*) 리파아제의 것에 맞추어질 경우 abH15 수퍼패밀리에 속하는 것으로 간주될 수 있다.

[0213] 이 패밀리에 속하는 지방 분해 효소의 예에는 표 5에 나타난 것들과, 본 명세서에서 서열 번호 15로 나타난 리포맥스가 포함된다.

표 5

abH15	유기체	NCBI 접근 암호 및 버전 번호 * OR gi 번호
abH15.02 (부르크홀데리아 세파시아(<i>Burkholderia cepacia</i>) 리파아제 유사)	아시도보락스 아베네(<i>Acidovorax avenae</i>)	120612825
	아시네토박터 파우만니(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	169794515
		126643175
		193078538
		158517002
	아시네토박터 칼코아세티쿠스(<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	AAD29441.1
	아시네토박터 쉴레리(<i>Acinetobacter schindleri</i>)	158120326
	아시네토박터 종 아시네토박터 종 SY-01	158120327
		50086294
	에어로모나스 하이드로필라(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	AAP44577.1
		117618653
	에어로모나스 살모니시다(<i>Aeromonas salmonicida</i>)	145300587
	알카니보락스 보르크멘시스(<i>Alcanivorax borkumensis</i>)	110834836
	알카니보락스 종 알테로모나스 마클레오디아(<i>Alteromonas</i>	196194968
		196193133
		88795738

[0214]

	<i>macleodii</i>)	
	아조토박터 비넬란디아(<i>Azotobacter vinelandii</i>) AvOP	EAM05214.1
	부르크홀데리아 암비파리아(<i>Burkholderia ambifaria</i>)	115358044
		118695660
		171316092
		170702796
		171320247
	부르크홀데리아 세노세파시아(<i>Burkholderia cenocepacia</i>)	124875244
		107026795
		118713500
		84354072
		198038844
	부르크홀데리아 세노세파시아 AU 1054	EAM08623.1
	부르크홀데리아 세노세파시아 H12424	EAM18550.1
	부르크홀데리아 세파시아	AA Y86757.2
		116739150
		161406799
		1OIL_B
		1HQD_A
		4LIP_D
		P22088.2
		1OIL_A
		4LIP_E
		1YS2_X
	부르크홀데리아 세파시아 KCTC 2966	AAT85572.1
	부르크홀데리아 세파시아 R1808	46319469
		46319468
	부르크홀데리아 세파시아 R18194	46312540
	부르크홀데리아 세파시아 ST-200	BAD13379.1
	부르크홀데리아	84360313

[0215]

	돌로사(<i>Burkholderia dolosa</i>)	
	부르크홀데리아 글루마에(<i>Burkholderia glumae</i>)	1TAH_A
		1TAH_C
		1TAH_B
		1TAH_D
		1QGE_E
	부르크홀데리아 말레이(<i>Burkholderia mallei</i>)	2ES4_A
		83618505
		53715898
		83618339
		167003692
	부르크홀데리아 말레이 10399	67636935
		67635666
	부르크홀데리아 말레이 FMH	69987887
	부르크홀데리아 말레이 GB8	67640408
	호스(horse) 4	67642620
	부르크홀데리아 말레이 JHU	70001349
	부르크홀데리아 말레이 NCTC 10247	67645935
	부르크홀데리아 멀티보란스(<i>Burkholderia multivorans</i>)	161521210
		161525117
	부르크홀데리아 멀티보란스 RG2	AAW30196.1
	부르크홀데리아 멀티보란스 Uwc 10	AAZ39650.1
	부르크홀데리아 오클라호멘시스(<i>Burkholderia oklahomensis</i>)	167573565
		167568063
		167567050
		167574127
	부르크홀데리아 슈도말레이(<i>Burkholderia pseudomallei</i>)	53722762
		126445060
		99911132
		100126424
		167915815
		126442397

[0216]

		157806477
		134281779
		76818459
		100231475
		99908515
		100059930
		53723336
		100121879
		167744369
		184212969
		167908322
		167725450
		67671904
	부르크홀데리아 슈도말레이 1655	67670022
		67684997
	부르크홀데리아 슈도말레이 1710a	67681352
	부르크홀데리아 슈도말레이 668	67735159
	부르크홀데리아 슈도말레이	67755633
	파스퇴르(Pasteur)	67753658
	부르크홀데리아 슈도말레이 S13	67759470
	부르크홀데리아 종 383	78063020
	부르크홀데리아 종 HY-10	154091354
	부르크홀데리아 종 99-2-1	AAV34204.1
	부르크홀데리아 종 MC16-3	AAV34203.1
	부르크홀데리아 타일란덴시스(Burkholderia thailandensis)	83717248
		167577201
		83716483
		167579206
		167617325
		167840423
	부르크홀데리아 우보넨시스(Burkholderia ubonensis)	167583926

[0217]

부르크홀데리아 베트남엔시스(<i>Burkholderia vietnamiensis</i>)	134293086
	134293087
부르크홀데리아 베트남엔시스 G4	EAM26790.1
	67548784
	EAM26789.1
크로모박테리움 비올라세움(<i>Chromobacterium violaceum</i>)	34498169
크로모박테리움 비올라세움 ATCC 12472	AAQ60384.1
부르크홀데리아 글루마에	1CVL_A
쿠프리아비두스 타이완엔시스(<i>Cupriavidus taiwanensis</i>)	194289366
데할로코코이테스(<i>Dehalococcoides</i>) 종	163813742
감마 프로테오박테리움(<i>Gamma proteobacterium</i>)	198262110
	198262137
하헬라 채주엔시스(<i>Hahella chejuensis</i>)	83646958
리스토넬라 앙구일라룸(<i>Listonella anguillarum</i>)	197313280
리스토넬라 앙구일라룸 M93Sm	AA Y26146.2
마리노박터 알지콜라(<i>Marinobacter algicola</i>)	149376115
	149378244
마리노모나스(<i>Marinomonas</i>) 종	87119903
모리텔라(<i>Moritella</i>) 종	149908369
	149911484
	149909327
믹소코커스 잔투스(<i>Myxococcus xanthus</i>)	108756922

[0218]

	오세아노박터(<i>Oceanobacter</i>) 종	94500183
		94501726
포토박테리움	프로푼둠(<i>Photobacterium profundum</i>)	90409701
		54303612
	포토박테리움 프로푼둠 ss9	CAG23805.1
	포토박테리움 종	89072072
플레시오시스티스	파시피카(<i>Plesiocystis pacifica</i>)	149921436
		197284877
	프로테우스 미라빌리스(<i>Proteus mirabilis</i>)	184191073
	프로테우스 볼가리스(<i>Proteus vulgaris</i>)	AAB01071.1
슈도모나스	아에루기노사(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	AAC34733.1
		P26876.2
		BAA09135.1
		AAF64156.1
		BAA23128.1
		1EX9_A
		107102411
		152989672
		152983830
		AAT85570.1
		104783837
		77456799
		77459293
		AAC15585.1
슈도모나스 플루오레센스	플루오레센스(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	70734119
		23058245
		23061908
		CAC07191.1

[0219]

	<i>fragi</i>)	P08658.2
		AA A25879.1
	슈도모나스 루테올라(<i>Pseudomonas luteola</i>)	AAC05510.1
		146307587
	슈도모나스 멘도시나(<i>Pseudomonas mendocina</i>)	146306794
		AAM14701.1
		167035900
		119858840
		170723807
	슈도모나스 푸티다(<i>Pseudomonas putida</i>)	26991534
		148549934
	슈도모나스 푸티다 KT2440	AAN70423.1
		4LIP_E
		189178711
	슈도모나스 종	189178713
	슈도모나스 종 109	P26877.1
	슈도모나스 종 KFCC10818	AAD22078.1
	슈도모나스 종 KWI-56	P25275.1
	슈도모나스 종 SW-3	AG47649.2
	슈도모나스 스투제리(<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	146282376
	슈도모나스 위스콘시넨시스(<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>)	AAB53647.1
	사이크로박터 크라이오할로렌티스(<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>)	93005273
	사이크로박터 크라이오할로렌티스 K5	EA010600.1
	사이크로박터 종	148652775
	랄스토니아 유포트로파(<i>Ralstonia eutropha</i>)	113867341
	랄스토니아 메탈리두란스(<i>Ralstonia</i>	22979988

[0220]

<i>metallidurans</i>)	
랄스토니아 픽케티이(<i>Ralstonia pickettii</i>)	153885935
	121531370
랄스토니아 종 M1	AAR13272.1
로도페락스 페리레두센스(<i>Rhodoferrereducens</i>)	89902127
셰와넬라 데니트리피칸스(<i>Shewanella denitrificans</i>)	91792458
셰와넬라 데니트리피칸스 OS-217	69944965
셰와넬라 데니트리피칸스 OS217	EAN69301.1
셰와넬라 프리기디마리나(<i>Shewanella frigidimarina</i>)	114564999
셰와넬라 프리기디마리나 NCIMB 400	EAN74111.1
셰와넬라 우디이(<i>Shewanella woodyi</i>)	118073371
소랑기움 셀룰로숨(<i>Sorangium cellulosum</i>)	162451743
	AAT51282.1
합성 제작물	AAT51165.1
비브리오 알기노라이티쿠스(<i>Vibrio alginolyticus</i>)	91225988
비브리오 앙구스툼(<i>Vibrio angustum</i>)	90580697
비브리오 캄프벨리이(<i>Vibrio campbellii</i>)	163801151
	P15493.2
	AAA17487.1
	150423294
비브리오 콜레라(<i>Vibrio cholerae</i>)	116219797

[0221]

		153801593
		153215150
		116214571
	비브리오 콜레라 MO10	75830993
	비브리오 콜레라 RC385	75821182
	비브리오 콜레라 V51	75819240
	비브리오 콜레라 V52	75816524
	비브리오 하르베이(Vibrio harveyi)	156974975
		153834178
	비브리오 파라헤모라이티쿠스(Vibrio parahaemolyticus)	28897955
		153837472
	비브리오 쉐로니(Vibrio shilonii)	149187907
		116184955
	비브리오 종	86144587
	비브리오 종 Ex25	75855688
	비브리오 스피렌디두스(Vibrio splendidus)	84385385
	비브리오 불니피쿠스(Vibrio vulnificus)	37680174
		27365668
	비브리오 불니피쿠스 CKM-1	AAQ04476.1
	비브리오 불니피쿠스 CMCP6	AAO10723.1
	비브리오알레스 박테리움(Vibrionales bacterium)	148974047
	자일렐라 파스티디오사(Xylella fastidiosa)	22996002
		28198381
	자일렐라 파스티디오사 Ann-1	EA031309.1
	자일렐라 파스티디오사 테멕쿨라 1(Temecula1)	AAO28344.1
	여시니아 엔테로콜리티카(Yersinia enterocolitica)	123442125
	여시니아 몰라레티(Yersinia mollaretii) ATCC 43969	77961583

[0222]

a b H 1 5	유 기 체	N C B I 접 근 암 호 및 버 전 번 호 * O R g i 번 호
a b H 1 5 . 0 1 (스태필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 리파아제 유사)	아일루로포다 멜라노류카 (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	6 2 5 1 1 0 6 8
		5 8 3 3 9 1 7 2
		5 8 3 3 9 1 7 4
		5 8 3 3 9 1 7 6
	알로우아타 세니쿨루스 (<i>Alouatta seniculus</i>)	5 8 3 3 9 1 7 8
		5 8 3 3 9 1 8 0
		A A F 1 7 6 6 7 . 1
		A A F 8 7 0 1 2 . 1
		D 8 6 3 6 7
		2 6 4 5 1 0 0 3
		A A D 3 1 3 3 9 . 1
	아라비둡시스 탈리아나	4 2 5 7 1 4 3 1
	아텔레스 게오프로이 (<i>Ateles geoffroyi</i>)	1 8 4 6 2 5 1 2
		1 8 4 6 2 5 1 4
	박실러스 안트라시스 (<i>Bacillus</i>)	3 0 2 6 2 5 9 2

[0223]

	<i>anthracis</i>)	
	바실러스 안트라시스 아메스 (<i>Bacillus anthracis</i> <i>Ames</i>)	AAP26455.1
		52142888
		42781684
		168139359
		168134190
		167938472
		168158861
		166993225
	바실러스 세레우스 (<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>)	196043618
		196040277
	바실러스 세레우스 G9241	EAL12983.1
	바실러스 종 42	AAV35102.1
	바실러스 종 L2	AAW47928.1
	바실러스 종 TP10A.1	AAF63229.1
	바실러스 종 토쉬 (<i>Tosh</i>)	AAM21775.1
		75764133
	바실러스 투링기엔시스 (<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i>)	49477789
		118477999
	바실러스 투링기엔시스 ATCC 35646	EA051633.1
	바실러스 웨이헨스테파넨시스 (<i>Bacillus</i> <i>weihenstephanensis</i>)	163940476
	발라에노프테라	0812180A

[0224]

	보 레 알리스(<i>Balaenoptera borealis</i>)	
	발라에노프테라	55583872
	피살루스(<i>Balaenoptera physalus</i>)	1104245A
	보스 프론탈리스(<i>Bos frontalis</i>)	164597876
		116256079
	보스 그루니엔스(<i>Bos grunniens</i>)	62511051
		119675392
	보스 인디쿠스(<i>Bos indicus</i>)	2708611
		6063098
		164597854
	보스 타우루스(<i>Bos taurus</i>)	83416245
		83416247
		30794288
		134244277
		164597862
		83416249
		59797396
		126632213
	부발루스 부발리스(<i>Bubalus bubalis</i>)	6063096
		83416241
		60651145
		13431890
		296143
	칼리세부스 몰로크(<i>Callicebus</i>	58339182

[0225]

	<i>moloch)</i>	58339184
		58339188
	<i>칼리트릭스 자쿠스(Callithrix jacchus)</i>	17368913
		21449837
		21449839
	<i>카멜루스 드로메다리우스(Camelus dromedarius)</i>	62511040
		126567081
	<i>카니스 루푸스(Canis lupus)</i>	312196
		50978904
	<i>카프라 히르쿠스(Capra hircus)</i>	190683030
		83416243
		155183991
		6063094
		1510157A
		60687495
		126632219
	<i>카비아 포르셀루스(Cavia porcellus)</i>	62511092
		7677454
	<i>세부스 알비프론스(Cebus albifrons)</i>	116634246
	<i>세르부스 엘라푸스(Cervus elaphus)</i>	3024641
		70909960
	<i>클로닝 벡터</i>	12584848
	<i>클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium</i>	153941353
		168178255

[0226]

	<i>botulinum</i>)	187932762
		168179769
		153940345
		168185824
		170759344
		188588446
		168186291
		170756926
		148380018
		170758348
		168183734
		188590654
		187935767
		188587698
		148378855
		168184078
		170757848
	클로스트리듐 노비이(<i>Clostridium novyi</i>)	118443364
		118443211
	클로스트리듐 스포로게네스(<i>Clostridium sporogenes</i>)	187777968
		187779336
	클로스트리듐 테타니(<i>Clostridium tetani</i>)	28210658
	클로스트리듐 테타니 매사추세츠(<i>Massachusetts</i>)	AAO35539.1

[0227]

	데이노코커스 라디오듀란스(<i>Deinococcus radiodurans</i>)	C75533
	델피누스 델피스(<i>Delphinus delphis</i>)	62511070
	엘레판티다에(<i>Elephantidae</i>) 속	1509285A
	<i>Equus caballus</i>	126352373
		1709310A
		156723467
		56786671
		168693409
		197941001
		111606634
		111606636
	펠리스 카투스(<i>Felis catus</i>)	57163879
		567042
	갈라고 세네갈렌시스(<i>Galago senegalensis</i>)	17368901
	지오바실러스 카우스토피루스(<i>Geobacillus kaustophilus</i>)	56420521
	지오바실러스 종(주 T1)	67906830
		JC8061
	지오바실러스 종 T1	AAO92067.2
	지오바실러스 스테아로써모필루스(<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	AAF40217.1
		1J13_B
		1J13_A

[0228]

		AAL28099.1
		117373028
		JW0068
		1KU0_A
		1KU0_B
		AAx11388.1
	지오바실러스 썬모카테눌라투스(<i>Geobacillus thermocatenuatus</i>)	CAA64621.1
	지오바실러스 썬모레오보란스(<i>Geobacillus thermoleovorans</i>)	AD30278.1
		113431924
		AM21774.1
		83939852
	지오바실러스 썬모레오보란스 IHI-91	AN72417.1
	지오바실러스 잘리해(<i>Geobacillus zalihae</i>)	110265150
		2DSN_A
		2Z5G_A
	지라파 카멜로파르달리스(<i>Giraffa camelopardalis</i>)	62511039
	히포포타무스 암피비우스(<i>Hippopotamus amphibius</i>)	62511038
	호모 사피엔스(<i>Homo sapiens</i>)	1AXI_A
		1HGU_A
		1KF9_A

[0229]

		7 1 1 0 7 4 A
		1 0 3 3 4 8 6 1
		4 5 0 3 0 8 3
		1 Z 7 C _ A
		3 4 7 8 4 7 0 1
		1 8 1 1 2 7
		7 3 1 1 4 4 A
		3 6 5 4 4
		1 2 5 4 5 3 7 6
		1 2 5 4 5 3 8 1
		1 3 0 2 7 8 1 2
		1 H W G _ A
		1 1 9 6 1 4 6 5 0
		4 7 1 2 1 5 6 8
		3 H H R _ A
		4 7 1 2 1 5 7 9
		1 H W H _ A
		1 4 0 3 2 6 2 B
		3 1 9 0 5
		1 1 9 6 1 4 6 4 8
		1 3 0 2 7 8 1 4
		1 4 0 3 2 6 2 A
		1 3 0 2 7 8 1 6
		4 5 0 3 9 9 1
		4 9 4 5 6 7 5 9

[0230]

		49456803
		183177
		119614662
		13027822
		119614661
		119614666
	락토바실러스 카세이(<i>Lactobacillus casei</i>) CL96	AAP02960.1
	라마 파코스(<i>Lama pacos</i>)	110338953
		586010
	록소돈타 아프리카나(<i>Loxodonta africana</i>)	134706
	마카카 아사멘시스(<i>Macaca assamensis</i>)	53854158
		54124352
		53854163
		53854165
	마카카 물라타(<i>Macaca mulatta</i>)	112293303
		293111
		112293293
		68136596
		114052777
		114052717
		114052929
		112293289
		112293299

[0231]

		6 8 1 3 6 5 9 4
		2 5 0 0 8 5 5
		1 0 9 1 1 6 8 5 5
		1 0 9 1 4 9 0 8 4
		1 0 9 1 4 8 9 9 1
	메소크리세투스 아우라투스(<i>Mesocricetus auratus</i>)	5 8 6 0 1 2
	모노델피스 도메스티카(<i>Monodelphis domestica</i>)	7 4 1 3 6 5 3 3
		6 6 7 9 9 9 7
	무스 무스쿨루스(<i>Mus musculus</i>)	4 0 9 6 6 5 6
	난노스파락스 에렌베르기(<i>Nannospalax ehrenbergi</i>)	6 2 5 1 0 9 5 7
		1 3 4 7 0 9
		4 6 8 4 9 2 1 5
	네오비손 비손(<i>Neovison vison</i>)	1 6 4 2 5 4
		5 3 8 5 4 1 3 1
		5 3 8 5 4 1 2 9
		5 3 8 5 4 1 3 3
		5 3 8 5 4 1 3 5
	노마스쿠스 류코게니스(<i>Nomascus leucogenys</i>)	5 3 8 5 4 1 3 7
		5 3 8 5 4 1 3 9
	닉티세부스 피그마에우스(<i>Nycticebus pygmaeus</i>)	1 7 3 6 8 9 1 0

[0232]

	오릭토라구스 쿠니쿨루스(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	1174399
	오리자사티바	115463847
		125552313
		94183527
		94406690
		94183483
		94183519
		155001235
		94183467
		1666694
		94183402
		94183398
		94183424
		126632207
		94183444
		1805146A
		94183426
		94183523
		1005182A
		94183400
		94183511
		94183410
	오비스아리예스(<i>Ovis aries</i>)	126632211

[0233]

		94183452
		165887
		116735158
		94183438
		57527824
		94183495
		94183507
		94183515
		94183475
		126632209
		94183420
		94183432
		83955026
		94183430
	파에니바실러스 라르베(<i>Paenibacillus larvae</i>)	167465325
	판트로글로디테스(<i>Pan troglodytes</i>)	20140016
		20140015
		114669972
		114669970
		114669980
		114669998
		114669984
		114669978
		114669976

[0234]

		114669996
		114669982
		114670000
		114669918
		114669948
		114669944
		114669938
		57113881
		114669920
		114669930
		114669994
		114669992
		114669990
		114670016
		114670014
		55645705
		114669905
		114669936
		57113891
		114669942
		114669934
		114669940
		57113885
		28188745
		114669915

[0235]

		114669922
		114669932
		114670004
	피스코미트렐라 파텐스	162691248
	피테시아 피테시아(<i>Pithecia pithecia</i>)	58339190
		58339192
		58339195
	피가트릭스 데마에우스(<i>Pygathrix nemaeus</i>)	53854141
		54124350
		53854146
		53854148
	라투스 노르베기쿠스(<i>Rattus norvegicus</i>)	134717
		77861910
		149054569
		149054567
	리노피테쿠스 룩셀라나(<i>Rhinopithecus roxellana</i>)	53854150
		53854152
		53854154
		53854156
	사이미리 볼리비엔시스(<i>Saimiri boliviensis</i>)	17368174
	셔틀 벡터	2342750
	스타펠로코커스 아우레우스	153104
		88193885
		1314205A

[0236]

		4 9 4 8 2 3 5 4
		5 7 6 5 2 4 5 8
		8 3 6 8 2 3 1 5
		1 2 0 8 6 4 8 9 0
		8 3 6 8 2 3 5 5
		5 8 6 0 2 7
		8 3 6 8 2 3 3 5
		1 5 9 2 3 1 0 1
		1 5 4 7 3 6 7 0 4
		8 3 6 8 2 3 9 5
		8 3 6 8 2 3 7 5
		8 3 6 8 2 3 7 1
		1 2 0 8 6 4 9 8 6
		1 2 0 8 6 5 1 5 1
		8 3 6 8 2 3 2 7
		1 2 0 8 6 5 1 4 3
		1 2 0 8 6 4 7 9 4
		1 2 0 8 6 5 0 0 4
		1 2 0 8 6 4 8 8 7
		1 2 0 8 6 5 2 3 6
		4 6 6 9 5
		8 2 7 5 0 0 2 0
		1 5 4 7 3 6 7 0 2
		1 2 0 8 6 5 0 7 7
		8 3 6 8 2 3 6 5

[0237]

		8 3 6 8 2 3 7 7
		1 2 0 8 6 5 0 9 4
		1 2 0 8 6 5 2 3 2
		8 3 6 8 2 3 4 5
		1 2 0 8 6 5 1 4 0
		8 3 6 8 2 3 3 3
		8 3 6 8 2 3 6 9
		8 3 6 8 2 3 3 1
		8 3 6 8 2 3 3 9
		1 2 0 8 6 5 0 3 0
		1 2 0 8 6 4 9 7 5
		1 2 0 8 6 5 1 0 1
		1 2 0 8 6 5 0 2 1
		8 3 6 8 2 3 1 1
		1 5 1 2 2 0 2 6 7
		1 4 8 2 6 6 5 3 8
		1 3 3 8 5 3 4 5 8
		8 3 6 8 2 3 8 3
		1 8 9 1 6 9 9 8 9
		1 6 1 5 0 8 3 7 9
		1 2 0 8 6 4 9 7 8
		1 9 0 5 2 8 0 A
		8 3 6 8 2 3 0 7
		2 1 2 8 1 8 1 3
		8 3 6 8 2 3 0 9

[0238]

		8 3 6 8 2 3 6 3
		8 3 6 8 2 3 9 7
		1 2 0 8 6 4 8 0 0
		1 2 0 8 6 5 1 8 3
		1 2 0 8 6 4 8 2 4
		1 5 4 7 3 6 6 9 6
		8 3 6 8 2 3 7 9
		1 2 0 8 6 4 7 9 7
		1 2 0 8 6 4 8 3 4
		8 3 6 8 2 3 3 7
		1 2 0 8 6 5 0 8 0
		8 3 6 8 2 3 8 9
		1 5 4 7 3 6 6 9 8
		1 5 4 7 3 6 6 9 2
		1 2 0 8 6 5 1 2 3
		8 3 6 8 2 3 8 5
		8 3 6 8 2 3 5 9
		8 3 6 8 2 3 5 1
		B A B 4 3 7 6 9 . 1
		S 6 8 9 7 0
		A A D 5 2 0 5 9 . 1
		P 6 5 2 8 9 . 2
		5 7 6 5 1 0 6 2
		8 4 0 2 8 2 1 8

[0239]

		P 1 0 3 3 5 . 1
		A A K 2 9 1 2 7 . 1
		B 8 9 7 9 7
		8 7 1 6 2 1 3 0
		2 1 2 8 2 0 2 6
		5 7 6 5 1 2 4 4
		1 4 8 2 6 6 7 4 3
		1 5 8 3 4 7 6 3 5
		4 9 4 8 4 8 6 6
		8 4 0 2 9 3 3 4
		4 9 4 8 2 5 5 2
		1 4 8 0 5 6 7
		8 2 7 5 2 2 4 9
	스타필로코커스 아우레우스 MW2	Q 8 N Y C 2 . 1
	스타필로코커스 아우레우스 Mu50	Q 9 9 Q X 0
	스타필로코커스 카르노수스(<i>Staphylococcus carnosus</i>)	6 4 3 4 5 3
		6 4 3 4 5 1
		2 7 4 6 7 1 0 3
		1 9 3 8 8 8 3 8 6
		Q 0 2 5 1 0
		8 2 6 5 4 9 5 4
		A A C 3 8 5 9 7 . 1
		A A C 6 7 5 4 7 . 1
		5 7 8 6 5 7 7 5
		5 7 8 6 5 9 7 1
		2 7 4 6 9 3 2 1
		2 7 4 6 7 1 6 3
		5 7 8 6 5 6 7 3
	스타필로코커스 에피데르미스(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	

[0240]

	스타필로코커스 에피테르미디스 9	AAA19729.1
	스타필로코커스 에피테르미디스 ATCC 12228	AAO06046.1
		AAO03782.1
		AAO03878.1
		AAO03842.1
	스타필로코커스	70725169
	해모라이티쿠스(<i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	AAF21294.1
	스타필로코커스	2H1HA_A
	하이쿠스(<i>Staphylococcus hyicus</i>)	P04635.1
	스타필로코커스	AAT34964.1
	사프로피티쿠스(<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	73663604
		73661811
	스타필로코커스	CAC83747.1
	시물란스(<i>Staphylococcus simulans</i>)	
	스타필로코커스	
	와르네리(<i>Staphylococcus warneri</i>)	
	스타필로코커스	551988
		551987
		AAG35726.1
		52854061
	스트렙토코커스 종	124268
		47072
	수스 스크로파(<i>Sus scrofa</i>)	46361729
		164478
		166835929
		57233311
		1608112A

[0241]

		1 3 1 2 2 9 8 A
		5 7 2 3 3 3 1 3
		5 7 2 3 3 3 2 1
		4 7 5 2 3 1 2 0
		9 1 2 4 8 6
		3 3 3 4 1 8 0 2
		6 6 7 1 2 8 4
		1 4 5 8 2 9 0 4
		6 0 8 1 0 1 1 9
		6 1 3 6 4 4 4 9
		6 0 8 2 7 4 1 2
		6 0 8 1 5 4 8 9
		3 0 5 8 4 1 4 1
		6 0 6 5 5 7 8 5
		6 6 7 1 2 8 2
	합성 제작물	
	트라굴루스 자바니쿠스(<i>Tragulus javanicus</i>)	1 2 9 6 4 2 0 0
		1 2 9 6 4 1 9 8
	트리코수루스 볼페쿨라(<i>Trichosurus vulpecula</i>)	
		3 9 1 5 0 0 4
	미배양 박테리아	1 4 5 9 6 5 9 8 9
	미배양 박테리아	1 4 5 9 6 5 9 9 1
	비티스 비니페라(<i>Vitis vinifera</i>)	1 5 7 3 2 9 8 1 9
	볼페스 라고푸스(<i>Vulpes lagopus</i>)	1 5 8 3 4 6 7 6 2
		1 6 6 3 4 3 8 1 4
		JS0429
	볼페스 볼페스(<i>Vulpes vulpes</i>)	1 3 4 7 2 2

[0242]

[0243]

본 명세서 전체에 걸쳐, 리파아제 엔지니어링 데이터베이스 버전 3.0에 따라 특정 수퍼패밀리 및/또는 상동 패밀리로 나뉘는 효소의 예가 제공된다. 본 발명의 일 실시 형태에서, 본 발명의 지방 분해 효소는 이들 예시된 군 내의 지방 분해 효소들 중 임의의 하나 이상으로부터 선택될 수 있다.

[0244]

다른 실시 형태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 지방 분해 효소는 하기 속 중 하나 이상으로부터 유래될 수 있다: 썬모마이세스속 (바람직하게는 티. 라누기노수스), 썬모비피다속 (바람직하게는, 티. 푸스카), 슈도모나스속 (바람직하게는 피. 알칼리게네스(*P. alcaligenes*)) 및 스트렙토마이세스속 (바람직하게는 에스. 프리스티나 에스피랄리스).

[0245]

적합하게는, 지방 분해 효소는 하기 아미노산 서열들 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0246]

a) 서열 번호 11의 서열;

[0247]

b) 서열 번호 15의 서열;

[0248]

c) 서열 번호 16의 서열;

[0249]

d) 서열 번호 17의 서열;

[0250]

e) a) 내지 d)에 정의된 아미노산 서열들 중 임의의 하나에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 아미노산 서열; 또는

[0251]

f) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 a) 내지 d) 중 임의의 하나에 기술된 바와 같은 그리고 지방 분해 효소 활성을 갖는 아미노산 서열.

[0252]

적합하게는, 지방 분해 효소는 abH 15 수퍼패밀리, 바람직하게는 abH 15.01 수퍼패밀리에 속할 수 있다.

- [0253] 적합하게는, 지방 분해 효소는 하기 아미노산 서열들 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0254] a) 서열 번호 25의 서열;
- [0255] b) 서열 번호 26의 서열;
- [0256] c) 도 36에 나타난 바와 같이 신호 펩티드가 결여된 서열 번호 25의 서열;
- [0257] d) a) 내지 c)에 정의된 아미노산 서열들 중 임의의 하나에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 아미노산 서열; 또는
- [0258] e) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 a) 내지 c) 중 임의의 하나에 기술된 바와 같은 그리고 지방 분해 효소 활성을 갖는 아미노산 서열.
- [0259] 적합하게는, 지방 분해 효소는 지오바실러스 종, 바람직하게는 지. 스테아로써모필루스 주 T1로부터 클로닝된 리파아제(GeoT1), 예를 들어 서열 번호 25에 나타난 것을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 지방 분해 효소, 예를 들어 GeoT1은 서열 번호 26에 나타난 것과 같이 박테리아 셀룰로오스의 촉매 도메인의 카르복시-말단에 융합된다. 일부 실시 형태에서, 박테리아 셀룰라아제는 네덜란드 바른 소재의 센트럴 뷰로 부어 쉘멜컬처스(Central Bureau voor Schimmelcultures; CBS)에 CBS 670.93 (BCE103으로 칭해짐)으로 기탁된 바실러스 주로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, 지방 분해 효소, 예를 들어 GeoT1은 절단가능한 링커에 의해 BCE103 셀룰라아제에 연결된다. 따라서, 일부 실시 형태에서 지방 분해 효소, 예를 들어 GeoT1은 융합 단백질이 아니다.
- [0260] 적합하게는, 지방 분해 효소는 abH 18 수퍼패밀리, 바람직하게는 abH 18.01 수퍼패밀리에 속할 수 있다.
- [0261] 적합하게는, 지방 분해 효소는 하기 아미노산 서열들 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0262] f) 서열 번호 27의 서열;
- [0263] g) 서열 번호 28의 서열;
- [0264] h) 도 36에 나타난 바와 같이 신호 펩티드가 결여된 서열 번호 27의 서열;
- [0265] i) a) 내지 c)에 정의된 아미노산 서열들 중 임의의 하나에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 아미노산 서열; 또는
- [0266] j) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 a) 내지 c) 중 임의의 하나에 기술된 바와 같은 그리고 지방 분해 효소 활성을 갖는 아미노산 서열.
- [0267] 적합하게는, 지방 분해 효소는 바실러스 서브틸리스로부터 클로닝된 리파아제, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스 유래의 리파아제A (LipA), 예를 들어 서열 번호 27에 나타난 것을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 지방 분해 효소, 예를 들어 LipA는 서열 번호 28에 나타난 것과 같이 박테리아 셀룰로오스의 촉매 도메인의 카르복시-말단에 융합된다. 일부 실시 형태에서, 박테리아 셀룰라아제는 네덜란드 바른 소재의 센트럴 뷰로 부어 쉘멜컬처스에 CBS 670.93 (BCE103으로 칭해짐)으로 기탁된 바실러스 주로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, 지방 분해 효소, 예를 들어 LipA는 절단가능한 링커에 의해 BCE103 셀룰라아제에 연결된다. 따라서, 일부 실시 형태에서 지방 분해 효소, 예를 들어 LipA는 융합 단백질이 아니다.
- [0268] 일 태양에서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "리파아제", "리파아제 효소", "지방 분해 효소", "지방 분해 폴리펩티드", 또는 "지방 분해 단백질"은 지질 분해 능력, 예를 들어 트라이글리세라이드 또는 인지질을 분해하는 능력을 나타내는 효소, 폴리펩티드 또는 단백질을 말한다. 지방 분해 효소는 예를 들어 리파아제, 포스포리파아제, 에스테라아제 또는 큐티나아제일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 지방 분해 활성은 본 기술 분야에 공지된 임의의 절차에 따라 결정될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Gupta *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, 37:63-71]; 미국 특허 제5,990,069호; 및 국제특허 공개 WO 96/18729호 참조).
- [0269] 일 태양에서, 본 발명은 하기를 포함하는 세제 또는 세정 조성물을 제공한다:

- [0270] a) 서열 번호 17에 나타난 폴리펩티드 또는 리파아제 활성을 갖는 이의 단편;
- [0271] b) 서열 번호 17로 나타난 아미노산 서열에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상이며 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0272] c) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 서열 번호 17에 기술된 바와 같은 그리고 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0273] d) 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드;
- [0274] e) 서열 번호 23으로 나타난 아미노산 서열에 대하여 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0275] f) 엄격한 조건 하에 서열 번호 23의 핵산 서열의 상보체에 혼성화되는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0276] g) 스트렙토마이세스 (바람직하게는 에스. 프리스티나에스피랄리스)로부터 수득가능한 (바람직하게는 수득되는), 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [0277] 적합하게는, 상기 폴리펩티드는 조성물의 총 중량의 0.01 내지 2 중량ppm의 농도로 존재할 수 있다. 본 조성물은 프로테아제, 아밀라아제, 글루코아밀라아제, 말토스 생성(maltogenic) 아밀라아제, 말토스 비생성(non-maltogenic) 아밀라아제, 리파아제, 큐티나아제, 카보하이드라아제, 셀룰라아제, 펙티나아제, 만난아제, 아라비나아제, 갈락타나아제, 자일라나아제, 옥시다아제, 락카아제, 퍼옥시다아제, 및 아실 트랜스퍼라아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소를 추가로 포함할 수 있다.
- [0278] 적합하게는, 본 조성물은 하나 이상의 계면활성제, 예를 들어 비이온성 (반극성을 포함함), 음이온성, 양이온성 및 쯔비터이온성 계면활성제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0279] 적합하게는, 본 조성물은 분말 형태로 존재할 수 있거나 또는 액체 형태로 존재할 수 있다.
- [0280] 본 발명은 표면을 하기를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계에 의해 지질-기재 얼룩을 표면으로부터 제거하는 방법을 추가로 제공한다:
- [0281] a) 서열 번호 17에 나타난 폴리펩티드 또는 리파아제 활성을 갖는 이의 단편;
- [0282] b) 서열 번호 17로 나타난 아미노산 서열에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상이며 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0283] c) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 서열 번호 17에 기술된 바와 같은 그리고 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0284] d) 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드;
- [0285] e) 서열 번호 23으로 나타난 아미노산 서열에 대하여 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;

- [0286] f) 엄격한 조건 하에 서열 번호 23의 핵산 서열의 상보체에 혼성화되는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0287] g) 스트렙토마이세스 (바람직하게는 에스. 프리스티나에스피랄리스)로부터 수득가능한 (바람직하게는 수득되는), 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [0288] 다른 태양에서, 본 발명은 세정에 있어서 및/또는 세제에 있어서 하기를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다:
- [0289] a) 서열 번호 17에 나타난 폴리펩티드 또는 리파아제 활성을 갖는 이의 단편;
- [0290] b) 서열 번호 17로 나타난 아미노산 서열에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상이며 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0291] c) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 서열 번호 17에 기술된 바와 같은 그리고 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0292] d) 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드;
- [0293] e) 서열 번호 23으로 나타난 아미노산 서열에 대하여 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0294] f) 엄격한 조건 하에 서열 번호 23의 핵산 서열의 상보체에 혼성화되는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0295] g) 스트렙토마이세스 (바람직하게는 에스. 프리스티나에스피랄리스)로부터 수득가능한 (바람직하게는 수득되는), 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [0296] 예를 들어, 이러한 용도는 지질 얼룩을 표면으로부터 감소시키거나 또는 제거하기 위한 것일 수 있다.
- [0297] 다른 태양에서, 본 발명은 표면을 하기를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 표면을 세정하는 방법을 제공한다:
- [0298] a) 서열 번호 17에 나타난 폴리펩티드 또는 리파아제 활성을 갖는 이의 단편;
- [0299] b) 서열 번호 17로 나타난 아미노산 서열에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상이며 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0300] c) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 서열 번호 17에 기술된 바와 같은 그리고 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0301] d) 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드;
- [0302] e) 서열 번호 23으로 나타난 아미노산 서열에 대하여 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0303] f) 엄격한 조건 하에 서열 번호 23의 핵산 서열의 상보체에 혼성화되는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제

활성을 갖는 폴리펩티드; 또는

- [0304] g) 스트렙토마이세스 (바람직하게는 에스. 프리스티나에스피탈리스)로부터 수득가능한 (바람직하게는 수득되는), 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [0305] 추가의 태양에서, 본 발명은 물품을 하기를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 물품을 세정하는 방법을 제공한다:
- [0306] a) 서열 번호 17에 나타난 폴리펩티드 또는 리파아제 활성을 갖는 이의 단편;
- [0307] b) 서열 번호 17로 나타난 아미노산 서열에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상이며 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0308] c) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 서열 번호 17에 기술된 바와 같은 그리고 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0309] d) 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드;
- [0310] e) 서열 번호 23으로 나타난 아미노산 서열에 대하여 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0311] f) 엄격한 조건 하에 서열 번호 23의 핵산 서열의 상보체에 혼성화되는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0312] g) 스트렙토마이세스 (바람직하게는 에스. 프리스티나에스피탈리스)로부터 수득가능한 (바람직하게는 수득되는), 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [0313] 적합하게는, 물품은 의류 물품 또는 식탁용 식기류 물품일 수 있다.
- [0314] 본 발명은 지방 분해 효소 및 하이드로포빈을 포함하는 조성물의 많은 응용, 방법 및 용도를 제공한다. 의심을 피하기 위하여, 이들 응용, 방법 및 용도 각각은 하기를 포함하는 조성물에 적용될 수 있다:
- [0315] a) 서열 번호 17에 나타난 폴리펩티드 또는 리파아제 활성을 갖는 이의 단편;
- [0316] b) 서열 번호 17로 나타난 아미노산 서열에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상이며 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드; 또는
- [0317] c) 하나 또는 수 개의 변형(즉, 결실, 치환 및/또는 삽입), 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개의 아미노산 변형, 또는 그보다 더 많은 아미노산 변형, 예를 들어 10개의 아미노산 변형을 제외하고는 서열 번호 17에 기술된 바와 같은 그리고 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0318] d) 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드;
- [0319] e) 서열 번호 23으로 나타난 아미노산 서열에 대하여 또는 유전자 암호의 축퇴에 의해 서열 번호 23의 뉴클레오티드 서열에 관련되는 핵산에 대하여 동일성이 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 91% 이상, 바람직하게는 92% 이상, 바람직하게는 93% 이상, 바람직하게는 94% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상, 또는 바람직하게는 99% 이상인 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드;
- [0320] f) 엄격한 조건 하에 서열 번호 23의 핵산 서열의 상보체에 혼성화되는 핵산 서열에 의해 코딩되는, 리파아제

활성을 갖는 폴리펩티드; 또는

- [0321] g) 스트렙토마이세스 (바람직하게는 에스. 프리스티나에스피탈리스)로부터 수득가능한 (바람직하게는 수득되는), 리파아제 활성을 갖는 폴리펩티드.
- [0322] 숙주 세포
- [0323] 본 발명과 관련하여 어구 "숙주 세포"는 상기에 기재된 뉴클레오티드 서열 또는 발현 벡터 중 어느 하나를 포함하며, 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 효소의 재조합적 생성에서 사용되는 임의의 세포를 포함한다.
- [0324] 따라서, 본 발명의 추가의 실시 형태는 본 발명의 효소를 발현시키는 뉴클레오티드 서열로 형질전환되거나 또는 트랜스펙션된 숙주 세포를 제공한다. 이 세포는 상기 벡터와 양립가능하도록 선택될 것이며, 예를 들어 원핵 세포 (예를 들어 박테리아 세포), 진균류 세포, 효모 세포 또는 식물 세포일 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 인간 세포가 아니다.
- [0325] 적합한 박테리아 숙주 유기체의 예로는 그람(gram) 양성 또는 그람 음성 박테리아 종이 있다.
- [0326] 본 발명의 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 성질 및/또는 발현 단백질의 추가의 프로세싱에 대한 바람직함에 따라, 진핵 숙주, 예를 들어 효모 또는 다른 진균류가 바람직할 수 있다. 그러나, 일부 단백질은 효모 세포로부터 저조하게 분비되거나 또는 일부의 경우에 적당하게 프로세싱되지 않는다 (예를 들어, 효모에서 과글리코실화). 이들 경우에서, 상이한 진균류 숙주 유기체가 선택되어야 한다.
- [0327] 적합한 숙주 세포 - 예컨대 효모, 진균류 및 식물 숙주 세포 - 의 사용은 최적의 생물학적 활성을 본 발명의 재조합 발현 생성물에 부여하는 데 필요할 수 있는 번역 후 변형 (예를 들어, 미리스토일화, 글리코실화, 절단, 지질화 및 타이로신, 세린 또는 트레오닌 포스포릴화, 또는 N-말단 아세틸화)을 제공할 수 있다.
- [0328] 숙주 세포는 프로테아제 결핍 주 또는 프로테아제가 없는 주일 수 있다.
- [0329] 숙주 세포의 유전자형은 발현이 개선되도록 변형될 수 있다.
- [0330] 숙주 세포 변형의 예에는 프로테아제 결핍, 회귀 tRNA의 보충, 및 다이설파이드 결합 형성을 향상시키기 위한 세포질에서의 환원 전위의 변형이 포함된다.
- [0331] 예를 들어, 숙주 세포 이. 콜라이(*E. coli*)는 문헌[Kane, *Curr Opin Biotechnol* (1995), 6, 494-500 "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*"]에 예시된/기재된 바와 같이 이중성 단백질의 발현을 개선시키기 위하여 회귀 tRNA를 과다발현시킬 수 있다. 숙주 세포는 다수의 환원 효소가 결핍될 수 있으며, 따라서 안정한 다이설파이드 결합의 형성이 유리해지는데, 이는 문헌[Bessette, *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm"]에 예시된/기재된 바와 같다.
- [0332] 단리
- [0333] 일 태양에서, 본 발명에서 사용하기 위한 효소는 단리된 형태로 존재할 수 있다.
- [0334] 용어 "단리된"은 서열 또는 단백질이, 자연에서 이 서열 또는 단백질에 천연적으로 회합된 그리고 자연에서 발견되는 적어도 하나의 다른 성분이 적어도 사실상 없음을 의미한다.
- [0335] 정제
- [0336] 일 태양에서, 본 발명에서 사용하기 위한 효소는 정제된 형태로 사용될 수 있다.
- [0337] 용어 "정제된"은 서열이 상대적으로 순수한 상태로, 예를 들어 적어도 약 51% 순수한 상태, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 순수한 상태로, 또는 적어도 약 95% 순수한 상태 또는 적어도 약 98% 순수한 상태로 존재함을 의미한다.
- [0338] 본 발명에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 클로닝
- [0339] 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드 또는 변형에 적합한 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 상기 폴리펩티드를 생성하는 임의의 세포 또는 유기체로부터 단리될 수 있다. 다양한 방법이 뉴클레오티드 서열의 단리 분야 내에서 잘 알려져 있다.
- [0340] 예를 들어, 게놈 DNA 및/또는 cDNA 라이브러리는 폴리펩티드를 생성하는 유기체로부터의 염색체 DNA 또는 메신

저(messenger) RNA를 사용하여 제작될 수 있다. 폴리펩티드의 아미노산 서열이 공지되어 있을 경우, 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성하고 이를 사용하여 유기체로부터 제조된 게놈 라이브러리로부터 폴리펩티드 코딩 클론을 확인할 수 있다. 대안적으로, 다른 공지된 폴리펩티드 유전자에 대하여 상동성인 서열을 함유하는 표지된 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 폴리펩티드 코딩 클론을 확인할 수 있다. 후자의 경우에, 낮은 엄격도의 혼성화 및 세척 조건이 사용된다.

[0341] 대안적으로, 폴리펩티드 코딩 클론은 게놈 DNA의 단편을 발현 벡터, 예를 들어 플라스미드 내로 삽입하고, 생성된 게놈 DNA 라이브러리를 이용하여 효소-음성 박테리아를 형질전환시키고, 그 후 형질전환된 박테리아를 폴리펩티드에 의해 저해되는 효소를 함유하는 한천 상에 도말하고 이럼으로써 폴리펩티드를 발현하는 클론을 확인함에 의해 확인할 수 있다.

[0342] 다른 추가의 대안에서, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 확립된 표준 방법, 예를 들어 문헌[Beucage S.L. et al. (1981) Tetrahedron Letters 22, 1859-1869]에 기재된 포스포로아미다이트법, 또는 문헌[Matthes et al. (1984) EMBO J. 3, 801-805]에 기재된 방법에 의해 합성 제조될 수 있다. 포스포로아미다이트법에서, 예를 들어 자동 DNA 합성기에서 올리고뉴클레오티드를 합성하고, 정제하고, 어닐링하고, 라이게이션시키고, 적절한 벡터 내에 클로닝한다.

[0343] 뉴클레오티드 서열은 혼합된 게놈 및 합성 기원, 혼합된 합성 및 cDNA 기원, 또는 혼합된 게놈 및 cDNA 기원의 것일 수 있으며, 이는 표준 기술에 따라 합성, 게놈 또는 cDNA 기원 (적절한 경우)의 단편들의 라이게이션에 의해 제조된다. 각각의 라이게이션된 단편은 전체 뉴클레오티드 서열의 다양한 부분에 상응한다. 또한 DNA 서열은 예를 들어 미국 특허 제4,683,202호 또는 문헌[Saiki R K et al., Science (1988) 239, 487-491]에 기재된 바와 같이 특정 프라이머를 사용하여 폴리머라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)에 의해 제조될 수 있다.

[0344] 뉴클레오티드 서열

[0345] 또한 본 발명은 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "뉴클레오티드 서열"은 올리고뉴클레오티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열, 및 이의 변이체, 상동체, 단편 및 유도체 (예를 들어 이의 부분)를 말한다. 뉴클레오티드 서열은 게놈 또는 합성 또는 재조합 기원의 것일 수 있으며, 이는 센스 가닥을 나타내든지 안티센스 가닥을 나타내든지 간에 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다.

[0346] 본 발명과 관련하여 어구 "뉴클레오티드 서열"은 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA, 및 RNA를 포함한다. 바람직하게는 이것은 코딩 서열의 DNA, 더 바람직하게는 cDNA를 의미한다.

[0347] 바람직한 실시 형태에서, 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 그 자체는, 이것이 그의/그들의 자연 환경에 또한 존재하는 그의 자연적으로 결부된 서열(들)에 연결될 때 그의 자연 환경에서의 천연 뉴클레오티드 서열을 커버하지 않는다. 언급의 용이함을 위하여, 본 발명자는 이 바람직한 실시 형태를 "비천연 뉴클레오티드 서열"로 부를 것이다. 이와 관련하여, 어구 "천연 뉴클레오티드 서열"은 그의 자연 환경 내에 있는 그리고 그가 자연적으로 결부된 전체 프로모터에 작동가능하게 연결되는 경우의 전체 뉴클레오티드 서열을 의미하는데, 상기 프로모터도 그의 자연 환경 내에 있다.

[0348] 그러나, 본 발명의 범주에 포함되는 아미노산 서열은 그의 천연 유기체에서의 뉴클레오티드 서열의 발현 후 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 본 발명의 범주에 포함되는 아미노산 서열은, 그의 천연 유기체 내에서 뉴클레오티드 서열에 의해 발현될 수 있지만, 상기 뉴클레오티드 서열은 상기 유기체 내에서 그가 천연적으로 결부되는 프로모터의 제어 하에 있는 것은 아니다.

[0349] 바람직하게는 폴리펩티드는 천연 폴리펩티드가 아니다. 이와 관련하여, 어구 "천연 폴리펩티드"는 그의 자연 환경 내에 있으며, 이것이 그의 천연 뉴클레오티드 서열에 의해 발현되었을 경우의 전체 폴리펩티드를 의미한다.

[0350] 전형적으로, 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조된다 (즉, 재조합 DNA). 그러나, 본 발명의 대안적인 실시 형태에서, 뉴클레오티드 서열은 본 기술 분야에 잘 알려진 화학적 방법을 이용하여 전체적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있다 (문헌 [Caruthers MH et al. (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 and Horn T et al. (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232] 참조).

- [0351] 분자 진화
- [0352] 일단 효소-코딩 뉴클레오티드 서열이 단리되었거나, 또는 추정 효소-코딩 뉴클레오티드 서열이 확인되었으면, 선택된 뉴클레오티드 서열을 변형시키는 것이 바람직할 수 있으며, 예를 들어, 본 발명에 따른 효소를 제조하기 위하여 상기 서열을 돌연변이시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0353] 돌연변이는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 도입될 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 원하는 돌연변이 부위의 측면에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다.
- [0354] 적합한 방법은 문헌[Morinaga et al., Biotechnology (1984) 2, 646-649]에 개시되어 있다. 효소-코딩 뉴클레오티드 서열 내로 돌연변이를 도입하는 다른 방법은 문헌[Nelson and Long, Analytical Biochemistry (1989), 180, 147-151]에 기재되어 있다.
- [0355] 상기에 기재된 바와 같은 부위 지정 돌연변이 유발 대신, 예를 들어 상업적 키트, 예컨대 스트라타진(Stratagene)으로부터의 진모르프(GeneMorph) PCR 돌연변이 유발 키트, 또는 클론테크(Clontech)로부터의 다이버시파이(Diversify) PCR 랜덤 돌연변이 유발 키트를 사용하여 돌연변이를 랜덤하게 도입할 수 있다. 유럽 특허 제0 583 265호에는 PCR 기반의 돌연변이 유발의 최적화 방법이 언급되어 있으며, 이는 유럽 특허 제0 866 796호에 기재된 것과 같은 돌연변이 유발 DNA 유사체의 사용과 또한 조합될 수 있다. 오류 발생이 쉬운(error prone) PCR 기술은 바람직한 특징을 갖는 지질 아실 트랜스퍼라아제의 변이체의 생성에 적합하다. 국제특허 공개 WO 02/06457호에는 리파아제의 분자 진화가 언급되어 있다.
- [0356] 신규한 서열을 획득하는 세 번째 방법은 임의의 수의 제한 효소 또는 Dnase I과 같은 효소를 사용함으로써 동일하지 않은 뉴클레오티드 서열을 단편화하고, 기능성 단백질을 코딩하는 전 뉴클레오티드 서열들을 재조합함에 의한 것이다. 대안적으로, 하나의 또는 다수의 동일하지 않은 뉴클레오티드를 사용하여 전 뉴클레오티드 서열의 재조합 동안 돌연변이를 도입할 수 있다. DNA 셔플링(shuffling) 및 패밀리 셔플링 기술은 바람직한 특징을 갖는 지질 아실 트랜스퍼라아제의 변이체의 생성에 적합하다. '셔플링'을 수행하기에 적합한 방법은 유럽 특허 제0 752 008호, 유럽 특허 제1 138 763호, 유럽 특허 제1 103 606호에서 찾아볼 수 있다. 또한 셔플링은 미국 특허 제6,180,406호 및 국제특허 공개 WO 01/34835호에 기재된 바와 같이 DNA 돌연변이 유발의 다른 형태와 조합될 수 있다.
- [0357] 따라서, 다수의 부위 지정 돌연변이 또는 랜덤 돌연변이를 생체 내에서 또는 시험관 내에서 뉴클레오티드 서열 내에 생성하고, 후속적으로, 코딩된 폴리펩티드의 개선된 기능성에 대하여 다양한 수단에 의해 스크리닝하는 것이 가능하다. 인실리코(*in silico*) 및 엑소(exo)-매개 재조합 방법(예를 들어, 국제특허 공개 WO 00/58517호, 미국 특허 제6,344,328호, 미국 특허 제6,361,974호 참조)을 이용하여, 예를 들어 분자 진화를 수행할 수 있으며, 여기서, 생성된 변이체는 공지된 효소 또는 단백질에 대하여 매우 낮은 상동성을 보유한다. 이럼으로써 수득된 이러한 변이체는 공지된 트랜스퍼라아제 효소에 대하여 상당한 구조적 유사성을 갖지만, 매우 낮은 아미노산 서열 상동성을 가질 수 있다.
- [0358] 게다가, 비제한적 예로서, 폴리뉴클레오티드 서열의 돌연변이 또는 천연 변이체를 야생형 또는 다른 돌연변이 또는 천연 변이체와 재조합시켜 새로운 변이체를 생성할 수 있다. 이러한 새로운 변이체는 또한 코딩된 폴리펩티드의 개선된 기능성에 대하여 스크리닝될 수 있다.
- [0359] 상기에 언급된 응용 및 유사한 분자 진화 방법은 단백질 구조 또는 기능에 대한 어떠한 종래의 지식 없이도 바람직한 특징을 갖는 본 발명의 효소의 변이체의 확인 및 선별을 허용하며, 예측불가능한 그러나 유익한 돌연변이 또는 변이체의 생성을 허용한다. 효소 활성의 최적화 또는 변경에 있어서 본 기술 분야에서 분자 진화의 응용의 다수의 예가 있으며, 이러한 예는 하기 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 숙주 세포에서의 또는 시험관 내에서의 최적화된 발현 및/또는 활성, 증가된 효소 활성, 변경된 기질 및/또는 생성물 특이성, 증가된 또는 감소된 효소 또는 구조 안정성, 바람직한 환경 조건, 예를 들어 온도, pH, 기질에서 변경된 효소 활성/특이성.
- [0360] 당업자에게 자명해지는 바와 같이, 분자 진화 툴(tool)을 이용하여 효소를 효소의 기능성이 개선되도록 변경시킬 수 있다.
- [0361] 적합하게는, 본 발명에서 사용되는 지방 분해 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 변이체를 코딩할 수 있으며, 즉, 지방 분해 효소는 모 효소(parental enzyme)와 비교할 때 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 함유할 수 있다. 변이체형 효소는 모 효소와의, 적어도 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 99%의 상동성을 보유한다.

- [0362] 변이체형 지방 분해 효소는 모 효소와 비교하여 트라이글리세라이드 및/또는 모노글리세라이드 및/또는 다이글리세라이드에 대하여 감소된 활성을 가질 수 있다.
- [0363] 적합하게는, 변이체형 효소는 트라이글리세라이드 및/또는 모노글리세라이드 및/또는 다이글리세라이드에 대하여 활성을 전혀 갖지 않을 수 있다.
- [0364] 대안적으로, 변이체형 효소는 증가된 열안정성을 가질 수 있다.
- [0365] 변이체형 효소는 하기, 즉, 극성 지질, 인지질, 레시틴, 포스파티딜콜린, 당지질, 다이갈락토실 모노글리세라이드, 모노갈락토실 모노글리세라이드 중 하나 이상에 대하여 증가된 활성을 가질 수 있다.
- [0366] 지질 아실트랜스퍼라제의 변이체가 공지되어 있으며, 이러한 변이체들 중 하나 이상은 본 발명에 따른 방법 및 용도에서 및/또는 본 발명에 따른 효소 조성물에서 사용하기에 적합할 수 있다. 단지 예로서, 지질 아실트랜스퍼라제의 변이체는 하기 참고 문헌에 기재되어 있으며, 본 발명에 따라 사용될 수 있다: 문헌[Hilton & Buckley *J. Biol. Chem.* 1991 Jan 15; 266 : 997-1000]; 문헌[Robertson *et al. J. Biol. Chem.* 1994 Jan 21; 269: 2146-50]; 문헌[Brumlik *et al. J. Bacteriol.* 1996 Apr; 178 : 2060-4]; 문헌[Peelman *et al. Protein Sci.* 1998 Mar; 7:587-99].
- [0367] 아미노산 서열
- [0368] 또한 본 발명은 본 발명의 방법 및/또는 용도 중 임의의 하나에서 사용하기 위한 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열의 용도를 포함한다.
- [0369] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "아미노산 서열"은 용어 "폴리펩티드" 및/또는 용어 "단백질"과 동의어이다. 일부 예에서, 어구 "아미노산 서열"은 용어 "펩티드"와 동의어이다. 일부 예에서, 어구 "아미노산 서열"은 "효소"와 동의어이다.
- [0370] 아미노산 서열은 적합한 공급원으로부터 제조/단리될 수 있거나, 또는 이것은 합성에 의해 만들어질 수 있거나, 또는 이것은 재조합 DNA 기술의 사용에 의해 제조될 수 있다.
- [0371] 적합하게는, 아미노산 서열은 표준 기술에 의해 본 명세서에 교시된 단리된 폴리펩티드로부터 수득될 수 있다.
- [0372] 단리된 폴리펩티드로부터 아미노산 서열을 결정하는 하나의 적합한 방법은 하기와 같다:
- [0373] 정제된 폴리펩티드는 동결 건조될 수 있으며, 100 μ g의 동결 건조된 물질은 8 M 우레아와 0.4 M 탄산수소암모늄 (pH 8.4)의 혼합물 50 μ l에 용해시킬 수 있다. 용해된 단백질은 질소를 이용한 오버레이(overlay) 및 5 μ l의 45 mM 다이티오프로판의 첨가 후 50°C에서 15분 동안 변성시키고 환원시킬 수 있다. 실온으로 냉각시킨 후, 5 μ l의 100 mM 요오도아세트아미드를 첨가하여 시스테인 잔기가 질소 하에서 암소에서 실온에서 15분 동안 유도체화되게 할 수 있다.
- [0374] 135 μ l의 물과, 물 5 μ l 중 엔도프로테이나아제 Lys-C 5 μ g를 상기 반응 혼합물에 첨가할 수 있으며, 절단은 질소 하에서 37°C에서 24시간 동안 실시될 수 있다.
- [0375] 생성된 펩티드는 역상 HPLC에 의해 VYDAC C18 컬럼 (0.46 $\times$ 15 cm;10 μ m; 미국 캘리포니아주 소재의 더 세퍼레이션 그룹(The Separation Group))에서, 물 중 0.1% TFA의 용매 A 및 아세트ونی트릴 중 0.1% TFA의 용매 B를 이용하여 분리될 수 있다. 선택된 펩티드는 N-말단 서열결정 이전에 동일 용매 시스템을 사용하여 데벨로실(Develosil) C18 컬럼에서 재크로마토그래피될 수 있다. 서열결정은 제조업자의 지시에 따라 펄스 액체 고속 사이클(pulsed liquid fast cycle)을 이용하여 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 476A 서열결정기를 사용하여 행해질 수 있다 (미국 캘리포니아주 소재의 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies)).
- [0376] 서열 동일성 또는 서열 상동성
- [0377] 여기서, 용어 "상동체"는 본 아미노산 서열 및 본 뉴클레오티드 서열과 특정한 상동성을 갖는 엔티티(entity)를 의미한다. 여기서, 용어 "상동성"은 "동일성"과 동일시될 수 있다.
- [0378] 상동 아미노산 서열 및/또는 뉴클레오티드 서열은 기능적 활성을 유지하는 및/또는 효소의 활성을 향상시키는 폴리펩티드를 제공하고/하거나 코딩해야 한다.
- [0379] 본 발명의 맥락에서, 상동 서열은 본 서열에 대하여 적어도 50%, 55%, 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,

80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있는, 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함하도록 취해진다. 전형적으로, 상동체는 본 아미노산 서열과 동일한 활성 부위 등을 포함할 것이다. 상동성은 또한 유사성 (즉, 유사한 화학적 특성/기능을 갖는 아미노산 잔기) 면에서 고려될 수 있지만, 본 발명의 맥락에서, 서열 동일성 면에서 상동성을 표현하는 것이 바람직하다.

[0380] 본 발명의 맥락에서, 상동 서열은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (본 서열)에 대하여 적어도 75, 85 또는 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있는, 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하도록 취해진다. 전형적으로, 상동체는 본 서열과 동일한, 활성 부위 등을 코딩하는 서열을 포함할 것이다. 상동성은 또한 유사성 (즉, 유사한 화학적 특성/기능을 갖는 아미노산 잔기) 면에서 고려될 수 있지만, 본 발명의 맥락에서, 서열 동일성 면에서 상동성을 표현하는 것이 바람직하다.

[0381] 상동성 비교는 눈으로 또는 더욱 일반적으로는 쉽게 입수가능한 서열 비교 프로그램의 도움으로 행해질 수 있다. 이들 구매가능한 컴퓨터 프로그램은 둘 이상의 서열들 사이의 상동성 (%)을 계산할 수 있다.

[0382] 상동성 (%)은 연결 서열들에서 계산될 수 있으며, 즉, 하나의 서열을 다른 하나의 서열과 맞추고, 하나의 서열 내의 각각의 아미노산을, 한 번에 하나의 잔기씩, 다른 하나의 서열 내의 상응하는 아미노산과 직접적으로 비교한다. 이는 "갭이 없는(ungapped)" 정렬로 칭해진다. 전형적으로, 이러한 갭이 없는 정렬은 단지 상대적으로 짧은 수의 잔기에서 수행된다.

[0383] 이것이 매우 간단하고 일관적인 방법이지만, 이것은 예를 들어 달리 동일한 서열 쌍에서, 하나의 삽입 또는 결실에 의해 이후의 아미노산 잔기가 정렬 밖에 있게 되고 따라서 잠재적으로는 글로벌 정렬(global alignment)이 수행될 때 상동성 (%)이 크게 감소되게 할 것임을 고려하지 못한다. 그 결과, 대부분의 서열 비교 방법은 전체 상동성 스코어에 과도하게 벌칙을 주지 않고서 가능한 삽입 및 결실을 고려하는 최적 정렬을 생성하도록 설계된다. 이는 국소적 상동성을 최대화하려고 하기 위하여 서열 정렬에서 "갭"을 삽입함으로써 성취된다.

[0384] 그러나, 이들 더욱 복잡한 방법은 "갭 페널티"(gap penalty)를 정렬에서 나타나는 각각의 갭에 할당하여서, 동일한 수의 동일한 아미노산의 경우 가능한 한 적은 갭에 의한 서열 정렬 - 두 비교 서열들 사이의 더욱 높은 관련성을 반영함 - 은 많은 갭을 갖는 것보다 더 높은 스코어를 성취할 것이다. "의사 갭 코스트"(affine gap cost)가 전형적으로 사용되며, 이는 갭의 존재에 대하여 상대적으로 높은 코스트를 청구하고 갭 내의 각각의 후속 잔기에 대하여 더 작은 페널티를 청구한다. 이는 가장 일반적으로 사용되는 갭 스코어링 시스템이다. 높은 갭 페널티는 물론 더욱 적은 갭에 의해 최적화 정렬을 생성할 것이다. 대부분의 정렬 프로그램은 갭 페널티가 변경되는 것을 허용한다. 그러나, 서열 비교를 위하여 이러한 소프트웨어를 사용할 때 디폴트(default) 값을 사용하는 것이 바람직하다.

[0385] 따라서, 최대 상동성 (%)의 계산은 먼저 갭 페널티를 고려하여 최적 정렬을 생성하는 것을 필요로 한다. 이러한 정렬을 실시하기에 적합한 컴퓨터 프로그램으로는 벡터(Vector) NTI (인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corp.))가 있다. 서열 비교를 수행할 수 있는 다른 소프트웨어의 예에는 BLAST 패키지 (문헌[Ausubel *et al.* 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18]), 및 FASTA (Altschul *et al.* 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410])가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. BLAST 및 FASTA 둘 모두는 오프라인 및 온라인 검색에 이용가능하다 (문헌[Ausubel *et al.* 1999, pages 7-58 to 7-60] 참조). 그러나, 일부 응용에 있어서, 벡터 NTI 프로그램을 사용하는 것이 바람직하다. BLAST 2 시퀀스(Sequences)로 칭해지는 새로운 툴이 또한 단백질 및 뉴클레오티드 서열 비교에 이용가능하다 (문헌[FEMS Microbiol Lett 1999 174: 247-50]; 문헌[FEMS Microbiol Lett 1999 177: 187-8] 및 tatiana@ncbi.nlm.nih.gov 참조).

[0386] 최종 상동성 (%)이 동일성 면에서 측정될 수 있지만, 정렬 과정 그 자체는 전형적으로 극단의 쌍 비교(all-or-nothing pair comparison)를 기반으로 하는 것이 아니다. 대신, 일반적으로 계량화된 유사성 스코어 매트릭스(scaled similarity score matrix)가 사용되며, 이는 스코어를 화학적 유사성 또는 진화적 거리를 기반으로 한 각각의 쌍별 비교에 할당한다. 일반적으로 사용되는 이러한 매트릭스의 예로는 BLOSUM62 매트릭스가 있으며, 이는 BLAST 프로그램 스위트(suite)의 디폴트 매트릭스이다. 일반적으로 벡터 NTI 프로그램은 공용 디폴트 값, 또는 공급될 경우 관습 기호 비교 표 (추가 상세 사항에 대해서는 사용자 매뉴얼을 참조) 중 어느 하나를 이용한다. 일부 응용에 있어서, 벡터 NTI 어드밴스(ADVANCE)TM 10 패키지의 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다.

[0387] 대안적으로, 상동성 백분율은 클러스탈(CLUSTAL)과 유사한 알고리즘을 기반으로 하여 벡터 NTI 어드밴스™ 10 (인비트로젠 코포레이션) 내의 다중 정렬 특징을 이용하여 계산될 수 있다 (문헌[Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73, 237-244]).

[0388] 일단 상기 소프트웨어가 최적 정렬을 생성하였으면, 상동성 (%), 바람직하게는 서열 동일성 (%)을 계산하는 것이 가능하다. 전형적으로 상기 소프트웨어는 서열 비교의 일부로서 이를 행하여 수치 값을 생성한다.

[0389] 적합하게는, 뉴클레오티스 서열과 관련된 동일성 정도는 20개 이상의 연결 뉴클레오티드, 바람직하게는 30개 이상의 연결 뉴클레오티드, 바람직하게는 40개 이상의 연결 뉴클레오티드, 바람직하게는 50개 이상의 연결 뉴클레오티드, 바람직하게는 60개 이상의 연결 뉴클레오티드, 바람직하게는 100개 이상의 연결 뉴클레오티드에서 결정된다.

[0390] 적합하게는, 뉴클레오티드 서열과 관련된 동일성의 정도는 전 서열에서 결정될 수 있다.

[0391] 서열 동일성을 결정할 때 갭 페널티가 사용된다면, 바람직하게는 프로그램의 디폴트 파라미터를 쌍별 정렬에 사용한다. 예를 들어, 하기 파라미터가 BLAST 2의 쌍별 정렬에 있어서의 현재 디폴트 파라미터이다:

BLAST 2의 경우	DNA	단백질
예상 역치	10	10
단어 크기	11	3
스코어링 파라미터		
매치/미스매치 스코어	2, -3	N/A
매트릭스	N/A	BLOSUM62
갭 코스트	존재: 5 연장: 2	존재: 11 연장: 1

[0392]

[0393] 일 실시 형태에서, 바람직하게는 뉴클레오티드 서열 및/또는 아미노산 서열의 서열 동일성은 상기에 정의된 스코어링 파라미터를 이용하여 BLAST2 (blastn)를 사용하여 결정될 수 있다.

[0394] 본 발명의 목적상, 동일성 정도는 동일한 서열 요소들의 수를 기반으로 한다. 아미노산 서열에 있어서 본 발명에 따른 동일성 정도는 본 기술 분야에 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 벡터 NTI 어드밴스™ 11 (인비트로젠 코포레이션)에 의해 적합하게 결정될 수 있다. 쌍별 정렬에 있어서, 사용되는 스코어링 파라미터는 바람직하게는 BLOSUM62이며, 이때 갭 존재 페널티는 11이고 갭 연장 페널티는 1이다.

[0395] 적합하게는, 아미노산 서열과 관련된 동일성 정도는 20개 이상의 연결 아미노산, 바람직하게는 30개 이상의 연결 아미노산, 바람직하게는 40개 이상의 연결 아미노산, 바람직하게는 50개 이상의 연결 아미노산, 바람직하게는 60개 이상의 연결 아미노산, 바람직하게는 100개 이상의 연결 아미노산에서 결정된다.

[0396] 적합하게는, 아미노산 서열과 관련된 동일성의 정도는 전 서열에서 결정될 수 있다.

[0397] 또한 서열은 사일런트(silent) 변화를 생성하고 기능적으로 등가인 물질을 생성하는 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 가질 수 있다. 당해 물질의 이차 결합 활성을 유지하기만 한다면, 잔기들의 극성, 전하, 용해성, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 성질의 유사성을 바탕으로 하여 고의적인 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하며; 양으로 하전된 아미노산은 라이신 및 아르기닌을 포함하며; 친수성 값이 유사한 하전되지 않은 극성 헤드(head) 기를 갖는 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 글라이신, 알라닌, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 타이로신을 포함한다.

[0398] 보존적 치환이 예를 들어 하기 표에 따라 이루어질 수 있다. 두 번째 컬럼 내의 동일 블록 내의, 그리고 바람직하게는 세 번째 컬럼 내의 동일 줄 내의 아미노산은 서로에 대하여 치환될 수 있다:

지 방 족	비 극 성	G A P
		I L V
	극 성 - 비 하 전	C S T M
		N Q
	극 성 - 하 전	D E
		K R
방 향 족		H F W Y

[0399]

[0400]

또한, 본 발명은 일어날 수 있는 상동적 치환 (치환 및 대체는 본 명세서에서 둘 모두 기존의 아미노산 잔기를 대안적인 잔기와 상호교환하는 것을 의미하도록 사용됨)을 포함하며, 즉, 유사한 것으로 치환하는 것(like-for-like substitution), 예를 들어, 염기성을 염기성으로, 산성을 산성으로, 극성을 극성으로 치환하는 것 등을 포함한다. 비상동적 치환이 또한 일어날 수 있으며, 즉, 하나의 부류의 잔기를 다른 것으로 치환하거나 또는 대안적으로 비천연 아미노산, 예를 들어 오르니틴 (이하, Z로 칭함), 다이아미노부티르산 오르니틴 (이하, B로 칭함), 노르류신 오르니틴 (이하, O로 칭함), 피리딜알라닌, 티에닐알라닌, 나프틸알라닌 및 페닐글리신의 포함을 수반한다.

[0401]

비천연 아미노산에 의한 대체가 또한 이루어질 수 있다.

[0402]

변이체형 아미노산 서열은 글라이신 또는 β -알라닌 잔기와 같은 아미노산 스페이서 뿐만 아니라 메틸, 에틸 또는 프로필 기와 같은 알킬 기를 비롯하여 서열의 임의의 두 아미노산 잔기 사이에 삽입될 수 있는 적합한 스페이서 기도 포함할 수 있다. 추가의 형태의 변이는 펩티드 형태의 하나 이상의 아미노산 잔기의 존재를 포함하며, 이는 당업자에 의해 잘 이해될 것이다. 의심을 피하기 위하여, "펩티드 형태"는 α -탄소 치환기가 α -탄소라기보다는 오히려 그 잔기의 질소 원자 상에 있는 변이체형 아미노산 잔기를 말하기 위하여 사용된다. 펩티드 형태의 펩티드를 제조하는 방법은 본 기술 분야, 예를 들어 문헌[Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) 89, 9367-9371] 및 문헌[Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13, 132-134]에 공지되어 있다.

[0403]

본 발명에서 사용하기 위한 또는 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 합성 또는 변형 뉴클레오티드를 뉴클레오티드 서열 내에 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 대한 다수의 상이한 유형의 변형이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 이들은 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 골격 및/또는 당해 분자의 3' 및/또는 5' 말단에서의 아크리딘 또는 폴리라이신 사슬의 부가를 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드 서열은 본 기술 분야에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있음이 이해되어야 한다. 이러한 변형은 뉴클레오티드 서열의 생체 내 활성 또는 수명을 향상시키기 위하여 실시될 수 있다.

[0404]

또한 본 발명은 본 명세서에 논의된 서열 또는 임의의 유도체에 대하여 상보적인 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 단편 또는 유도체의 사용을 포함한다. 상기 서열이 이의 단편에 대하여 상보성이라면, 그 서열은 다른 유기체 등에서 유사한 코딩 서열을 확인하기 위한 프로브로 사용될 수 있다.

[0405]

본 발명의 서열에 대하여 100% 상동성인 것은 아닌 그러나 본 발명의 범주 내에 있는 폴리뉴클레오티드가 다수의 방법으로 수득될 수 있다. 본 명세서에 기재된 서열의 다른 변이체가 예를 들어 일련의 개체, 예를 들어 상이한 집단으로부터의 개체로부터 만들어진 DNA 라이브러리의 프로빙에 의해 수득될 수 있다. 게다가, 다른 바이러스/박테리아 또는 세포 상동체, 특히 포유류 세포 (예를 들어, 쥐, 생쥐, 소 및 영장류 세포)에서 발견되는 세포 상동체가 수득될 수 있으며, 이러한 상동체 및 이의 단편은 일반적으로 본 명세서에서 서열 목록에 나타난 서열과 선택적으로 혼성화할 수 있을 것이다. 이러한 서열은 다른 동물 종으로부터 만들어진 cDNA 라이브러리 또는 다른 동물 종으로부터의 게놈 DNA 라이브러리를 프로빙하고, 중간 내지 높은 엄격도의 조건 하에서, 첨부된 서열 목록 내의 서열들 중 임의의 하나의 전부 또는 일부를 포함하는 프로브를 이용하여 이러한 라이브러리들을 프로빙함으로써 수득될 수 있다. 유사한 고려 사항이 본 발명의 폴리펩티드 또는 뉴클레오티드 서열의 중상동체 및 대립 형질 변이체 수득에 적용된다.

[0406]

변이체 및 주/중 상동체는 또한 축퇴 PCR을 이용하여 수득될 수 있으며, 상기 PCR에서는 본 발명의 서열 내의 보존된 아미노산 서열을 코딩하는 상동체 및 변이체 내의 서열을 표적화하도록 설계된 프라이머가 사용될 것이다. 보존된 서열은 예를 들어 몇몇 변이체/상동체로부터의 아미노산 서열들의 정렬에 의해 예측될 수 있다. 서열 정렬은 본 기술 분야에 공지된 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, GCG 위스콘신

파일업(Wisconsin PileUp) 프로그램이 널리 사용된다.

- [0407] 축퇴 PCR에서 사용되는 프라이머는 하나 이상의 축퇴 위치를 함유할 것이며, 공지된 서열에 대한 단일 서열 프라이머를 이용한 서열 클로닝에 사용되는 것보다 더 낮은 엄격도 조건에서 사용될 것이다.
- [0408] 대안적으로, 이러한 폴리뉴클레오티드는 특성화된 서열의 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 수득될 수 있다. 이는 예를 들어 폴리뉴클레오티드 서열이 발현되고 있는 특정 숙주 세포에 있어서 코돈 선호성을 최적화하기 위하여 사일런트 코돈 서열 변화가 필요할 경우 유용할 수 있다. 제한 폴리펩티드 인식 부위를 도입하기 위하여, 또는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 특성 또는 기능을 변경하기 위하여 다른 서열 변화가 요구될 수 있다.
- [0409] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 (뉴클레오티드 서열)를 이용하여 프라이머, 예를 들어 PCR 프라이머, 대안적인 증폭 반응을 위한 프라이머, 예를 들어 방사성 또는 비방사성 표지체를 이용하여 통상적인 수단에 의해 현시적 표지체로 표지된 프로브를 생성할 수 있거나, 또는 폴리뉴클레오티드는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 이러한 프라이머, 프로브 및 다른 단편은 길이가 15개 이상, 바람직하게는 20개 이상, 예를 들어 25, 30 또는 40개 이상의 뉴클레오티드일 것이며, 본 명세서에 사용되는 본 발명의 폴리뉴클레오티드라는 용어에 또한 포함된다.
- [0410] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 DNA 폴리뉴클레오티드 및 프로브는 재조합적으로, 합성에 의해, 또는 당업자가 이용가능한 임의의 수단에 의해 제조될 수 있다. 이들은 또한 표준 기술에 의해 클로닝될 수 있다.
- [0411] 일반적으로, 프라이머는 원하는 핵산 서열을 한 번에 하나의 뉴클레오티드씩 단계적으로 제조하는 것을 포함하는 합성 수단에 의해 생성될 것이다. 자동화 기술을 이용하여 이를 달성하는 기술은 본 기술 분야에서 쉽게 이용가능하다.
- [0412] 더욱 긴 폴리뉴클레오티드는 일반적으로 재조합적 수단을 이용하여, 예를 들어 PCR (폴리머라아제 연쇄 반응) 클로닝 기술을 사용하여 생성될 것이다. 이는 클로닝하기를 원하는 지질 표적화 서열의 영역의 측면의 프라이머의 쌍 (예를 들어, 약 15 내지 30개의 뉴클레오티드의 것)을 만들고, 상기 프라이머를 동물 또는 인간 세포로부터 수득된 mRNA 또는 cDNA와 접촉시키고, 원하는 영역의 증폭을 야기하는 조건 하에 폴리머라아제 연쇄 반응을 수행하고, 증폭된 단편을 (예를 들어 아가로스 겔 상에서의 반응 혼합물의 정제에 의해) 단리하고, 증폭된 DNA를 회수하는 것을 포함할 것이다. 프라이머는, 증폭된 DNA가 적합한 클로닝 벡터 내로 클로닝될 수 있도록, 적합한 제한 효소 인식 부위를 함유하도록 설계될 수 있다.
- [0413] 혼성화
- [0414] 또한 본 발명은 본 발명의 서열에 대하여 상보성인 서열 또는 본 발명의 서열 또는 이에 상보성인 서열에 혼성화될 수 있는 서열의 용도를 포함한다.
- [0415] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "혼성화"는 폴리머라아제 연쇄 반응 (PCR) 기술에서 실시되는 증폭 과정뿐만 아니라 "핵산 가닥이 염기쌍 형성을 통하여 상보성 가닥과 연결되는 과정"도 포함한다.
- [0416] 또한 본 발명은 본 명세서에 논의된 본 서열 또는 임의의 유도체에 대하여 상보성인 서열, 또는 이의 단편 또는 유도체에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함한다.
- [0417] 또한 본 발명은 본 명세서에 논의된 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 서열에 대하여 상보성인 서열을 포함한다.
- [0418] 혼성화 조건은 문헌[Berger and Kimmel, 1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA]에 교시된 바와 같이 뉴클레오티드 결합 복합체의 용융 온도 (T_m)를 기초로 하며, 하기에 설명된 바와 같이 규정된 "엄격도"를 부여한다.
- [0419] 최대 엄격도는 전형적으로 약 $T_m-5^\circ\text{C}$ (프로브의 T_m 보다 5°C 낮음)에서 일어나며; 높은 엄격도는 T_m 보다 약 5°C 내지 10°C 낮은 온도에서 일어나며; 중간 엄격도는 T_m 보다 약 10°C 내지 20°C 낮은 온도에서 일어나며; 낮은 엄격도는 T_m 보다 약 20°C 내지 25°C 낮은 온도에서 일어난다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 최대 엄격도의 혼성화를 이용하여 동일한 뉴클레오티드 서열을 확인하거나 또는 검출할 수 있는 반면, 중간 (또는 낮은) 엄격도의 혼성화를 이용하여 유사한 또는 관련된 폴리뉴클레오티드 서열을 확인하거나 또는 검출할 수 있다.
- [0420] 바람직하게는, 본 발명은 높은 엄격도 조건 또는 중간 엄격도 조건 하에서 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 서열에 대하여 상보성인 서열의 용도를 포

함한다.

- [0421] 더 바람직하게는, 본 발명은 높은 엄격도 조건 (예를 들어, 65℃ 및 0.1×SSC {1×SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M 시트르산나트륨, pH 7.0}) 하에서 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 서열에 대하여 상보성인 서열의 용도를 포함한다.
- [0422] 또한 본 발명은 (본 명세서에 논의된 것의 상보성 서열을 비롯하여) 본 명세서에 논의된 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열의 용도에 관한 것이다.
- [0423] 또한 본 발명은 (본 명세서에 논의된 것의 상보성 서열을 비롯하여) 본 명세서에 논의된 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 서열에 대하여 상보성인 뉴클레오티드 서열의 용도에 관한 것이다.
- [0424] 중간 내지 최대 엄격도의 조건 하에서 본 명세서에 논의된 뉴클레오티드 서열에 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 용도가 본 발명의 범주 내에 또한 포함된다.
- [0425] 바람직한 태양에서, 본 발명은 엄격한 조건 (예를 들어, 50℃ 및 0.2 × SSC) 하에서, 본 명세서에 논의된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 상보체에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열의 용도를 커버한다.
- [0426] 더 바람직한 태양에서, 본 발명은 높은 엄격도 조건 (예를 들어, 65℃ 및 0.1 × SSC) 하에서, 본 명세서에 논의된 뉴클레오티드 서열 또는 이의 상보체에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드 서열의 용도를 커버한다.
- [0427] 생물학적 활성
- [0428] 바람직하게는, 변이체 서열 등은 적어도 본 명세서에 제시된 서열만큼 생물학적 활성을 갖는다.
- [0429] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "생물학적으로 활성인"은 자연 발생 서열의 유사한 구조적 기능 (그러나 반드시 동일한 정도로 그러한 것은 아님) 및/또는 유사한 조절 기능 (그러나 반드시 동일한 정도로 그러한 것은 아님) 및/또는 유사한 생화학적 기능 (그러나 반드시 동일한 정도로 그러한 것은 아님)을 갖는 서열을 말한다.
- [0430] 제조합체
- [0431] 일 태양에서, 본 발명에서 사용하기 위한 서열은 제조합 서열, 즉 제조합 DNA 기술을 이용하여 제조된 서열이다.
- [0432] 이들 제조합 DNA 기술은 당업자의 능력 이내이다. 이러한 기술은 문헌, 예를 들어 문헌[J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press]에 설명되어 있다.
- [0433] 합성
- [0434] 일 태양에서, 본 발명에서 사용하기 위한 서열은 합성 서열, 즉 시험관 내에서의 화학적 합성 또는 효소적 합성에 의해 제조된 서열이다. 이것은 숙주 유기체, 예를 들어 메탄올 자화(methylotrophic) 효모 피키아(Pichia) 및 한세놀라(Hansenula)에 있어서의 최적 코돈 사용을 이용하여 만들어진 서열을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0435] 폴리펩티드의 발현
- [0436] 본 발명에서 사용하기 위한 또는 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제조합 복제가능 벡터 내에 혼입시킬 수 있다. 벡터는 양립가능한 숙주 세포에서 및/또는 양립가능한 숙주 세포로부터 폴리펩티드 형태로 뉴클레오티드 서열을 복제 및 발현하는 데 사용될 수 있다. 발현은 프로모터/인핸서 및 다른 발현 조절 신호를 포함하는 제어 서열을 이용하여 제어될 수 있다. 원핵 프로모터 및 진핵 세포에서 기능성인 프로모터가 사용될 수 있다. 조직 특이적 또는 자극 특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 상기에 기재된 둘 이상의 상이한 프로모터로부터의 서열 요소를 포함하는 키메라 프로모터가 또한 사용될 수 있다.
- [0437] 뉴클레오티드 서열의 발현에 의해 숙주 제조합 세포에 의해 생성된 폴리펩티드는 사용되는 벡터 및/또는 서열에 따라 분비될 수 있거나 또는 세포내에 함유될 수 있다. 코딩 서열은 특정한 원핵 또는 진핵 세포 막을 통하여 물질 코딩 서열의 분비를 유도하는 신호 서열을 이용하여 설계될 수 있다.
- [0438] 발현 벡터
- [0439] 어구 "발현 벡터"는 생체 내 또는 시험관 내 발현이 가능한 제작물을 의미한다.

- [0440] 바람직하게는, 발현 벡터는 적합한 숙주 유기체의 계놈 내에 혼입된다. 용어 "혼입되는"은 바람직하게는 계놈 내로의 안정한 혼입을 커버한다.
- [0441] 본 발명에서 사용하기 위한 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 이 뉴클레오티드 서열이 적합한 숙주 유기체에 의해 뉴클레오티드 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 벡터 내에 존재할 수 있다.
- [0442] 본 발명에서 사용하기 위한 벡터로 하기에 기재된 적합한 숙주 세포를 형질전환시켜 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 제공할 수 있다.
- [0443] 벡터, 예를 들어 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터의 선택은 흔히 이것이 도입될 숙주 세포에 따라 달라질 것이다.
- [0444] 본 발명에서 사용하기 위한 벡터는 하나 이상의 선발가능한 마커 유전자, 예를 들어 항생제 내성, 예를 들어 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜 또는 테트라사이클린 내성을 부여하는 유전자를 함유할 수 있다. 대안적으로, 선발은 (국제특허 공개 WO 91/17243호에 기재된 바와 같이) 동시 형질전환(co-transformation)에 의해 달성될 수 있다.
- [0445] 벡터는 시험관 내에서, 예를 들어 RNA의 생성에 사용될 수 있거나 또는 숙주 세포의 트랜스펙션, 형질전환, 형질도입 또는 감염에 사용될 수 있다.
- [0446] 벡터는 벡터가 당해 숙주 세포에서 복제될 수 있게 하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 서열의 예로는 플라스미드 pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 및 pIJ702의 복제 기점이 있다.
- [0447] 조절 서열
- [0448] 일부 응용에서, 본 발명에서 사용하기 위한 뉴클레오티드 서열은 선택된 숙주 세포에 의한 것과 같은 뉴클레오티드 서열의 발현을 제공할 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 예로서, 본 발명은 이러한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 커버하며, 즉, 이 벡터는 발현 벡터이다.
- [0449] 어구 "작동가능하게 연결된"은 기재된 구성 요소들이 이들의 의도된 방식으로 기능하는 것을 가능하게 하는 관계로 있는 병치(juxtaposition)를 말한다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 이 제어 서열과 양립가능한 조건 하에서 달성되는 그러한 방식으로 라이게이션된다.
- [0450] 어구 "조절 서열"은 프로모터 및 인핸서와, 다른 발현 조절 신호를 포함한다.
- [0451] 용어 "프로모터"는 본 기술 분야의 보통의 의미로 사용되며, 예를 들어, RNA 폴리머라아제 결합 부위의 의미로 사용된다.
- [0452] 본 발명의 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 향상된 발현은 또한 이중성 조절 영역, 예를 들어 프로모터, 분비 리더 및 종결 영역의 선택에 의해 또한 성취될 수 있다.
- [0453] 바람직하게는, 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열은 적어도 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0454] 박테리아, 진균류 또는 효모 숙주에서 뉴클레오티드 서열의 전사를 유도하기에 적합한 프로모터의 예는 본 기술 분야에 잘 알려져 있다.
- [0455] 제작물
- [0456] 용어 "제작물" - 이는 "콘주게이트", "카세트" 및 "하이브리드"와 같은 용어와 동의어임 - 은 프로모터에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된, 본 발명에 따라 사용하기 위한, 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 간접적 부착의 예로는 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 프로모터의 중간에, 적합한 스페이서 그룹, 예를 들어 인트론 서열, 예를 들어 Sh1-인트론 또는 ADH 인트론을 제공하는 것이 있다. 이것은 본 발명과 관련하여 용어 "융합된"에 대하여도 그러하며, 이는 직접적 또는 간접적 부착을 포함한다. 일부의 경우에, 상기 용어들은 야생형 유전자 프로모터와 일상적으로 결부된 단백질 코딩 뉴클레오티드 서열의 천연 조합과, 상기 프로모터와 단백질 코딩 뉴클레오티드 서열 둘 모두가 그의 자연 환경에 존재할 경우의 이들의 천연 조합은 커버하지 않는다.
- [0457] 제작물은 심지어 유전자 제작물의 선발을 허용하는 마커를 함유하거나 또는 발현할 수 있다.

- [0458] 일부 응용에 있어서, 바람직하게는 제작물은 적어도 본 발명의 뉴클레오타이드 서열 또는 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 프로모터에 작동가능하게 연결된 것을 포함한다.
- [0459] 유기체
- [0460] 본 발명과 관련하여 용어 "유기체"는 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열 또는 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및/또는 이로부터 수득된 생성물을 포함할 수 있는 임의의 유기체를 포함한다.
- [0461] 본 발명과 관련하여 어구 "트랜스제닉(transgenic) 유기체"는 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및/또는 이로부터 수득된 생성물을 포함하는, 및/또는 프로모터가 유기체 내에서 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 허용할 수 있는 임의의 유기체를 포함한다. 바람직하게는 뉴클레오타이드 서열은 유기체의 게놈 내에 혼입된다.
- [0462] 적합한 유기체는 원핵 생물, 진균류, 효모 또는 식물을 포함한다.
- [0463] 어구 "트랜스제닉 유기체"는 그의 자연 환경에서의 천연 뉴클레오타이드 코딩 서열을 커버하지 않으며, 이는 상기 서열이 또한 그의 자연 환경에 있는 그의 천연 프로모터의 제어 하에 있을 경우에 그러하다.
- [0464] 따라서, 본 발명의 트랜스제닉 유기체는 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 본 명세서에 정의된 제작물, 본 명세서에 정의된 벡터, 본 명세서에 정의된 플라스미드, 본 명세서에 정의된 세포 또는 이들의 생성물 중 임의의 하나 또는 그 조합을 포함하는 유기체를 포함한다. 예를 들어, 트랜스제닉 유기체는 자연에서 지질 아실트랜스퍼라아제를 코딩하는 서열과 결부되지 않는 프로모터의 제어 하에 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 또한 포함할 수 있다.
- [0465] 숙주 세포/유기체의 형질전환
- [0466] 숙주 유기체는 원핵 또는 진핵 유기체일 수 있다.
- [0467] 적합한 원핵 숙주의 예에는 박테리아, 예를 들어 이. 콜라이 및 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바람직하게는 비. 리케니포르미스가 포함된다.
- [0468] 원핵 숙주의 형질전환에 대한 교시는 본 기술 분야에 잘 기록되어 있으며, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press]을 참조한다. 원핵 숙주가 사용되면, 뉴클레오타이드 서열은 인트론의 제거에 의한 것과 같이, 형질전환 전에 적합하게 변형될 필요가 있을 수 있다.
- [0469] 다른 실시 형태에서, 트랜스제닉 유기체는 효모일 수 있다.
- [0470] 사상균 세포는 공지된 방식으로 원형질체를 형성하고 원형질체를 형질전환시키는 것, 이어서 세포벽을 재생시키는 것을 포함하는 방법과 같은, 본 기술 분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 형질전환될 수 있다. 숙주 미생물로서의 아스페르길루스의 사용은 유럽 특허 제0 238 023호에 기재되어 있다. 일 실시 형태에서, 바람직하게는 티. 레에세이가 숙주 유기체이다.
- [0471] 다른 숙주 유기체는 식물일 수 있다. 식물의 형질전환에 사용되는 일반적인 기술에 대한 개관은 문헌[Potrykus, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1991) 42:205-225] 및 문헌[Christou, *Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994* 17-27]에서 찾아볼 수 있다. 식물 형질전환에 관한 추가의 교시는 유럽 특허 출원 제0449375호에서 찾아볼 수 있다.
- [0472] 진균류, 효모 및 식물의 형질전환에 관한 일반적인 교시가 하기 섹션에 제시되어 있다.
- [0473] 형질전환 진균류
- [0474] 숙주 유기체는 진균류, 예를 들어 사상균일 수 있다. 적합한 이러한 숙주의 예에는 푸사륨속, 써모마이세스속, 아크레모늄(*Acremonium*)속, 아스페르길루스속, 페니실륨속, 무코르(*Mucor*)속, 뉴로스포라속, 트리코테르마속 등에 속하는 임의의 구성원이 포함된다. 일 실시 형태에서, 트리코테르마, 바람직하게는 티. 레에세이가 숙주 유기체이다.
- [0475] 사상균의 형질전환에 대한 교시는 미국 특허 제5741665호에 개관되어 있으며, 이는 사상균의 형질전환 및 이 진

균류의 배양을 위한 표준 기술이 본 기술 분야에 잘 알려져 있음을 언급하고 있다. 엔. 크라사에 적용되는 기술에 대한 광범위한 개관은 예를 들어 문헌[Davis and de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A: 79-143]에서 찾아진다. 79-143.

- [0476] 사상균의 형질전환에 대한 추가의 교시는 미국 특허 제5674707호에 개관되어 있다.
- [0477] 일 태양에서, 숙주 유기체는 아스페르길루스속의 것, 예를 들어 아스페르길루스 니게르일 수 있다.
- [0478] 본 발명에 따른 트랜스제닉 아스페르길루스는 또한 예를 들어 문헌[Turner G. 1994, Vectors for genetic manipulation. In: Martinelli S.D., Kinghorn J.R.(Editors) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology* vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pp. 641-666]의 교시에 따라 제조될 수 있다.
- [0479] 사상균에서의 유전자 발현은 문헌[Punt *et al. Trends Biotechnol.* (2002); 20(5):200-6], 문헌[Archer & Peberdy *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997) 17:273-306]에 개관되었다.
- [0480] 형질전환 효모
- [0481] 다른 실시 형태에서, 트랜스제닉 유기체는 효모일 수 있다.
- [0482] 효모에서의 이중성 유전자 발현의 원리에 대한 개관은 예를 들어 문헌[*Methods Mol Biol* (1995), 49:341-54], 및 문헌[*Curr Opin Biotechnol* (1997); 8:554-60]에 제공되어 있다.
- [0483] 이와 관련하여, 효모, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지(*Saccharomyces cerevisi*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 종 (문헌[FEMS Microbiol Rev (2000) 24:45-66]) 참조)이 이중성 유전자 발현을 위한 비히클로서 사용될 수 있다.
- [0484] 사카로마이세스 세레비지에에서의 이중성 유전자 발현 및 유전자 생성물의 분비의 원리에 대한 개관은 문헌[E Hinchcliffe E Kenny, 1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose and J. Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.]에 주어지 있다.
- [0485] 효모의 형질전환에 있어서, 몇몇 형질전환 프로토콜이 개발되었다. 예를 들어, 본 발명에 따른 트랜스제닉 사카로마이세스는 문헌[Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929]; 문헌[Beggs, J D, 1978, *Nature*, London, 275, 104]; 및 문헌[Ito, H *et al.*, 1983, *J Bacteriology* 153, 163-168]의 교시에 따라 제조될 수 있다.
- [0486] 형질전환된 숙주 세포는 다양한 선발 마커, 예를 들어 영양요구성 마커 우성 항생제 내성 마커를 사용하여 선발될 수 있다.
- [0487] 적합한 효모 숙주 유기체는 피키아 종, 한세놀라 종, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 야로위니아(*Yarrowinia*) 종, 에스. 세레비지에를 포함하는 사카로마이세스 종, 또는 쉬조사카로마이세 폼베(*Schizosaccharomyce pombe*)를 포함하는 쉬조사카로마이세 종으로부터 선택되는 효모 종과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 생물공학적 관련 효모로부터 선택될 수 있다.
- [0488] 메탄올 자화 효모 종 피키아 파스토리스의 주가 숙주 유기체로서 사용될 수 있다.
- [0489] 일 실시 형태에서, 숙주 유기체는 (국제특허 공개 WO 01/39544호에 기재된 바와 같이) 한세놀라 종, 예를 들어 에이치. 폴리모르파일 수 있다.
- [0490] 형질전환 식물/식물 세포
- [0491] 본 발명에 적합한 숙주 유기체는 식물일 수 있다. 일반적인 기술에 대한 개관은 문헌[Potrykus, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1991) 42:205-225] 및 문헌[Christou, *Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April* 1994 17-27]에서, 또는 국제특허 공개 WO 01/16308호에서 찾아볼 수 있다. 트랜스제닉 식물은 예를 들어 향상된 수준의 피토스테롤 에스테르 및 피토스타놀 에스테르를 생성할 수 있다.
- [0492] 배양 및 생성
- [0493] 본 발명의 뉴클레오티드 서열로 형질전환된 숙주 세포는 코딩된 효소의 생성을 유도하는 그리고 상기 세포 및/또는 배양 배지로부터의 상기 효소의 회수를 용이하게 하는 조건 하에서 배양될 수 있다.
- [0494] 세포의 배양에 사용되는 배지는 당해 숙주 세포의 성장 및 효소 발현의 수득에 적합한 임의의 통상적인 배지일 수 있다.

- [0495] 재조합 세포에 의해 생성되는 단백질은 세포의 표면 상에서 디스플레이될 수 있다.
- [0496] 효소는 숙주 세포로부터 분리될 수 있으며, 잘 알려진 절차를 이용하여 배양 배지로부터 편리하게 회수될 수 있다.
- [0497] 분리
- [0498] 흔히, 폴리펩티드는 발현 숙주로부터 배양 배지 내로 분리되는 것이 바람직하며, 효소는 상기 배양 배지로부터 더욱 용이하게 회수될 수 있다. 본 발명에 따르면, 분리 리더 서열은 원하는 발현 숙주를 기초로 하여 선택될 수 있다. 하이브리드 신호 서열이 본 발명의 맥락에서 또한 사용될 수 있다.
- [0499] 자연에서 지질 아실트랜스퍼라아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 결부되지 않은 분리 리더 서열의 전형적인 예로는 진균류 아밀로글루코시다아제 (AG) 유전자 (*gl1aA* - 예를 들어 아스페르길루스 유래의 18개 아미노산 버전 및 24개 아미노산 버전 둘 모두), α -인자 유전자 (효모, 예를 들어 사카로마이세스, 클루이베로마이세스 및 한세놀라) 또는 α -아밀라아제 유전자 (바실러스)에서 기원하는 것이 있다.
- [0500] 검출
- [0501] 아미노산 서열의 발현의 검출 및 측정을 위한 다양한 프로토콜이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예에는 효소-결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), 방사면역 분석법(radioimmunoassay; RIA) 및 형광 활성화 세포 분류법(fluorescent activated cell sorting; FACS)이 포함된다.
- [0502] 매우 다양한 표지체 및 콘주게이션 기술이 당업자에 의해 공지되어 있으며, 이는 다양한 핵산 및 아미노산 분석에서 사용될 수 있다.
- [0503] 다수의 회사, 예를 들어 파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech; 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재), 프로메가(Promega; 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 및 유에스 바이오케미칼 코포레이션(US Biochemical Corp; 미국 오크하임주 클레블랜드 소재)이 이들 절차를 위한 상업적 키트 및 프로토콜을 공급한다.
- [0504] 적합한 리포터 분자 또는 표지체는 방사성 핵종, 효소, 형광, 화학발광 또는 발색 제제와, 기질, 보조 인자, 저해제, 자기 입자 등을 포함한다. 이러한 표지체의 사용을 교시하는 특허는 미국 특허 제3,817,837호; 미국 특허 제3,850,752호; 미국 특허 제3,939,350호; 미국 특허 제3,996,345호; 미국 특허 제4,277,437호; 미국 특허 제4,275,149호 및 미국 특허 제4,366,241호를 포함한다.
- [0505] 또한, 재조합 면역글로불린이 미국 특허 제4,816,567호에 나타낸 바와 같이 생성될 수 있다.
- [0506] 융합 단백질
- [0507] 본 발명에서 사용하기 위한 효소는 예를 들어 이의 추출 및 정제를 돕기 위하여 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 융합 단백질 파트너의 예에는 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST), 6xHis, GAL4 (DNA 결합 및/또는 전사 활성화 도메인) 및 β -갈락토시다아제가 포함된다. 융합 단백질 파트너와 관심대상의 단백질 서열 사이에 단백질 분해 절단 부위를 포함하여 융합 단백질 서열의 제거를 허용하는 것이 또한 편리할 수 있다. 바람직하게는 융합 단백질은 단백질 서열의 활성을 방해하지 않을 것이다.
- [0508] 이. 콜라이에서의 유전자 융합물 발현 시스템이 문헌[Gene fusion expression systems in E. coli have been reviewed in Curr. Opin. Biotechnol. (1995) 6:501-6]에 개관되었다.
- [0509] 본 명세서에 정의된 특정한 특성을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열은 융합 단백질을 코딩하기 위하여 비천연 서열에 라이게이션될 수 있다. 예를 들어, 물질 활성화에 영향을 줄 수 있는 제제에 대한 펩티드 라이브러리의 스크리닝에 있어서, 구매가능한 항체에 의해 인식되는 비천연 에피토프를 발현하는 키메라 물질을 코딩하는 것이 유용할 수 있다.
- [0510] 추가 관심대상의 단백질(protein of interest; POI)
- [0511] 본 발명에 따라 사용하기 위한 서열은 또한 하나 이상의 추가 관심대상의 단백질(POI) 또는 관심대상의 뉴클레오티드 서열(nucleotide sequence of interest; NOI)과 함께 사용될 수 있다.
- [0512] POI의 비제한적 예에는 하기가 포함된다: 전분 대사에 연루된 단백질 또는 효소, 글라이코겐 대사에 연루된 단백질 또는 효소, 아세틸 에스 테라아제, 아미노펩티다아제, 아밀라아제, 아라비나아제, 아라비노푸라노시다아제, 카르복시펩티다아제, 카탈라아제, 셀룰라아제, 키티나아제, 키모신, 큐티나아제, 데옥시리보뉴클레아제, 에피커

라아제, 에스테라아제, α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, α -글루카나아제, 글루칸 라이자아제, 엔도- β -글루카나아제, 글루코아밀라아제, 글루코스 옥시다아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 글루코로니다아제, 헤미셀룰라아제, 헥소스 옥시다아제, 하이드롤라아제, 인버타아제, 아이소머라아제, 락카아제, 리파아제, 라이아제, 만노시다아제, 옥시다아제, 옥시도리덕타아제, 펙테이트 라이아제, 펙틴 아세틸 에스테라아제, 펙틴 데폴리머라아제, 펙틴 메틸 에스테라아제, 펙틴 분해 효소, 퍼옥시다아제, 페놀옥시다아제, 피타아제, 폴리갈락투로나아제, 프로테아제, 람노-갈락투로나아제, 리보뉴클레아제, 타우마틴, 트랜스퍼라아제, 수송 단백질, 트랜스글루타미나아제, 자일라나아제, 헥소스 옥시다아제 (D-헥소스: O_2 -옥시도리덕타아제, EC 1.1.3.5) 또는 이의 조합. NOI는 심지어 상기 서열들 중 임의의 것에 대한 안티센스 서열일 수 있다.

[0513] POI는 심지어 예를 들어 추출 및 정제를 돕기 위한 융합 단백질일 수 있다.

[0514] POI는 심지어 분비 서열에 융합될 수 있다.

[0515] 세제

[0516] 본 발명의 조성물은 세정 및/또는 세제 조성물의 성분을 형성할 수 있다. 특히, 본 발명의 소정의 실시 형태는 세제를 추가로 포함할 수 있다.

[0517] 일반적으로, 세정 및 세제 조성물은 본 기술 분야에 잘 기재되어 있으며, 적합한 세정 및 세제 조성물의 추가의 설명에 대해서는 국제특허 공개 WO 96/34946호; 국제특허 공개 WO 97/07202호; 및 국제특허 공개 WO 95/30011호를 참조한다.

[0518] 본 발명의 화합물은 예를 들어 얼룩진 천의 전처리에 적합한 세탁 첨가제 조성물 및 린스 첨가된 천 유연제 조성물을 비롯한 손세탁 또는 기계 세탁용 세제 조성물로서 조제되거나, 또는 일반 가정의 경질 표면 세정 작업에 사용하기 위한 세제 조성물 (자동차 세척 또는 세정 조성물을 포함함)로서 조제되거나, 또는 수작업 또는 기계식 식기 세척 작업용으로 조제될 수 있다. 이것은 또한 손비누, 샴푸 및 샤워 겔을 포함하지만 이에 한정되지 않는 개인 위생 제품으로서의 사용용으로 조제될 수 있다.

[0519] 일 실시 형태에서, 본 발명의 세탁 조성물은 지방 분해 효소, 하이드로포빈 및 선택적으로 세제가 하나 이상의 효소, 예를 들어 프로테아제, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, 아밀라아제, 글루코아밀라아제, 말토스 생성 아밀라아제, 말토스 비생성 아밀라아제, α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 포스포리파아제, 글리코실트랜스퍼라아제, 키티나아제, 큐티나아제, 카보하이드라아제, 셀룰라아제, 펙티나아제, 만난아제, 만노시다아제, 아라비나아제, 갈락타나아제, 자일라나아제, 옥시다아제, 폴리에스테라아제, 락카아제, 사이클로텍스트린 에스테라아제, 피타아제, 카탈라아제, 할로퍼옥시다아제, 및/또는 퍼옥시다아제, 펙틴 분해 효소, 펩티도글루타미나아제, 폴리페놀옥시다아제, 트랜스글루타미나아제, 테옥시리보뉴클레아제, 리보뉴클레아제, 및/또는 이의 조합과 조합된 것을 포함할 수 있다. 일반적으로, 선택된 효소(들)의 특성은 선택된 세제와 양립가능하여야 하며 (예를 들어, pH 최적, 다른 효소 및 비효소 성분들과의 양립가능성 등), 효소(들)는 유효량으로 존재하여야 한다.

[0520] 프로테아제: 적합한 프로테아제는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형된 또는 단백질 엔지니어링된(engineered) 돌연변이체가 또한 적합하다. 프로테아제는 세린 프로테아제 또는 메탈로프로테아제, 예를 들어 알칼리 미생물 프로테아제 또는 트립신-유사 프로테아제일 수 있다. 알칼리 프로테아제의 예로는 서브틸리신, 특히 바실러스 종으로부터 유래된 것, 예를 들어 서브틸리신 노보(Novo), 서브틸리신 칼스버그(Carlsberg), 서브틸리신 309 (예를 들어 미국 특허 제6,287,841호 참조), 서브틸리신 147, 및 서브틸리신 168 (예를 들어 국제특허 공개 WO 89/06279호 참조)이 있다. 트립신-유사 프로테아제의 예로는 (예를 들어 페이지 또는 소 기원의) 트립신 및 푸사툼 프로테아제 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 89/06270호 및 국제특허 공개 WO 94/25583호 참조)가 있다. 유용한 프로테아제의 예에는 또한 국제특허 공개 제WO 92/19729호 및 국제특허 공개 WO 98/20115호에 기재된 변이체가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 구매가능한 프로테아제 효소는 알칼라아제(ALCALASE)(등록상표), 사비나아제(SAVINASE)(등록상표), 리퀴나아제(LIQUANASE)(등록상표), 오보자임(OVOZYME)(등록상표), 폴라자임(POLARZYME)(등록상표), 에스페라아제(ESPERASE)(등록상표), 에버라아제(EVERLASE)(등록상표), 및 칸나아제(KANNASE)(등록상표) (노보자임즈(Novozymes), 이전에는 노보 노르디스크 에이/에스(Novo Nordisk A/S)); 엑셀라아제(EXCELLASE)TM, 막사타아제(MAXATASE)(등록상표), 막사칼(MAXACAL)TM, 막사팜(MAXAPEM)TM, 프로퍼라아제(PROPERASE)(등록상표), 프로퍼라아제 L(등록상표), 퓨라펙트(PURAFECT)(등록상표), 퓨라펙트 L(등록상표), 퓨라팩스트(PURAFAST)TM, OXPTM, FN2TM, 및 FN3TM (제넨코르(Genencor) - 다니스코 에이/에스(Danisco A/S) 부문)을 포함한다.

- [0521] 폴리에스테라아제: 적합한 폴리에스테라아제는 국제특허 공개 WO 01/34899호 (제넨코르) 및 국제특허 공개 WO 01/14629호 (제넨코르)에 기재된 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 본 명세서에 개시된 다른 효소와 임의로 조합되어 포함될 수 있다.
- [0522] 아밀라아제: 본 조성물은 아밀라아제, 예를 들어 α -아밀라아제 (EC 3.2.1.1), G4-형성 아밀라아제 (EC 3.2.1.60), β -아밀라아제 (EC 3.2.1.2) 및 γ -아밀라아제 (EC 3.2.1.3)를 포함할 수 있다. 이들은 박테리아 또는 진균류 기원의 아밀라아제를 포함할 수 있으며, 화학적으로 변형된 또는 단백질 엔지니어링된 돌연변이체가 포함된다. 듀라밀(DURAMYL)(등록상표), 터마밀(TERMAMYL)TM, 평가밀(FUNGAMYL)(등록상표) 및 반(BAN)TM (노보자임즈, 이전에는 노보 노르디스크 에이/에스), 라피다아제(RAPIDASE)(등록상표), 및 퓨라스타(PURASTAR)(등록상표) (다니스코 유에스에이, 인크.(Danisco USA, Inc.)), 리퀴자임(LIQUEZYME)TM, 나탈라아제(NATALASE)TM, 수프라밀(SUPRAMYL)TM, 스테인자임(STAINZYME)TM, 평가밀 및 반TM (노보자임즈 에이/에스), 라피다아제(RAPIDASE)TM, 퓨라스타(PURASTAR)TM, 퓨라스타록삼(PURASTAROXAM)TM 및 파워라아제(POWERASE)TM (다니스코 유에스에이 인크.로부터의 것), 그라인드아밀(GRINDAMYL)TM 파워프레시(PowerFresh), 파워플렉스(POWERFLEX)TM 및 그라인드아밀 파워소프트(PowerSoft) (다니스코 에이/에스로부터의 것)와 같은 그러나 이에 한정되지 않는 구매 가능한 아밀라아제.
- [0523] 퍼옥시다아제/옥시다아제: 본 조성물에서의 사용용으로 고려되는 적합한 퍼옥시다아제/옥시다아제는 식물, 박테리아 또는 진균류 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형된 또는 단백질 엔지니어링된 돌연변이체가 포함된다. 유용한 퍼옥시다아제의 예에는 국제특허 공개 WO 93/24618호, 국제특허 공개 WO 95/10602호 및 국제특허 공개 WO 98/15257호에 기재된 것과 같은, 코프리누스, 예를 들어 씨. 시네레우스 유래의 퍼옥시다아제, 및 이의 변이체가 포함된다. 구매 가능한 퍼옥시다아제는 가드자임(GUARDZYME)(등록상표) (노보자임즈 에이/에스)을 포함한다.
- [0524] 셀룰라아제: 적합한 셀룰라아제는 박테리아 또는 진균류 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형된 또는 단백질 엔지니어링된 돌연변이체가 포함된다. 적합한 셀룰라아제는 바실러스속, 슈도모나스속, 후미콜라(*Humicola*)속, 푸사륨속, 티엘라비아(*Thielavia*)속, 아크레모늄(*Acremonium*)속 유래의 셀룰라아제, 예를 들어 후미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 마이셀리오프토라 써모필라(*Myceliophthora thermophila*) 및 푸사륨 옥시스포룸으로부터 생성된 진균류 셀룰라아제를 포함하며, 이는 예를 들어 미국 특허 제4,435,307호; 미국 특허 제5,648,263호; 미국 특허 제5,691,178호; 미국 특허 제5,776,757호; 및 국제특허 공개 WO 89/09259호에 개시되어 있다. 사용에 고려되는 예시적인 셀룰라아제로는 텍스타일을 위한 색상 케어 효과를 갖는 것들이 있다. 이러한 셀룰라아제의 예로는 예를 들어 유럽 특허 제0495257호; 유럽 특허 제531372호; 국제특허 공개 WO 99/25846호 (제넨코르 인터내셔널, 인크.(Genencor International, Inc.)), 국제특허 공개 WO 96/34108호 (제넨코르 인터내셔널, 인크.), 국제특허 공개 WO 96/11262호; 국제특허 공개 WO 96/29397호; 및 국제특허 공개 WO 98/08940호에 기재되어 있는 셀룰라아제가 있다. 다른 예로는 셀룰라아제 변이체, 예를 들어 국제특허 공개 WO 94/07998호; 국제특허 공개 WO 98/12307호; 국제특허 공개 WO 95/24471호; 국제특허 공개 WO 99/01544호; 유럽 특허 제531 315호; 미국 특허 제5,457,046호; 미국 특허 제5,686,593호; 및 미국 특허 제5,763,254호 기재된 것이 있다. 구매 가능한 셀룰라아제는 셀루자임(CELLUZIME)(등록상표), 케어자임(등록상표) 및 엔돌라아제(ENDOLASE)(등록상표) (노보자임즈, 이전에는 노보 노르디스크 에이/에스); 클라지나아제(CLAZINASE)TM 및 퓨라닥스(PURADAX)(등록상표) HA (제넨코르); 및 KAC-500(B)TM (카오 코포레이션(Kao Corporation))를 포함한다.
- [0525] 구매 가능한 만난아제의 예에는 만나웨이(MANNAWAY)TM (덴마크 소재의 노보자임즈) 및 만나스타(MANNASTAR)TM (제넨코르)가 포함된다.
- [0526] 본 발명의 조성물은 고체 또는 액체 중 어느 하나로 조제될 수 있다. 제형의 예에는 과립, 펠렛, 슬러리, 바(bar), 페이스트, 폼, 겔, 스트립 등이 포함된다. 바람직한 세제 첨가제 제형은 특히 분진 비발생(non-dusting) 과립, 액체, 특히 안정화 액체 또는 슬러리이다. 액체 세제는 전형적으로 70% 이하의 물 및 0-30%의 유기 용매를 함유하는 수성 액체 세제 또는 비수성 액체 세제일 수 있다.
- [0527] 분진 비발생 과립은 예를 들어 미국 특허 제4,106,991호 및 미국 특허 제4,661,452호에 개시된 바와 같이 제조될 수 있으며, 본 기술 분야에 공지된 방법에 의해 선택적으로 코팅될 수 있다. 왁스질 코팅 재료의 예로는 평균 분자량이 1000 내지 20000인 폴리 (에틸렌 옥사이드) 생성물 (폴리에틸렌 글리콜, PEG); 16 내지 50개의 에틸렌 옥사이드 단위를 갖는 에톡실화 노닐페놀; 알코올이 12 내지 20개의 탄소 원자를 함유하며 15 내지 80개의 에틸렌 옥사이드 단위가 있는 에톡실화 지방 알코올; 지방 알코올; 지방산; 및 지방산의 모노- 및 다이- 및 트라이글리세라이드가 있다. 유체층 기술에 의한 적용에 적합한 필름-형성 코팅 재료의 예는 영국 특허 제

1483591호에 주어지 있다. 액체 효소 제제는 예를 들어 폴리올, 예를 들어 프로필렌 글리콜, 당 또는 당 알코올, 락트산 또는 봉산을 확립된 방법에 따라 첨가함으로써 안정화될 수 있다. 보호된 효소는 유럽 특허 출원 제238216호에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0528] 세제 조성물은 또한 하나 이상의 추가의 계면활성제를 포함할 수 있으며, 상기 계면활성제는 반극성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 썬비터이온성을 비롯하여 비이온성일 수 있다. 계면활성제는 전형적으로 0.1 중량% 내지 60 중량% 의 수준으로 존재한다.

[0529] 포함시킬 때, 세제는 일반적으로 약 1% 내지 약 40%의 음이온성 계면활성제, 예를 들어 선형 알킬벤젠설포네이트, 알파-올레핀설포네이트, 알킬 설페이트 (지방 알코올 설페이트), 알코올 에톡시설페이트, 2차 알칸설포네이트, 알파-설포 지방산 메틸 에스테르, 알킬- 또는 알케닐석신산 또는 비누를 함유할 것이다.

[0530] 포함시킬 때, 세제는 일반적으로 약 0.2% 내지 약 40%의 비이온성 계면활성제, 예를 들어 알코올 에톡실레이트, 노닐페놀 에톡실레이트, 알킬폴리글리코사이드, 알킬다이메틸아민옥사이드, 에톡실레이트화 지방산모노에탄올아미드, 지방산모노에탄올아미드, 폴리하이드록시 알킬 지방산아미드, 또는 글루코사민의 다른 N-아실 또는 N-알킬 유도체를 함유할 것이다.

[0531] 세제는 0-65%의 세제 빌더 또는 복합체 형성제, 예를 들어 제올라이트, 다이포스페이트, 트라이포스페이트, 포스포네이트, 카르보네이트, 시트레이트, 니트릴로트라이아세트산, 에틸렌다이아민테트라아세트산, 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산, 알킬- 또는 알케닐석신산, 용해성 실리케이트 또는 층상 실리케이트 (예를 들어, 획스트 (Hoechst)로부터의 SKS-6)를 함유할 수 있다.

[0532] 세제는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 예로는 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리 (비닐피롤리돈), 폴리 (에틸렌 글리콜), 폴리 (비닐 알코올), 폴리 (비닐피리딘-N-옥사이드), 폴리 (비닐이미다졸), 폴리카르복실레이트, 예를 들어 폴리아크릴레이트, 말레산/아크릴산 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체가 있다.

[0533] 세제는 과산-형성 표백 활성제, 예를 들어 테트라아세틸에틸렌다이아민 또는 노나노일옥시벤젠설포네이트와 조합될 수 있는 퍼보레이트 또는 퍼카르보네이트와 같은 과산화수소 공급원을 포함할 수 있는 표백 시스템을 함유할 수 있다. 대안적으로, 표백 시스템은 예를 들어 아미드계, 이미드계 또는 설포계의 퍼옥시산을 포함할 수 있다.

[0534] 본 발명의 세제 조성물의 효소(들)는 통상적인 안정화제, 예를 들어 폴리올, 예를 들어 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 당 또는 당 알코올, 락트산, 봉산 또는 봉산 유도체, 예를 들어 방향족 보레이트 에스테르, 또는 페닐 보론산 유도체, 예를 들어 4-포르밀페닐 보론산을 사용하여 안정화될 수 있으며, 본 조성물은 예를 들어 국제특허 공개 WO 92/19709호 및 국제특허 공개 WO 92/19708호에 기재된 바와 같이 조제될 수 있다.

[0535] 또한 세제는 다른 통상적인 세제 성분, 예를 들어 점토를 포함하는 천 컨디셔너, 폼 부스터(booster), 거품 억제제, 부식 방지제, 오염물 현탁제, 오염물 재침착 방지제, 염료, 살균제, 광 증백제, 하이드로트로프(hydrotrope), 변색 저해제 또는 방향제를 함유할 수 있다.

[0536] 투입량

[0537] 본 발명의 조성물에서, 하이드로포빈은 이것이 본 명세서에 기재된 효과를 나타낼 수 있게 하기에 충분한 임의의 농도로 존재할 수 있다. 적합하게는, 하이드로포빈은 조성물의 총 중량의 0.001 중량% 내지 5 중량%, 바람직하게는 0.002 중량% 내지 2.5 중량%, 더 바람직하게는 0.005 중량% 내지 1 중량%, 더욱 더 바람직하게는 0.01 중량% 내지 0.5 중량%의 농도로 존재한다. 특히 바람직한 예에서, 하이드로포빈은 조성물의 총 중량의 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 또는 0.4 중량%의 농도로 존재한다.

[0538] 본 발명의 조성물에서, 지방 분해 효소는 이것이 본 명세서에 기재된 효과를 나타낼 수 있게 하기에 충분한 임의의 농도로 존재할 수 있다.

[0539] 적합하게는, 지방 분해 효소는 조성물의 총 중량의 0.001 내지 400 중량ppm, 바람직하게는 0.002 내지 200 중량ppm, 더 바람직하게는 0.005 내지 100 중량ppm, 더욱 더 바람직하게는 0.01 내지 50 중량ppm, 더욱 더 바람직하게는 0.02 내지 25 중량ppm의 순수 효소 단백질의 농도로 존재한다.

[0540] 적합하게는, 지방 분해 효소는 조성물 1 g당 0.025 내지 25, 바람직하게는 0.05 내지 10, 더 바람직하게는 0.1 내지 5단위의 효소 활성의 농도로 존재한다. 상기 활성은 하기에 기재된 트라이옥타노에이트 분석법에 따라 측

정되며, 여기서 1단위의 활성은 1 μmol 의 자유 지방산이 효소액 1 g에 의해 1분 내에 생성됨을 나타낸다.

[0541] 본 발명의 조성물이 세제를 포함할 경우, 세제는 이것이 본 명세서에 기재된 효과를 나타낼 수 있게 하기에 충분한 임의의 농도로 존재할 수 있다. 적합하게는, 세제는 도(Do)에 의하면 0.001 내지 20 g/L, 바람직하게는 0.01 내지 10 g/L, 더 바람직하게는 0.05 내지 5 g/L, 더욱 더 바람직하게는 0.1 내지 25 g/L의 농도로 존재하며, 상기 리터는 세척액의 부피를 말한다. 특히 바람직한 예에서, 세제는 세척액 1 L당 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 또는 0.4 g의 농도로 존재한다.

[0542] 트라이옥타노에이트 분석

[0543] 조성물 중 트라이옥타노에이트의 반응 예멸전은 하기 2가지 완충제 중 하나에서, 에탄올 (5%)에 사전 현탁시킨 0.4% 트라이옥타노에이트로부터 제조되었다: pH 8.2로 조정된 0.05M 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산 (HEPES), 또는 pH 10으로 조정된 0.05M N-사이클로헥실-3-아미노프로판설폰산 (CAPS). 이들 둘 모두의 완충제에 있어서, 물의 경도를 240 ppm으로 조정하였다. 최종 분석 혼합물은 트라이글리세라이드의 유화를 돕기 위하여 다양한 양의 세제를 함유하였다.

[0544] 반응 예멸전은 고전단 혼합을 2분 동안 적용하고 (24000 m^{-1} , 울트라 투락스(Ultra Turrax) T25, 얀케 운트 쿨켈(Janke & Kunkel)), 그 후 150 μl 를 이미 30 μl 의 효소 샘플을 함유하고 있는 96웰 마이크로타이터 플레이트 웰로 옮김으로써 제조하였다. 자유 지방산 생성량은 비-에스테르화 지방산(non-esterified fatty acids; NEFA)의 정량적 측정을 위한 시험관 내 효소적 비색 분석법을 사용하여 측정하였다. 이 방법은 자유 지방산에 특이적이며, 첨가된 아실-CoA 신테타아제의 존재 하에서의 지방산에 의한 코엔자임 A(CoA)의 아실화에 의존한다. 이와 같이 생성된 아실-CoA는 퍼옥시다아제의 존재 하에 과산화수소의 생성에 의해, 첨가된 아실-CoA 옥시다아제에 의해 산화된다. 이는 자주색 부가물이 형성되도록 3-메틸-N-에틸-N(β -하이드록시에틸)-아닐린과 4-아미노안티피린의 산화적 축합을 가능하게 하는데, 상기 부가물은 비색 측정될 수 있다. 30°C에서의 6분 간의 인큐베이션 후 생성된 자유 지방산의 양은 30 μl 의 가수분해 용액을 이미 120 μl 의 NEFA A 용액을 함유하고 있는 96웰 마이크로타이터 플레이트 웰로 옮김으로써 NEFA HR(2) 키트 (독일 소재의 와코 케미칼스 게엠베하(Wako Chemicals GmbH)) 내의 재료들을 사용하여 측정하였다. 30°C에서의 3분 동안의 인큐베이션에 이어서 60 μl 의 NEFA B 용액을 첨가하였다. 30°C에서의 4.5분 동안의 인큐베이션 후, 520 nm에서의 OD를 측정하였다.

[0545] 세탁 조성물

[0546] 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈은 예를 들어 세탁 조성물 중 하이드로포빈 전구체 (예를 들어 하이드로포빈 용합 단백질)의 가수분해에 의해 세탁 조성물 내에서 원위치에서 생성될 수 있다.

[0547] 하이드로포빈 전구체 (예를 들어 하이드로포빈 용합 단백질)는 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈을 원위치에서 생성하기 위하여 필요하다. 이것은 세탁 조성물의 초기 성분으로서 존재할 수 있다. 대안적으로, 하이드로포빈 전구체가 처음에 전혀 존재하지 않거나 또는 불충분하게 존재할 경우, 이 성분은 상기 조성물에 첨가될 수 있다.

[0548] 필요할 경우, 촉매 (특히 효소, 특히 프로테아제 효소)가 존재할 수 있다. 이것은 세탁 조성물의 초기 성분으로 존재할 수 있다. 대안적으로, 촉매가 처음에 전혀 존재하지 않거나 또는 불충분하게 존재할 경우, 이 성분은 상기 조성물에 첨가될 수 있다.

[0549] 세탁 조성물은 지질 (특히, 트라이글리세라이드 및/또는 다이글리세라이드 및/또는 모노글리세라이드)일 수 있는 얼룩을 추가로 포함할 수 있다. 이 얼룩은 표면, 예를 들어 천 상에 존재할 수 있다. 따라서 본 발명의 세탁 조성물은 표면, 예를 들어 천을 포함할 수 있다.

[0550] 하이드로포빈 전구체의, 본 발명에서 사용되는 하이드로포빈으로의 전환은 천으로부터의 지질을 포함하는 얼룩의 제거를 도울 수 있다.

[0551] 세정 방법

[0552] 본 발명은 표면을 본 발명에 따른 조성물과 접촉시킴으로써 지질-기재의 얼룩을 표면으로부터 제거하는 방법을 추가로 포함한다. 게다가, 본 발명은 표면을 본 발명에 따른 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 표면의 세정 방법을 포함한다. 더욱이, 본 발명은 물품을 본 발명에 따른 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 물품 (그러나 특별히 배타적으로 의류 물품 또는 식탁용 식기류 물품인 것은 아님)의 세정 방법을 포함한다.

[0553] 다른 태양에서, 천으로부터 유성 얼룩을 제거하는 방법이 제공된다. 본 방법은 일반적으로 유성 얼룩을 갖는

천을 확인하는 단계, 천을 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계, 및 천을 행구어 유성 얼룩을 천으로부터 제거하는 단계를 포함한다.

- [0554] 일부 실시 형태에서, 지방 분해 효소, 하이드로포빈, 및 선택적으로 세제는 단일 조성물 중에 함께 존재한다. 일부 실시 형태에서, 지방 분해 효소, 하이드로포빈 및 선택적으로 세제는 상이한 조성물들 중에 별도로 있으며, 이들은 천과의 접촉 이전에 조합되거나 또는 천 상에서 함께 혼합된다. 따라서, 리파아제 및 아쥘반트(adjutant)의 적용은 동시적이거나 또는 순차적일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 접촉은 세척 전처리 단계, 즉 천을 손세탁하거나 또는 기계 세탁하기 전에 일어난다. 일부 실시 형태에서, 상기 접촉은 천을 손세탁하거나 또는 기계 세탁할 때에 일어난다. 상기 접촉은 본 발명의 조성물을 세척수와 혼합하거나, 본 조성물을 천 상에 스프레이하거나, 붓거나 또는 적하하거나, 또는 본 조성물을 어플리케이터를 사용하여 적용한 결과로서 일어날 수 있다.
- [0555] 본 방법은 다양한 오일 얼룩, 또는 유성 얼룩 부분을 제거하는 데 효과적인데, 상기 얼룩은 전형적으로 지방산의 에스테르, 예를 들어 트라이글리세라이드를 포함한다.
- [0556] 행구는 세척 후 어떤 시점에 일어날 수 있으며, 일부 태양에서 본 발명의 세정 방법은 천을 조성물과 접촉시킨 후 본질적으로 완료됨을 알 것이다.
- [0557] 식료품
- [0558] 본 발명의 조성물은 식료품의 성분으로서 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "식료품"은 인간 및/또는 동물 소비용으로 적합한 물질을 의미한다.
- [0559] 적합하게는, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "식료품"은 바로 소비될 수 있는 형태의 식료품을 의미할 수 있다. 그러나, 대안적으로 또는 이에 더하여, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 식료품이라는 용어는 식료품의 제조에서 사용되는 하나 이상의 식품 재료를 의미할 수 있다. 단지 예로서, 식료품이라는 용어는 도우(dough)로부터 생성된 베이킹된(baked) 상품과, 상기 베이킹된 상품의 제조에서 사용되는 도우 둘 모두를 포함한다.
- [0560] 식료품은 용도 및/또는 적용 양식 및/또는 투입 양식에 따라 용액의 형태로 또는 고체로서 존재할 수 있다.
- [0561] 식품 - 예를 들어 기능성 식품 - 으로서 사용될 - 또는 이의 제조에서 사용될 - 때, 본 발명의 조성물은 하기 중 하나 이상과 함께 사용될 수 있다: 영양적으로 허용가능한 담체, 영양적으로 허용가능한 희석제, 영양적으로 허용가능한 부형제, 영양적으로 허용가능한 아쥘반트, 영양적으로 활성인 성분.
- [0562] 바람직한 태양에서, 본 발명은 하기 중 하나 이상으로부터 선택되는, 상기에 정의된 식료품을 제공한다: 난류(eggs), 마요네즈, 샐러드 드레싱, 소스, 아이스크림, 알가루(egg powder), 변성 난황 및 이로부터 제조된 제품을 포함하지만 이에 한정되지 않는 난류-기재의 제품; 빵, 케이크, 스위트(sweet) 도우 제품, 라미네이션된 도우, 액체 반죽, 머핀, 도넛, 비스킷, 크래커 및 쿠키를 포함하는 베이킹된 상품; 초콜릿, 캔디, 캐러멜, 할라와(halawa), 무가당 및 가당 껌, 풍선껌, 부드러운 풍선껌, 츄잉껌을 포함하는 껌, 및 푸딩을 포함하는 과자류; 서벳을 포함하는 냉동 제품, 바람직하게는 아이스크림 및 아이스밀크를 포함하는 냉동 유제품; 치즈, 버터, 밀크, 커피 크림, 휘핑크림, 커스터드 크림, 밀크 드링크 및 요구르트를 포함하는 유제품; 무스, 야채용 휘핑크림, 가공된 식육 제품을 포함하는 식육 제품; 식용 유지류, 가스가 들어있는(aerated) 그리고 가스가 들어 있지 않은(non-aerated) 휘핑크림 제품, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 마가린, 쇼트닝 및 저지방 및 초저지방 스프레드를 포함하는 스프레드; 드레싱, 마요네즈, 딥(dip), 크림 기재의 소스, 크림 기재의 수프, 음료, 향신료 에멀전 및 소스.
- [0563] 적합하게는, 본 발명에 따른 식료품은 "고부가가치 식품(fine food)"일 수 있으며, 이는 케이크, 페이스트리, 과자류, 초콜릿, 퍼지(fudge) 등을 포함한다.
- [0564] 일 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 도우 제품 또는 베이킹된 제품, 예를 들어 빵, 튀긴 제품, 스낵, 케이크, 파이, 브라우니, 쿠키, 누들, 스낵 물품, 예를 들어 크래커, 그라함 크래커, 프레첼, 및 포테이토칩과, 파스타일 수 있다.
- [0565] 다른 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 간편식, 예를 들어 부분 베이킹 또는 부분 조리 제품일 수 있다. 이러한 부분 베이킹 또는 부분 조리 제품의 예에는 상기에 기재된 베이킹 제품 및 도우의 부분 베이킹 버전이 포함된다.

- [0566] 추가의 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 식물 유래된 식품 제품, 예를 들어 가루, 프리믹스, 오일, 지방, 코코아 버터, 커피 화이트너(coffee whitener), 셀러드 드레싱, 마가린, 스프레드, 땅콩 버터, 쇼트닝, 아이스크림, 조리용 기름일 수 있다.
- [0567] 다른 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 버터, 밀크, 크림, 치즈, 예를 들어 다양한 형태 (치즈, 예를 들어 다양한 형태(조각난 형태, 블록 형태, 슬라이스 형태 또는 입자상 grated)을 포함함)의 천연 치즈, 가공 치즈 및 모조 치즈, 크림 치즈, 아이스크림, 냉동 디저트, 요구르트, 요구르트 드링크, 버터 지방, 무수 유지방, 다른 유제품일 수 있다. 본 발명에 따른 효소는 유제품에서 지방 안정성을 향상시킬 수 있다.
- [0568] 다른 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 동물 유래 성분을 함유하는 식품 제품, 예를 들어 가공육 제품, 조리용 기름, 쇼트닝일 수 있다.
- [0569] 추가의 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 음료, 과일, 혼합 과일, 야채류, 마리네이드 또는 와인일 수 있다.
- [0570] 일 태양에서, 본 발명에 따른 식료품은 식물 유래 오일(즉, 식물유), 예를 들어 올리브유, 해바라기유, 땅콩유 또는 평지씨유이다. 오일은 탈검(degummed) 오일일 수 있다.
- [0571] 실시예
- [0572] 실시예 1
- [0573] 구매가능한 열불활성화 세제의 존재 또는 부재 하에 하이드로포빈의 첨가에 의해 리파아제의 세정 능력이 향상되는지를 시험하기 위하여 하기 실험을 실시하였다.
- [0574] 사용한 리파아제는 하기와 같았다 (각각을 단위 용량으로 투입함):
- [0575] 리팩스™ (abH23.1, 진균류) (서열 번호 11) (노보자임즈 에이/에스로부터 구매가능함), 1 mL 중 1.25 mg
- [0576] 리포맥스™ (abH15.2, 패밀리 1-1) (서열 번호 15) (다니스코 에이/에스로부터 구매가능함), 1 mL 중 6 mg
- [0577] SprLip2 (abH16, 패밀리 1-7) (서열 번호 17), 1 mL 중 258 μ l
- [0578] TfuLip2 (abH25.1, 패밀리 111) (서열 번호 16), 1 mL 중 30.8 μ l
- [0579] 사용한 하이드로포빈은 하이드로포빈 HFBII (서열 번호 2; 진균류 트리코데르마 레에세이로부터 수득가능함)였다. 26.6 g의 HFBII (150 mg/g의 하이드로포빈 단백질을 함유함)를 100 mL의 물에 용해시켜 40 g/L의 하이드로포빈 단백질을 함유하는 용액을 제공하였다. 상기 용액을 적절하게 희석시켜 조성물의 총 중량의 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 및 0.40 중량%의 하이드로포빈 용량을 제공하였다.
- [0580] 사용한 세제는 열불활성화 액체 세제 (아리엘™ 쉼머 리퀴드) 및 열불활성화 분말 세제 (아리엘™ 쉼머 파우더)였다. 이들은 프로क्टर 앤드 갬블(Procter & Gamble)로부터 구매가능하다. 세제를 적절하게 희석시켜 0, 0.1, 0.25 및 0.4 g/L의 용량을 제공하였다.
- [0581] 세제를 하기와 같이 열불활성화시켰다: 액체 세제를 95℃의 수조 내에 2시간 동안 두는 한편, 분말 세제의 물 중 0.1 g/mL 세제를 핫플레이트(hot plate) 상에서 1시간 동안 비등시켰다. 열처리된, 비효소 세제 성분의 특성을 유지하면서 상업적 세제 제형 중 임의의 단백질 성분의 효소 활성을 불활성화시킨다. 가열 후, 세제를 희석시키고, 리파아제 효소 활성화에 대하여 분석한다.
- [0582] 얼룩진 천 상에서의 리파아제 및 하이드로포빈의 세정 능력을 미세견본(microswatch) 분석 포맷으로 시험하였다. 얼룩 제거 실험은, 24웰 플레이트 포맷 (덴마크 소재의 닝크(Nunc))으로 세팅한, 지질을 함유하는 기술적 얼룩 (CS-61 견본: 네덜란드 소재의 센터 포 테스트머티리얼즈(Center for Testmaterials)로부터 구매한, 착색제를 포함하는 소고기 지방, 면직물)을 사용하여 실시하였다. 각각의 분석 웰은 CS-61 견본의 사전 절단 13 mm 조각을 포함하도록 세팅하였다. 견본들을 스캐너 (마이크로텍 스캔 메이커(MiCrotek Scan Maker) 900)를 사용하여 사전 판독하고, 24웰 플레이트 내에 넣었다.
- [0583] 사용한 완충제는 액체 세제 시험의 경우 20 mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설포산 (HEPES) (0.2 M, pH 8.2)이었으며, 분말 세제 시험의 경우 20 mM N-사이클로헥실-3-아미노프로판설포산 (CAPS) (0.2 M, pH 10.0)이었다. 물의 경도는, 둘 모두의 완충제에 있어서 15000 ppm의 2/1 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 를 2400 ppm (희석률: 6.25)으로 희석시킨 것을 사용하여 24도 (프랑스 정도) (FH - 1도 (프랑스 정도)는 물 1 리터당 탄산칼슘 10 밀리그램으로 정의됨)로 조정하였다.

- [0584] 24웰 플레이트를 사용하였으며, 각각의 웰은 1 ml의 용액을 함유하였다. 각각의 줄의 하이드로포빈 농도는 하기와 같았다: 조성물의 총 중량의 0 중량%; 0.01 중량%; 0.05 중량%; 0.1 중량%; 0.25 중량%; 및 0.4 중량%. 각각의 컬럼에서의 세제 농도는 하기와 같았다: 0; 0.1 g/L; 0.25 g/L; 및 0.4 g/L.
- [0585] 상기에 기재된 900 μ l의 적절한 완충제를 24웰 플레이트의 각각의 건본-함유 웰에 첨가하였다. 100 μ l의 하이드로포빈 용액을 각각의 웰 내에 첨가하였다. 반응의 개시를 위하여, 효소 샘플을 100 μ l의 부피로 각각의 웰 내에 첨가하였다. 상기 플레이트를 200 rpm에서 37°C에서 30분 동안 진탕시켰다. 인큐베이션 후, 반응 완충제를 제거하고, 각각의 웰 내의 천을 1 mL의 증류수로 3회 행구었다. 행균액을 제거한 후, 건본을 50°C에서 4시간 동안 건조시키고, 반사율을 측정하였다. 세정 능력을 단일 세척 사이클 후 정량화하였다. 얼룩 제거율은 각각의 건본에 있어서 세정 후 및 세정 전 RGB 컬러 측정의 차이로서 계산하였다. RGB 측정치를 스캐너 (마이크로텍 스캔 메이커 900)를 이용하여 취하였다.
- [0586] 세척된 천의 얼룩 제거 지수(Stain Removal Index; Δ SRI) 값의 차이를 하기 식을 이용하여 세척하지 않은 천과 관련하여 계산하였다:
- [0587] 오염물 제거율 (%)_(RGB) = (오염물 제거 $\Delta E_{(RGB)}$ / 초기 오염물 $\Delta E_{(RGB)}$) $\times$ 100%
- [0588] 여기서,
- [0589] 오염물 제거 $\Delta E_{(RGB)}$ =
$$\sqrt{((R_{\text{이후}} - R_{\text{이전}})^2 + (G_{\text{이후}} - G_{\text{이전}})^2 + (B_{\text{이후}} - B_{\text{이전}})^2)}$$
- [0590] 이며,
- [0591] 초기 오염물 $\Delta E_{(RGB)}$ =
$$\sqrt{((R_{\text{ref}} - R_{\text{이전}})^2 + (G_{\text{ref}} - G_{\text{이전}})^2 + (B_{\text{ref}} - B_{\text{이전}})^2)}$$
- [0592] 이고, RGB_{ref} 값은 오염되지 않은 면직물 (백색)의 값이다.
- [0593] 그 결과를 하기와 같이 도 1a 내지 5e에 나타낸다:
- [0594] 도 1a 내지 1c: 지방 분해 효소 없음(대조군)
- [0595] 도 2a 내지 2e: 지방 분해 효소 리팩스™ (abH23.1)
- [0596] 도 3a 내지 3e: 지방 분해 효소 리포맥스™ (abH15.2)
- [0597] 도 4a 내지 4e: 지방 분해 효소 SprLip2 (abH16)
- [0598] 도 5a 내지 5e: 지방 분해 효소 TfuLip2 (abH25.1)
- [0599] 특히, 도 2e, 4e 및 5e는 세제의 부재 하에서 시스템 중 리파아제의 존재에 대한 하이드로포빈의 영향을 예시한다. 이들 도면은 적어도 이들 리파아제에 있어서 개별적으로 사용될 때의 각각의 성분의 상가 효과보다 탁월한 상승 효과가 관찰될 수 있음을 나타낸다.
- [0600] 게다가, 도 2b는 하이드로포빈, 리파아제 리팩스(등록상표) 및 세제 아리엘(등록상표) 컬러 리퀴드의 조합물을 사용할 때, 세제의 농도가 증가함에 따라 이 시스템은 세제를 사용하지 않을 때와 비교하여 더욱 낮은 농도의 하이드로포빈 (0.4% 대신 0.05%)에서 능력 평탄역에 도달한다. 더욱이, 도 5b는 하이드로포빈, 리파아제 TfuLip2 및 세제 아리엘(등록상표) 컬러 리퀴드의 조합물을 사용하여, 세제의 농도 및 하이드로포빈의 농도를 증가시킴으로써, 개선된 세척 효과를 성취할 수 있음을 (특히 0.4 g/L의 세제 및 0.4%의 하이드로포빈을 이용함) 나타낸다.
- [0601] 게다가, 도 2d는 하이드로포빈, 리파아제 리팩스(등록상표) 및 세제 아리엘(등록상표) 컬러 파우더의 조합물을 이용할 때, 능력 패턴이 세제의 더욱 낮은 수준에 의해 영향을 받지 않음을 예시한다 (이 시스템은 0.05%의 하이드로포빈에서 평탄역에 도달함). 그러나, 더욱 높은 농도의 세제에서, 더욱 높은 SRI 값이 도달될 수 있다 (0.4 g/L의 세제에서 30%). 더욱이, 도 5d는 하이드로포빈, 리파아제 TfuLip2 및 세제 아리엘(등록상표) 컬러 파우더의 조합물을 사용할 때, 이 시스템의 전체 능력은 시스템 중 세제의 농도가 증가함에 따라 향상됨을 예시한다.
- [0602] 마지막으로, 도 1b는 하이드로포빈 및 세제 아리엘(등록상표) 컬러 리퀴드의 조합물을 리파아제의 부재 하에 사

용할 때, 낮은 농도의 하이드로포빈 (0.01-0.1%) 및 세제 (0.25 g/L 미만)에서 적은 상승 효과가 있음을 나타낸다.

[0603] 실시예 2 - 스트렙토마이세스 프리스티나에스피탈리스 ATCC 2548 리파아제 (SprLip2)의 클로닝 및 발현

[0604] SprLip2 유전자를 진레이(GeneRay; 중국 상하이 소재)가 합성하였다. SprLip2 합성 유전자를 NheI/BamHI 이중 절단 및 라이게이션에 의해 발현 플라스미드 pKB128 내로 클로닝하였다. 플라스미드 pKB128은 플라스미드 pKB105의 유도체이며 (미국 특허 공개 제2006/0154843호에 기재됨) A4 프로모터-CelA 신호 서열의 공급원이다. 플라스미드 pKB128은 BamHI 부위 앞에 NsiI-MluI-HpaI 제한효소 부위 (atgcatacgcgtgttaac; 서열 번호 30)를 함유한다. 에이. 니게르 A4 프로모터 및 CelA 절단 신호 서열은 SprLip2 유전자 서열 (예측 성숙 단백질에 상응함)의 5' 말단에 있으며, 11AG3 종결 서열은 SprLip2 유전자 서열의 3' 말단에 융합시켰다. pZQ205 발현 벡터 (도 30)는 pKB128을 제한 효소 NheI 및 BamHI로 절단한 후 유사하게 절단된 SprLip2 합성 유전자에 라이게이션시키고, 이어서 이. 콜라이 세포를 형질전환시킴으로써 제작하였다. SprLip2 유전자의 올바른 서열을 DNA 서열결정에 의해 확인하였다.

[0605] pZQ205의 플라스미드 DNA로 숙주 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*) TK23 원형질 세포 (미국 특허 공개 제2006/0154843호에 기재됨)를 형질전환시켰다. 3개의 형질전환체를 골라내고, 시드(seed) 진탕 플라스크 내로 옮기고 (다이메틸 설폭사이드 중 50 ug/ml의 티오스트렙톤을 함유하는 15 ml의 TSG 배지), 30℃에서 2일 동안 성장시켰으며, 이때 200 rpm에서 진탕하였다. 시드 진탕 플라스크로부터의 2일 배양물 3 ml을 단백질 생성을 위하여 30 ml의 스트렙토마이세스 변형 생성 배지 II로 옮겼다. 생성 배양물을 200 rpm에서 진탕시키면서 30℃에서 2일 동안 성장시켰다. 단백질을 세포의 배지 내로 분비시키고, 여과한 배양 배지를 세정 분석의 수행에 그리고 생화학적 특성화 실험에 사용하였다. 투입량은 바이오라드(Biorad) 단백질 분석법 (500-0006EDU)을 이용하여 브래드포드식(Bradford type) 분석에 의해 결정된 총 단백질을 기준으로 하고, 바이오-라드로부터의 크라이테리온(Criterion) 얼룩 무함유 시스템을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 결정된 순도에 대하여 보정하였다.

[0606] 실시예 3 - SprLip2의 생화학적 특성화

[0607] SprLip2의 리파아제/에스테라아제 활성을 파라-니트로페닐 부티레이트 에스테르 (pNB) 및 파라-니트로페닐 팔미테이트 (pNPP)를 기질로 사용하여 시험하였다. 각각의 기질 (p-니트로페닐 부티레이트, pNB, 시그마(Sigma), CAS 2635-84-9, 카탈로그 번호 N9876, 다이메틸 설폭사이드 (피어스(Pierce), 20688, 수분 함량 <0.2%)에 용해시킴; 및 p-니트로페닐 팔미테이트 (pNPP; 시그마, CAS 1492-30-4, 카탈로그 번호 N2752, 다이메틸 설폭사이드에 용해시킴)의 20 mM 스톡 용액을 제조하고, 장시간 보관을 위하여 -80℃에서 보관하였다. SprLip2 발현 세포로부터의 여과 배양 상청액을 96웰 마이크로타이터 플레이트에서 분석 완충제 [2% 폴리비닐 알코올 (PVA)을 함유하는 50 mM HEPES pH 8.2, (0.75 mM CaCl₂ 및 0.25 mM MgCl₂를 함유함) (시그마)]에서 연속적으로 희석시키고, 25℃에서 평형시켰다. 100 μl의 1:20으로 희석시킨 기질 (분석 완충제 중)을 다른 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 상기 플레이트를 300 rpm에서 진탕시키면서 25℃에서 10분 동안 평형시켰다. 희석 플레이트로부터의 10 μl의 효소 용액을 기질 함유 플레이트에 첨가하여 반응을 개시하였다. 상기 플레이트를 25℃로 평형시킨, 동적 측정이 가능한 분광 광도계로 즉시 옮겼다. 동적 모드에서의 흡광도 변화를 410 nm에서 5분 동안 관독하였다. 배경 속도 (효소를 전혀 포함하지 않음)를 시험 샘플의 속도로부터 차감하였다. 샘플 농도를 하기와 같이 결정하였다:

[0608] 샘플 농도 = (공지되지 않은 속도 × 표준 농도) / 표준 속도

[0609] 결과를 도 32 (pNB 가수분해) 및 도 33 (pNPP 가수분해)에 나타낸다. (상대적인 가수분해 속도).]

[0610] 실시예 4 - SprLip2에 의한 트라이글리세라이드의 가수분해

[0611] 이 분석은 리파아제에 의한 트라이글리세라이드 기질로부터의 지방산의 방출을 측정하도록 설계하였다. 이 분석은 가수분해 반응물로 이루어졌으며, 여기서, 리파아제를 트라이글리세라이드 에멀전과 함께 인큐베이션하면 지방산이 유리되며 따라서 유화된 기질의 탁도가 감소한다. 이 분석에 사용한 트라이글리세라이드 기질은 글리세릴 트라이옥타노에이트 (시그마, CAS 538-23-8, 카탈로그 번호 T9126-100ML)였다. 유화된 트라이옥타노에이트 (0.75% (v/v 또는 w/v))는 50 ml의 검 아라빅 (시그마, CAS 9000-01-5, 카탈로그 번호 G9752; pH 8.2의 50 mM HEPES 중에 제조한 10 mg/ml의 검 아라빅) 또는 세제 용액 (pH 8.2의 50 mM HEPES 중 0.1% 열불활성화 타이드 (Tide)(등록상표) 냉수용 세제, 미국 오하이오주 신시내티 소재의 프록터 앤드 갬블 (0.75 mM CaCl₂ 및 0.25 mM

MgCl₂를 함유함))을 375 μl의 트라이글리세라이드와 혼합함으로써 제조하였다. 상기 용액들을 혼합하고, 2분 이상 동안 초음파 처리하여 안정한 에멀전을 제조하였다. 200 μl의 유화 기질을 96웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 20 μl의 연속 희석 효소 샘플 (SprLip2를 발현하는 세포로부터의 여과 배양 상청액)을 기질 함유 플레이트에 첨가하였다. 상기 플레이트를 플레이트 실러(sealer)로 덮고, 20℃에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, 용액 중의 지방산의 존재는 제조업자가 나타낸 바와 같이 HR 시리즈 NEFA-HR (2) NEFA 키트 (독일 소재의 와코 케미칼스 게엠베하)를 사용하여 550 nm에서의 흡광도의 증가로서 검출하였다. 결과로는 도 34 (세제 없음) 및 도 35 (세제를 이용함)에 나타난다.

[0612] 실시예 5 - SprLip2의 세정 능력

[0613] SprLip2의 세정 능력을 구매가능한 열불활성화 세제의 존재 및 부재 하에서 시험하였다. 리파아제의 스톡 용액은 258 μl의 효소를 증류수에 의해 1 ml로 희석시킴으로써 제조하였다. 사용한 세제는 미국 오하이오주 신시내티 소재의 프록터 앤드 갬블로부터의 열불활성화 액체 세제 (아리엘™ 컬러 리퀴드) 및 열불활성화 분말 세제 (아리엘™ 컬러 파우더)였다.

[0614] 얼룩 제거 실험은, 24웰 플레이트 포맷 (덴마크 소재의 닝크)으로, 지질을 함유하는 기술적 얼룩 (CS-61 견본: 네덜란드 소재의 센터 포 테스트머티리얼즈로부터 구매한, 착색제를 포함하는 소고기 지방, 먼지물)을 사용하여 실시하였다. 각각의 분석 웰은 CS-61 견본의 사전 절단 13 mm 조각을 포함하도록 세팅하였다. 견본들을 스캐너 (마이크로텍 스캔 메이커 900)를 사용하여 사전 판독하고, 24웰 플레이트 내에 넣었다. 사용한 완충제는 액체 세제의 경우 pH 8.2의 20 mM HEPES였으며, 분말 세제의 경우 pH 10.0의 20 mM CAPS였다. 물의 경도는, 둘 모두의 완충제에 있어서 15000 ppm의 2/1 Ca²⁺/Mg²⁺를 2400 ppm으로 희석시킨 것을 사용하여 24도 (프랑스 경도)로 조정하였다. 세제들을 0; 0.1 g/L; 0.25 g/L; 및 0.4 g/L의 농도로 시험하였다. 상기에 기재된 1 ml의 적절한 완충제를 24웰 플레이트의 각각의 견본-함유 웰에 첨가하였다. 반응의 개시를 위하여, 효소 샘플을 100 μl의 부피로 각각의 웰 내에 첨가하였다. 상기 플레이트를 200 rpm에서 37℃에서 30분 동안 진탕시켰다. 인큐베이션 후, 반응 완충제를 제거하고, 각각의 웰 내의 천을 1 mL의 증류수로 3회 행구었다. 행군 견본을 50℃에서 4시간 동안 건조시키고, 그의 반사율을 측정하였다. 세정 능력을 단일 세척 사이클 후 정량화하였다. 얼룩 제거율은 각각의 견본에 있어서 세정 후 및 세정 전 RGB 측정의 차이로서 계산하였다. RGB 측정치를 스캐너 (마이크로텍 스캔 메이커 900)를 이용하여 취하였다. 세척된 천의 얼룩 제거 지수 값(SRI)의 차이를 하기 식을 이용하여 세척하지 않은 천과 관련하여 계산하였다:

[0615] 오염물 제거율 (%)_(RGB) = (오염물 제거 ΔE_(RGB)/ 초기 오염물 ΔE_(RGB)) × 100%

[0616] 여기서,

[0617] 오염물 제거 ΔE_(RGB) = $\sqrt{((R_{\text{이후}} - R_{\text{이전}})^2 + (G_{\text{이후}} - G_{\text{이전}})^2 + (B_{\text{이후}} - B_{\text{이전}})^2)}$

[0618]이며,

[0619] 초기 오염물 ΔE_(RGB) = $\sqrt{((R_{\text{ref}} - R_{\text{이전}})^2 + (G_{\text{ref}} - G_{\text{이전}})^2 + (B_{\text{ref}} - B_{\text{이전}})^2)}$

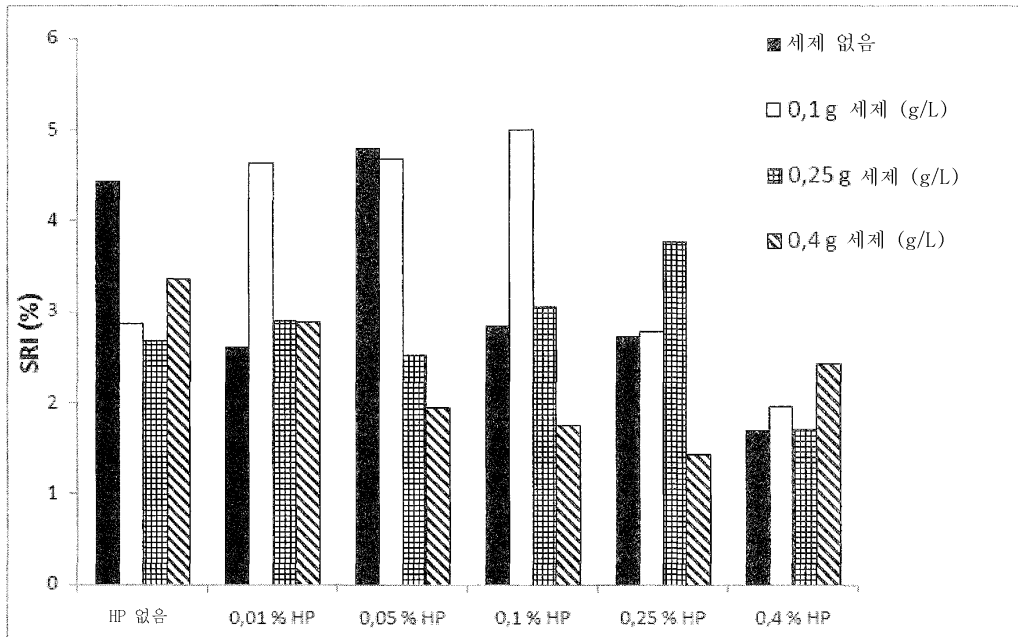
[0620] 이고, RGB_{ref} 값은 오염되지 않은 면직물 (백색)의 값이다.

[0621] 결과는 도 36에 나타내어져 있다.

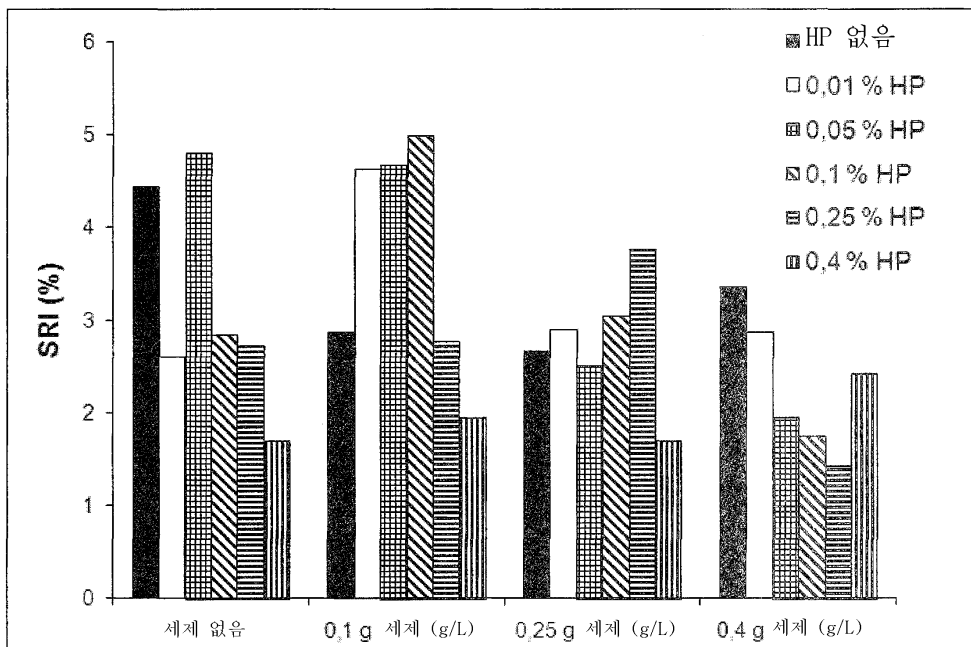
[0622] 상기 본 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명의 범주 및 사상으로부터 벗어나지 않고서 본 발명의 개시된 방법 및 시스템의 다양한 변경 및 변화가 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명을 특정한 바람직한 실시 형태와 관련하여 설명하였지만, 청구된 본 발명은 이러한 특정한 실시 형태에 부당하게 한정되지 않아야 함을 이해하여야 한다. 실제, 화학 분야, 생화학 분야 및 생물 공학 분야 또는 관련 분야의 숙련자에게 명백한, 본 발명을 실시하기 위한 설명된 양식의 다양한 변경이 하기 특허청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

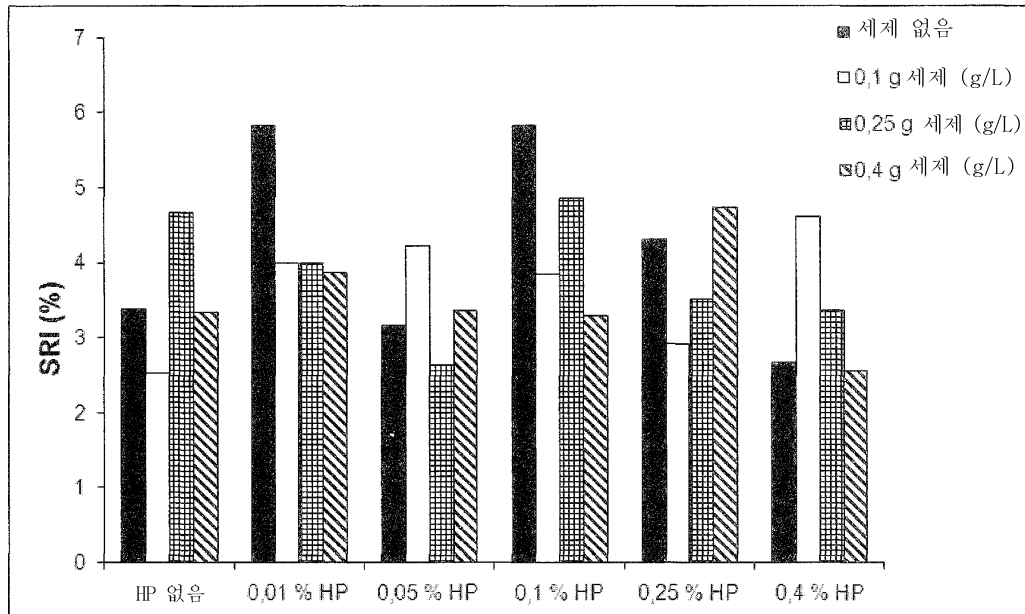
도면1a



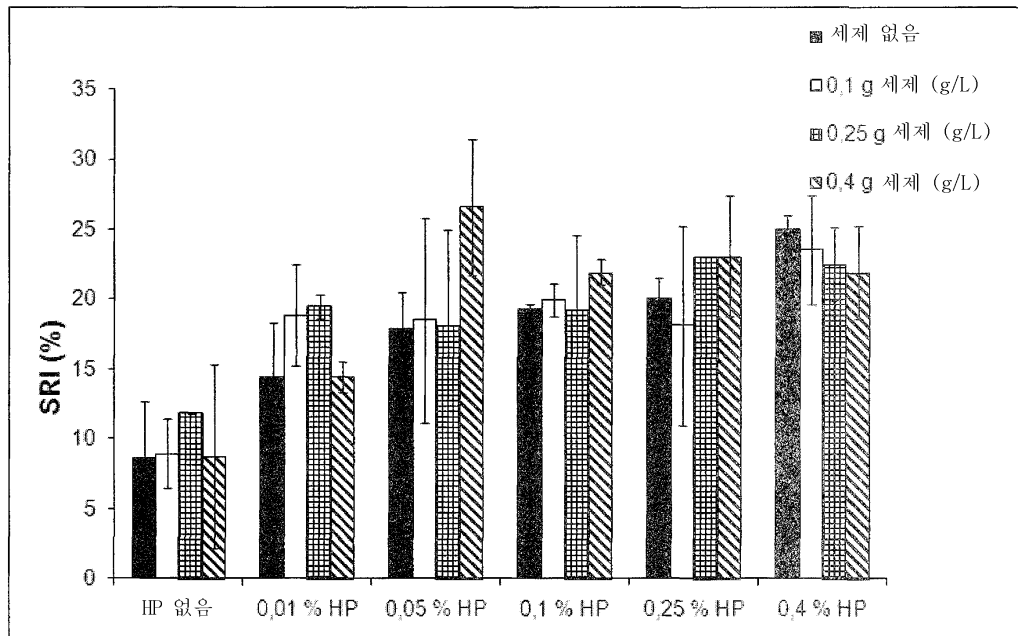
도면1b



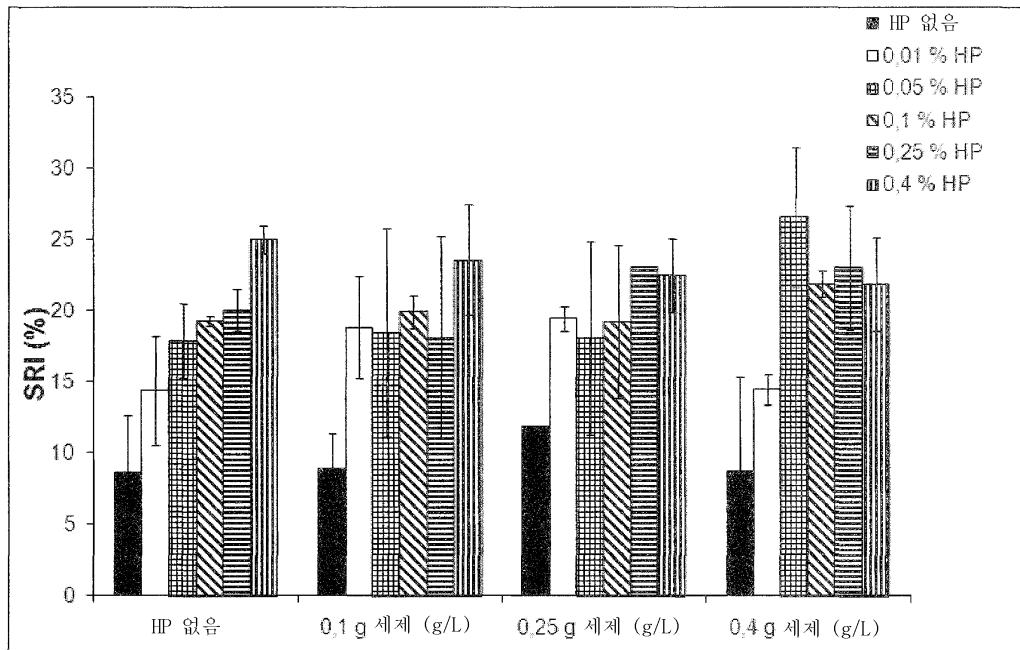
도면1c



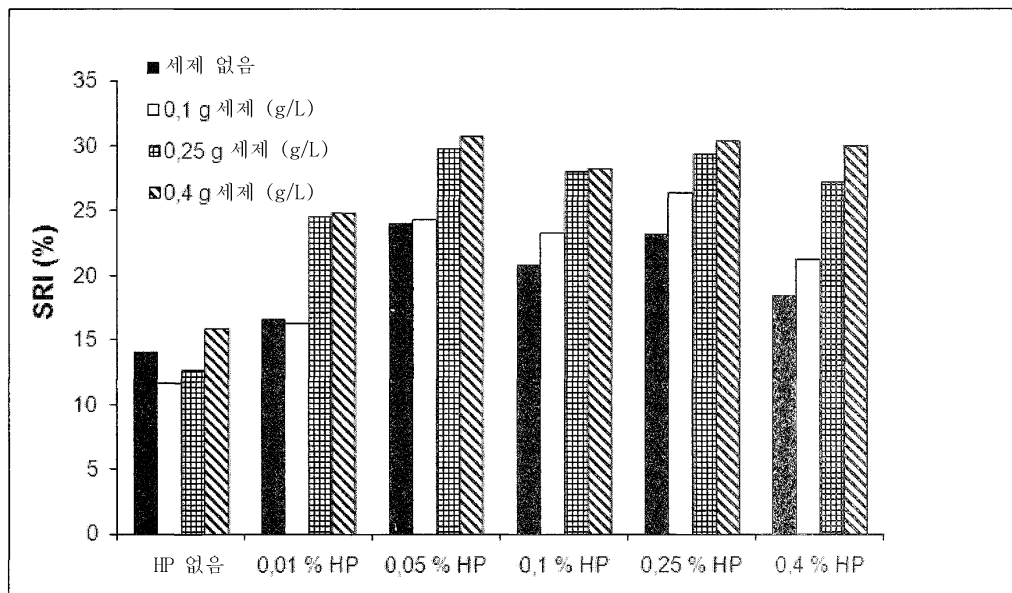
도면2a



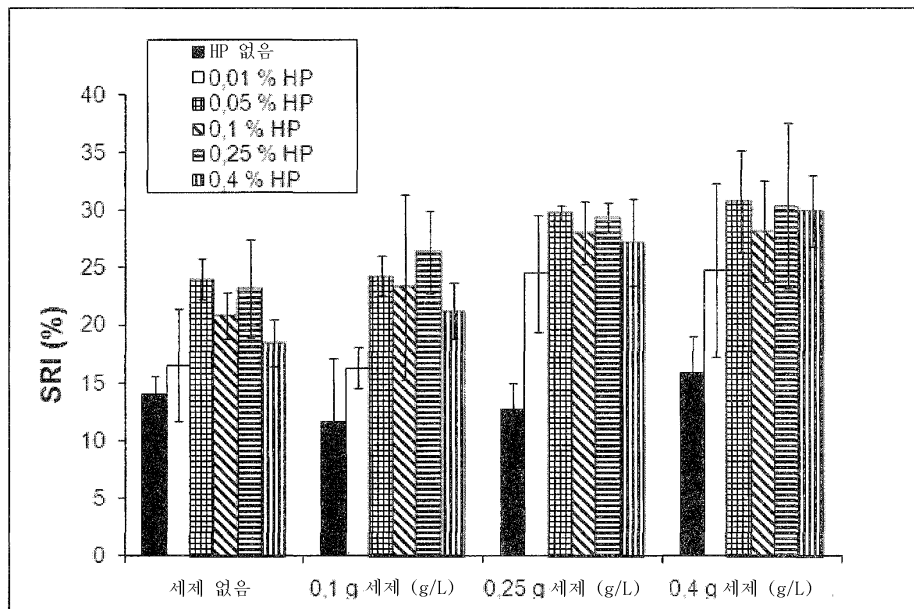
도면2b



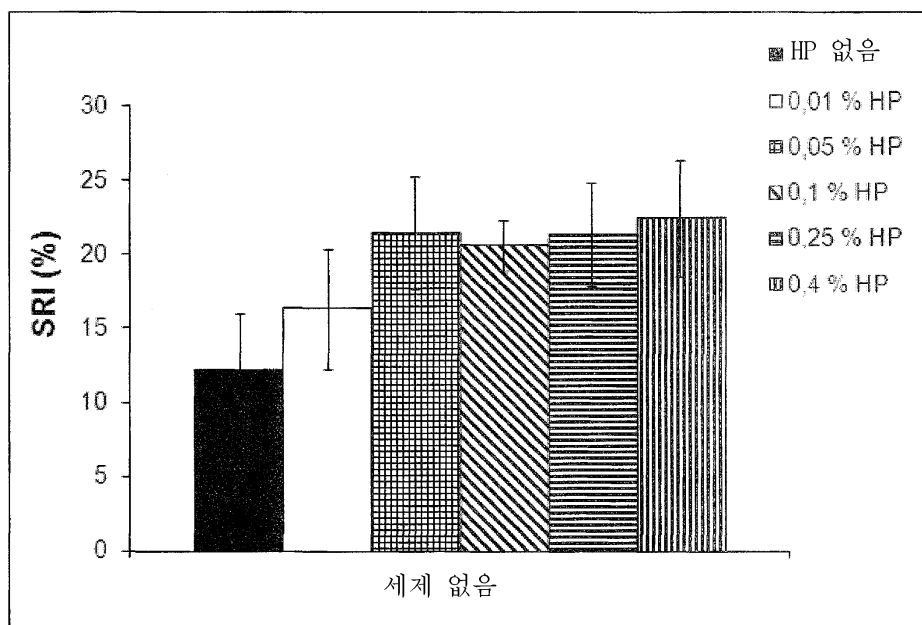
도면2c



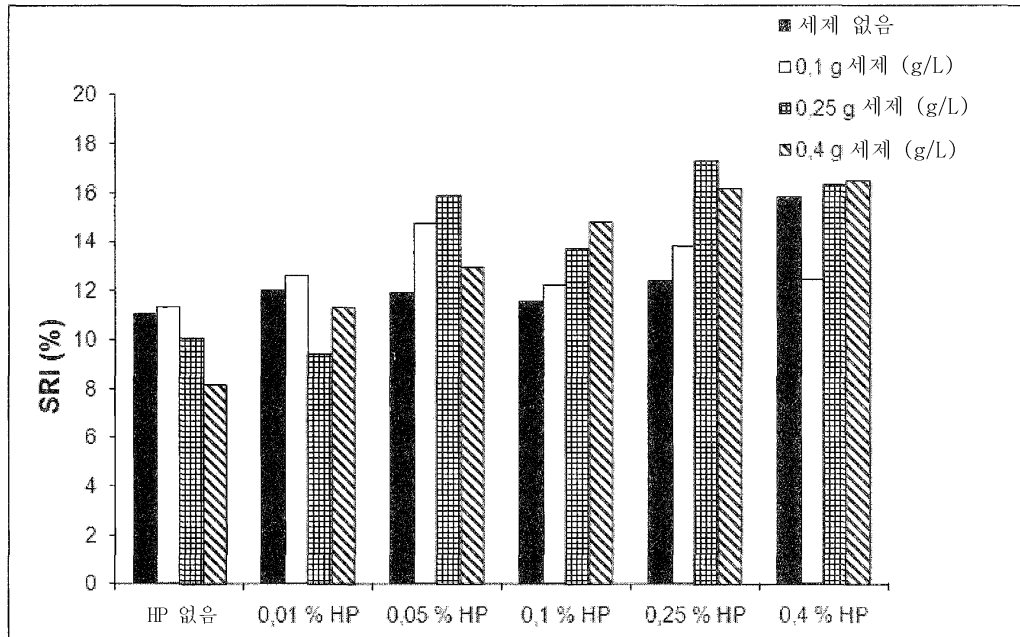
도면2d



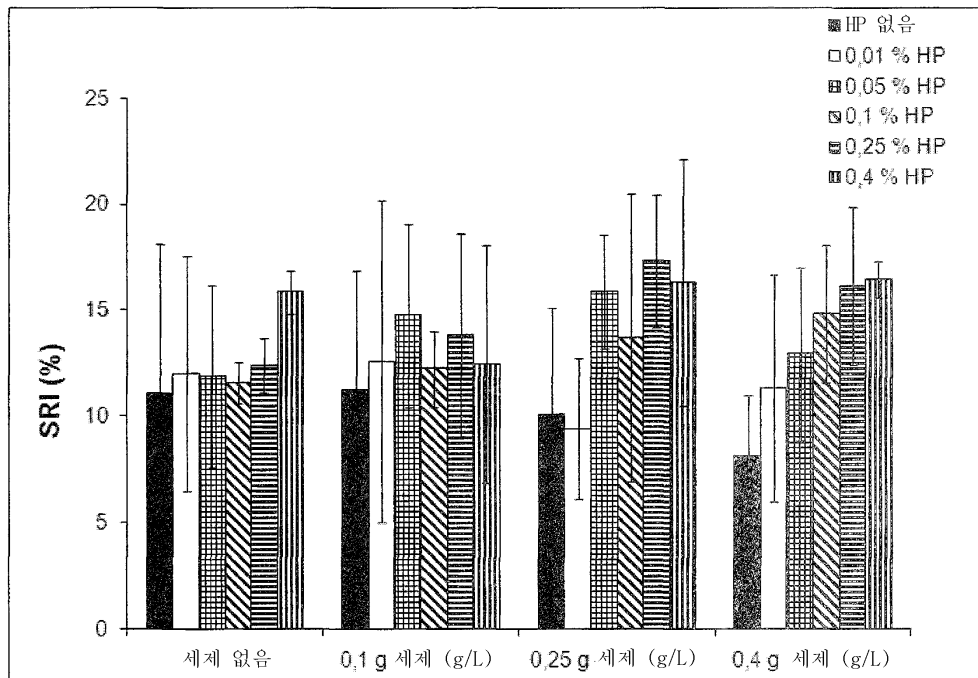
도면2e



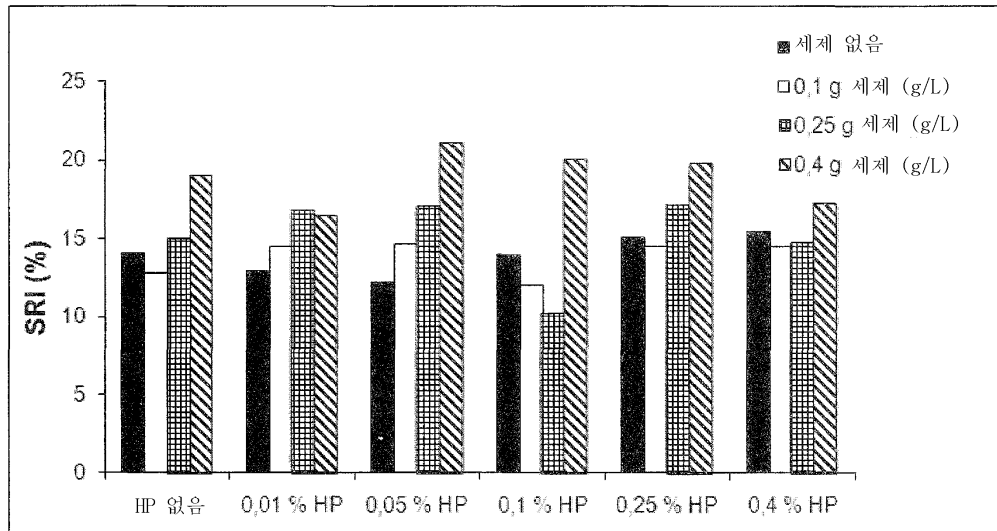
도면3a



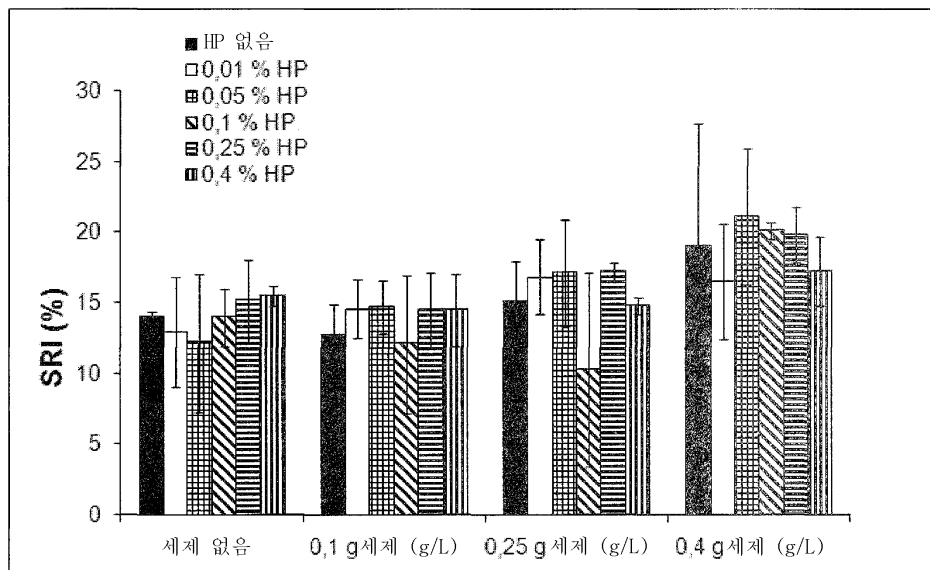
도면3b



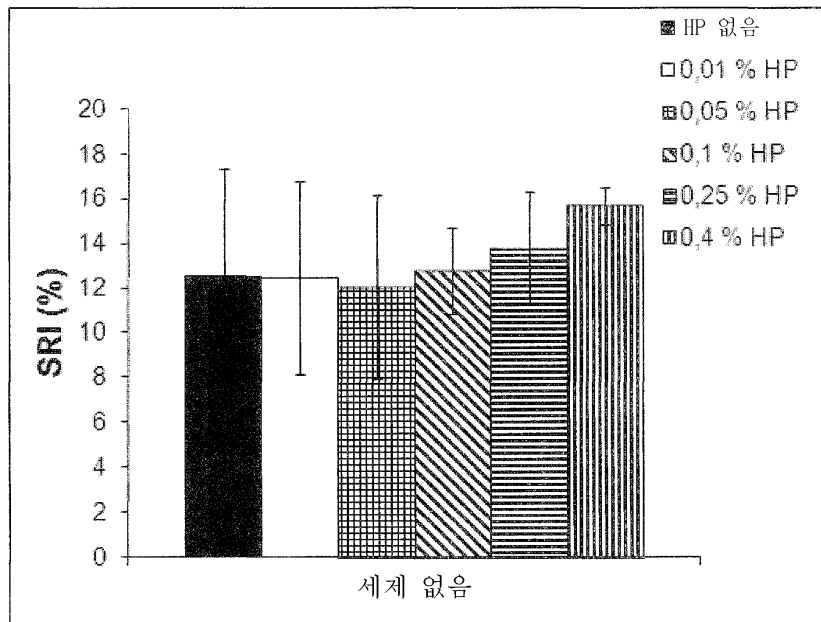
도면3c



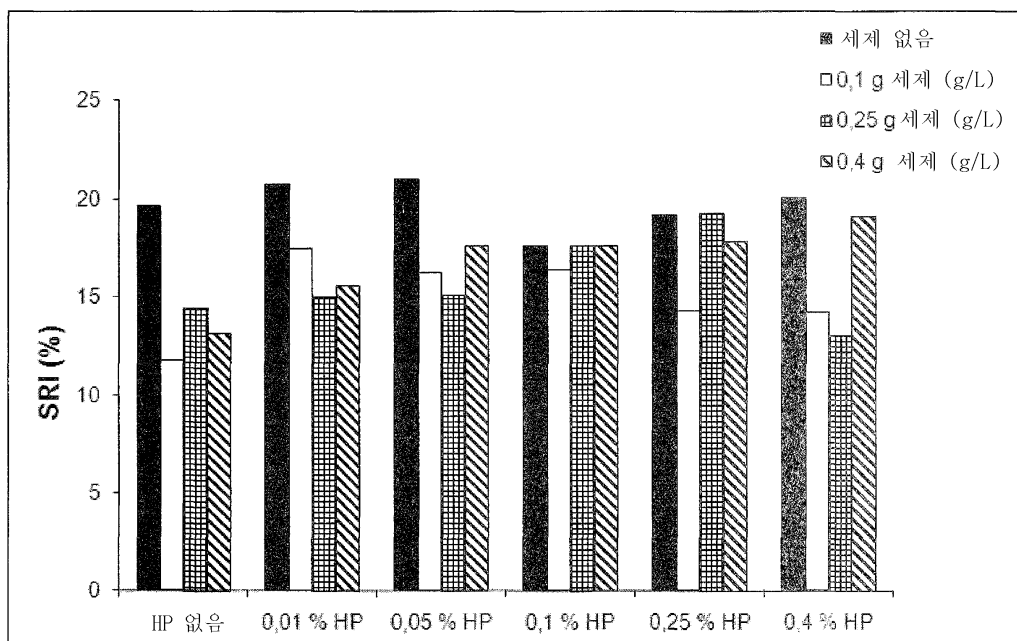
도면3d



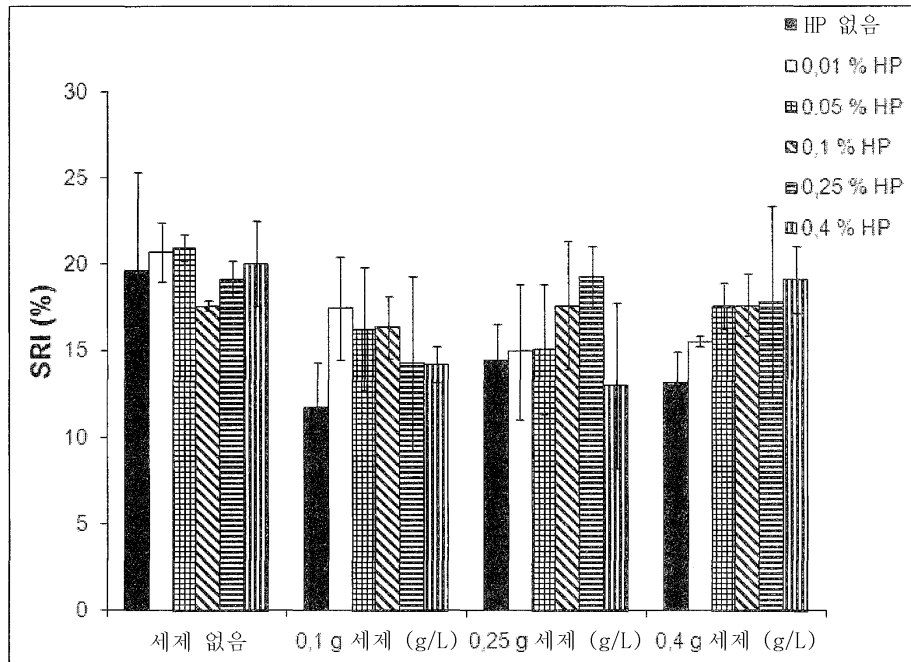
도면3e



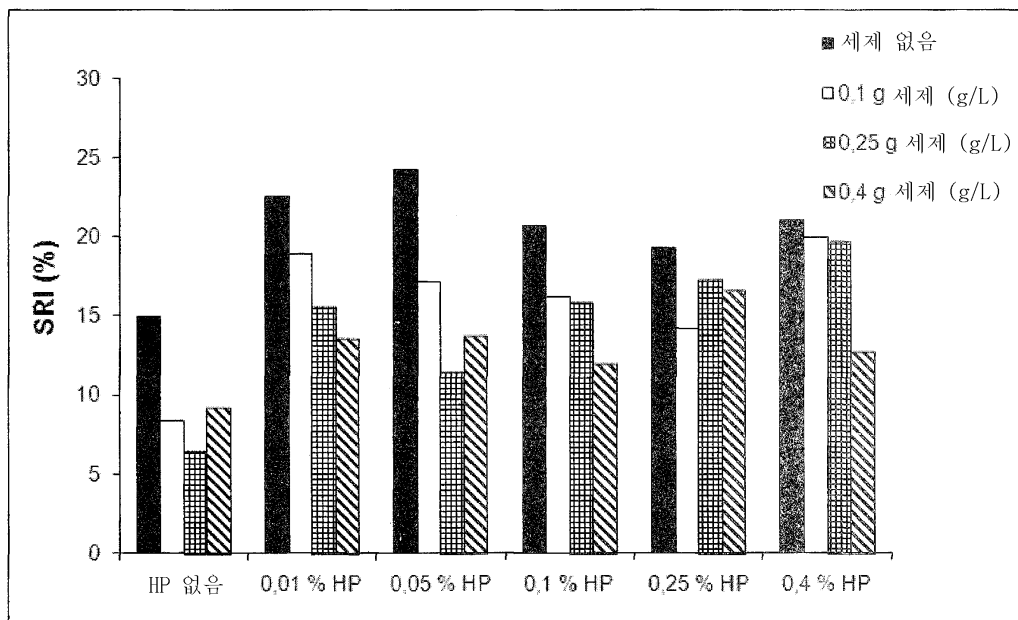
도면4a



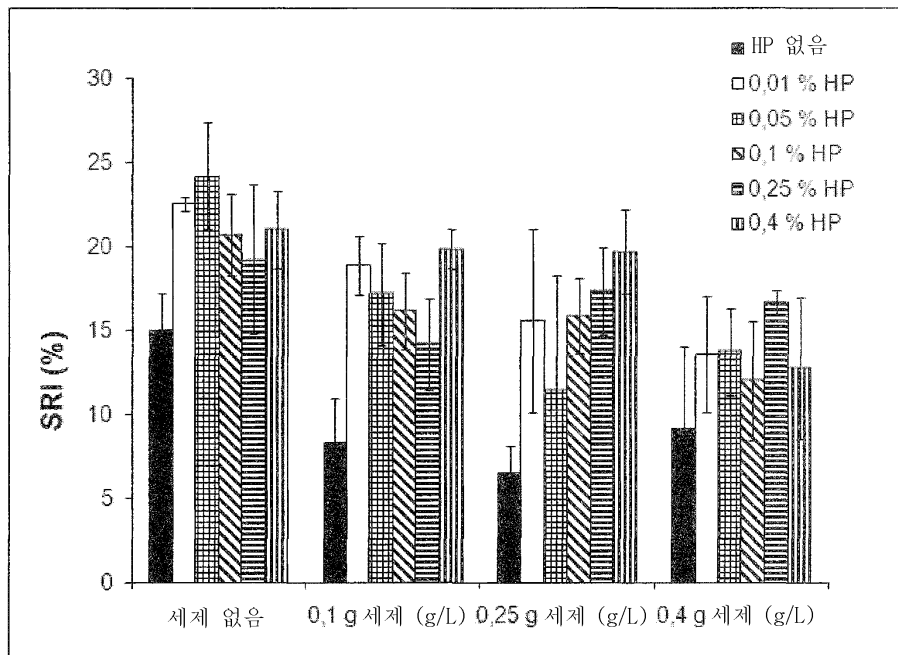
도면4b



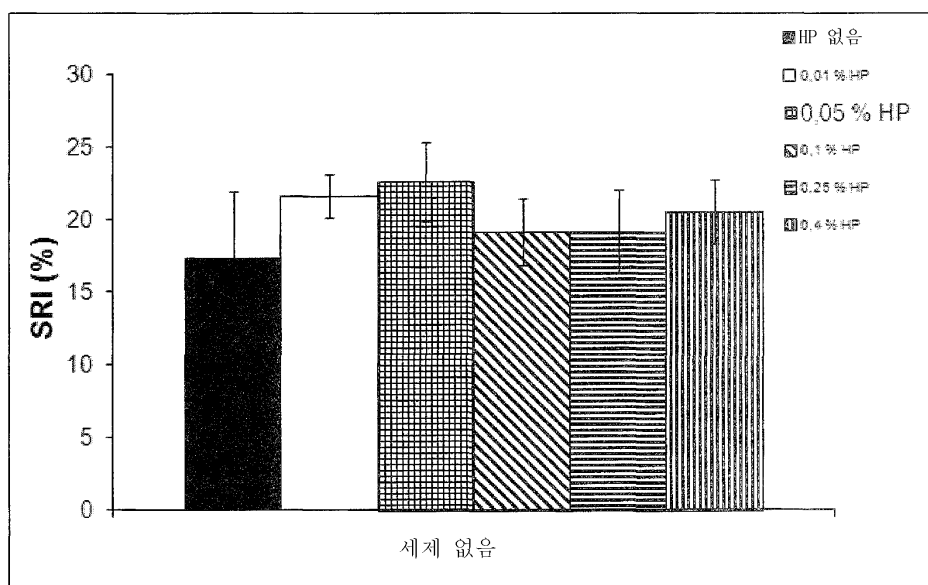
도면4c



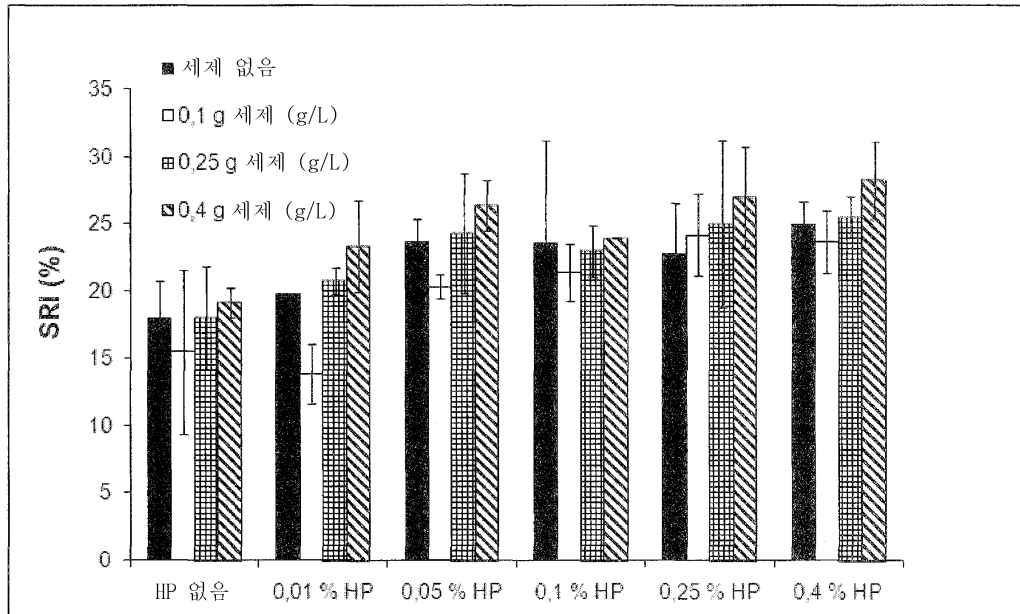
도면4d



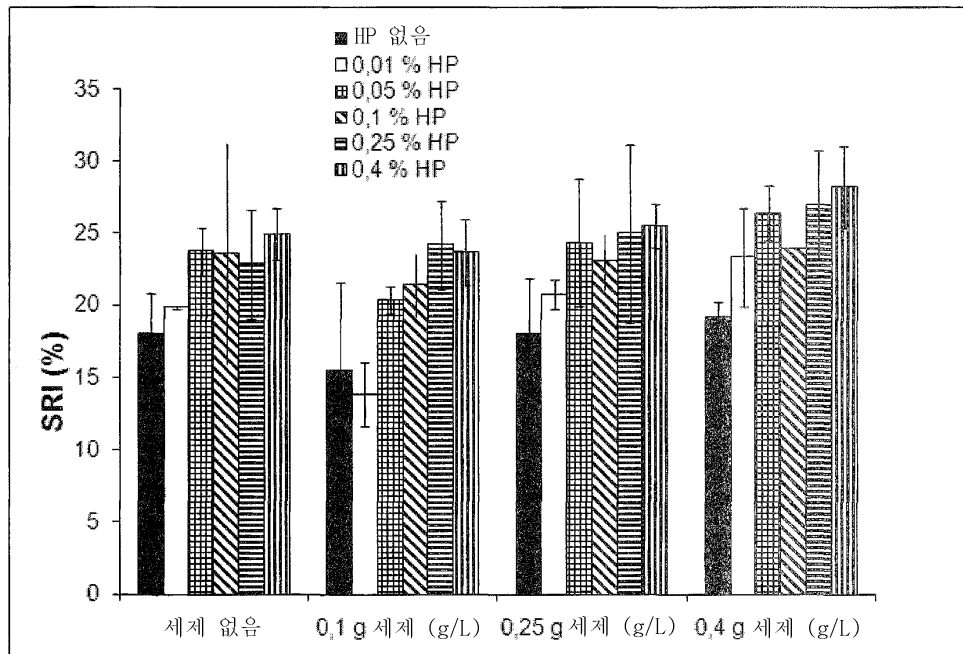
도면4e



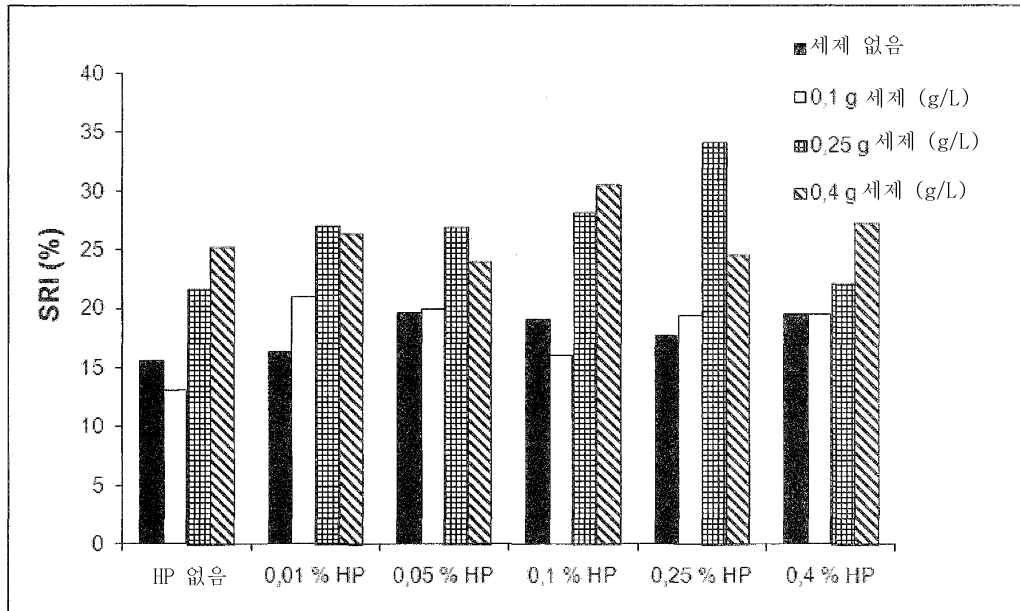
도면5a



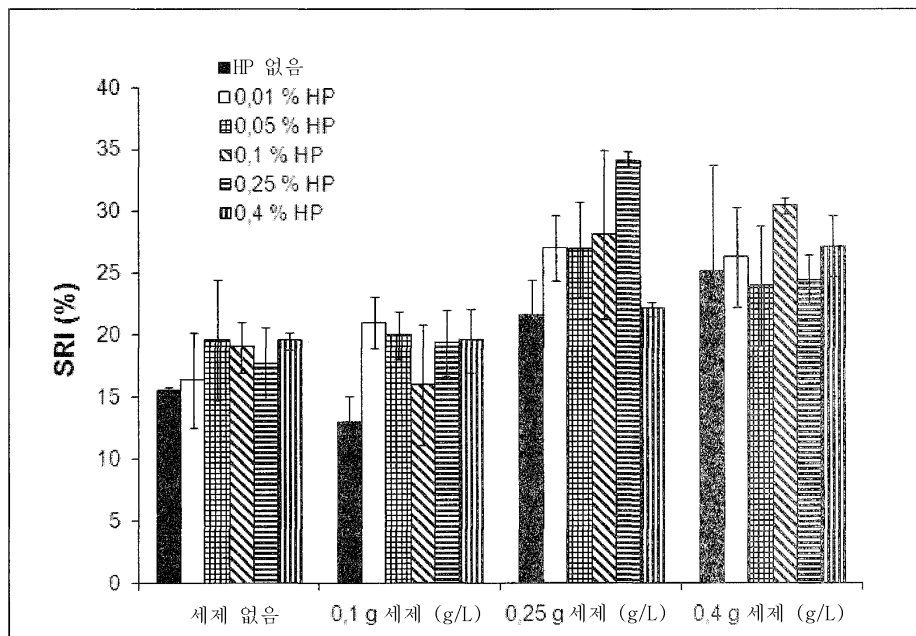
도면5b



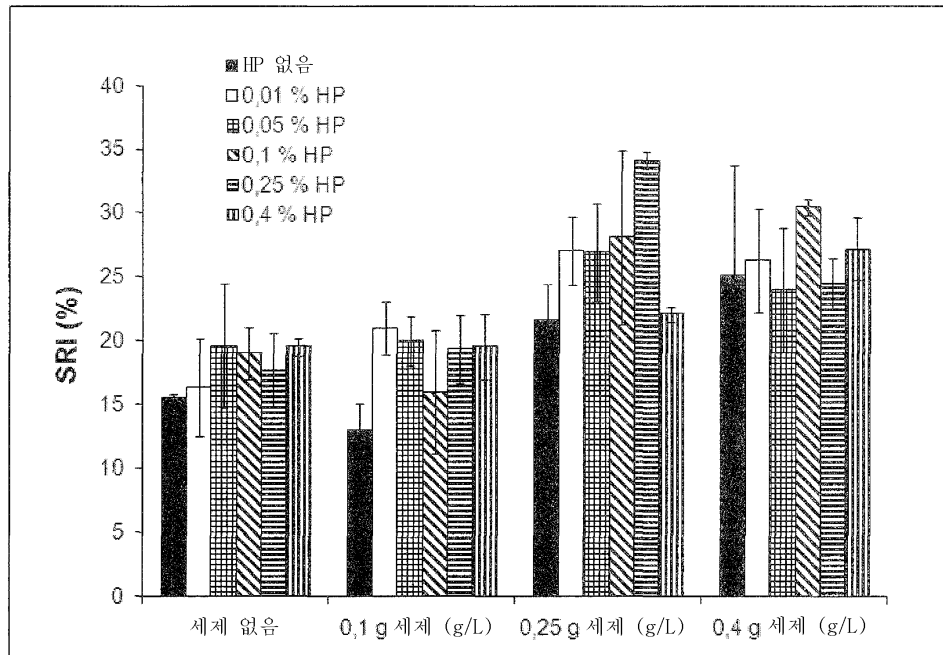
도면5c



도면5d



도면5e



도면6

서열 번호 1

트리코테르마 레에세이(Trichoderma reesei) HFBII (Y11894.1)

```

1  cacattcact caactcctct ttctcaactc tccaaacaca aacattcttt gttgaatacc
61  aaccatcacc acctttcaag atgcagttct tggccgtcgc cctcttcgcc accagcgccc
121 tggctgctgt ctgccctacc ggctctcttc ccaacctctc gtgctgtgcc accaacgtcc
181 tgcacctcat tggcgttgac tgcaagaccc gtatgttgaa ttccaatctc tgggcaccc
241 gacattggac gatacagttg acttacacga tgctttacag ctaccatcgc cgtcgacact
301 ggcgccatct tccaggtcca ctgtgccagc aagggtccca agcctctttg ctgctgtgct
361 cccgtggtaa gtatgtctcg caatggcaaa gaagtataaa gacatttggg cctggggtcg
421 ctaactcttg atatcaaggg cgaccaggct ctctgtgcc agaagggcat cggcaccttc
481 taaagcaatg gcttgcttta ctgcccgcag tctttgagaa ctctgggctc acaaaagacg
541 acttgcaatg atcatggggg ctgcgaaatg ggagatttg gaggggattg aggcctgggtt
601 tggcctatga gaggattgca taatggaaga ttgctgagca gacatagac gtatctagag
661 ttctagt
    
```

도면7

서열 번호 2

트리코테르마 레에세이 HFBII (P79073.1)

```

1  MQFFAVALFA TSALAAVCP T GLFSNPLCCA TNVLDLIGVD CKTPTIAVDT GAIFQARCAS
61  KGSKPLCCVA PVADQALLCQ KAIGTF
    
```

도면8

서열 번호 3

트리코테르마 레에세이 HFB1 (Z68124.1)

```

1   ttgtatggc tggatctcga aaggcccttg tcatcgccaa gcgtgggctaa tatogaatga
61  gggacacoga gttgcataat tctgatcatc tcaaacgaca agtgtgaggt aggcaatcct
121 cgtatcccat tgctgggctg aaagcttcac acgtatcgca taagcgtctc caaccaagtgc
181 ttaggtgacc cttaagcata cttacagtaa gactgtatta agtcagtcac tctttcactc
241 gggctttgaa tacgatcctc aatactcccg ataacagtaa gaggatgata cagcctgcag
301 ttggcaaatg taagcgtaat taaactcagc tgaacggccc ttgttgaaag tctctctcga
361 tcaaaagcaaa gctatccaca gacaaagggtt aagcaggctc actcttcta cgccctggat
421 atgcagcttg gccagcatcg cgcattggcca atgatgcacc cttcaccggc caacggatct
481 cccgttaaac tcccctgtaa cttggcatca ctcactctgt atcccaacag actgagttgg
541 gggctgcggc tggcggatgt cggagcaaa gatacattca agagcccgaga tccggttggg
601 ccatggccaa tggatctaga ttccggcact tgatctcgat cactgagaca tggtgagttg
661 cccggacgca ccacaaactcc cctgtgtcca ttgagtcacc atatgcgtct tctcagcgtg
721 caactctgag acggattagt cctcagcatg aaattaaact ccagcttaag ttcgtagcct
781 tgaatgagtg aagaatttc aaaaacaaac tgagtagagg tcttgagcag ctggggtggg
841 acgccccctc tcgaactctt ggacatcgta cggcagagaa tcaacggatt cacacetttg
901 ggtcgagatg agctgatctc gacagatacg tgcctcacca cagctgcagc tacctttggc
961 caacattgct gttccaggat cttgatctac atcaccgag cacccgagcc aggaaggaga
1021 gaacaatcgg gccacagagc agcaccgctc tccaactctg ctctggcaa cgtcacacaa
1081 cctgatatta gatataccc tgggtgattg ccatgcaaga gagtgggcag ttggtgatac
1141 cgactggcca tgcaagacgc ggcggggcta gctgaaatgt ccccgagagg acaattggga
1201 gcgtctatga cggcgtggag acgacgggaa aggactcagc cgtcatgttg tgttgccaat
1261 ttgagattgt tgaccgggaa aggggggacg agagagatgg ctgggtgagg tggattggg
1321 aggatgcac attcgactca gtgacgatg tagagctcca agaataaaa tatccctctc
1381 ctgtcttctc aaaaactcct tccatcttgt ccttcacag caccagagcc agcctgaaca
1441 cctccagtc acttccctta ccagtacatc tgaatcaaca tccattcttt gaaatctcac
1501 cacaaccacc atcttcttca aaatgaagtt cttcgccatc gccgctctct ttgcgcgcgc
1561 tgcggttgcc cagcctctcg aggacggcag caacggcaac ggcaatggtt gccctcccg
1621 cctcttcagc aaccccagtg gctgtgcac ccaagtcctt ggctcactcg gccttgactg
1681 caaagtcctg aagttgagcc ataacaatg aatcctcttg acggaaatat gccttctcac
1741 tctcttacc ctgaacagcc tcccagaacg tttagcagcg caccgaactc cgcaacgtct
1801 gcgccaacac cggcgcccg cctctctgct gcgtggcccc cgttgtaagt tgatgcccc
1861 gctcaagctc cagtcttgg caaacccatt ctgacacca gactgcagcg cggccaggtc
1921 cttctgtgcc agaccgcctg cgggtgctga gatgcccc ccgggtcaag gtgtgcccgt
1981 gagaaagccc acaaatgttt gatgaggacc atttccgcta ctgggaaagt tggctccagc
2041 tgtttgggca ggtttgggca agttgtgtg atattccatt cgtacgccat tcttattctc
2101 caataattca gtacactttt ctccataaat caaaaagact gctattctct ttgtgacatg
2161 ccggaaggga acaattgctc ttggtctctg ttatttgcaa gtaggagtgg gagattcgcc
2221 ttagagaaag tagagaagct gtgcttgacc gtggtgtgac tcgacgagga tggactgaga
2281 gtgttaggat taggtcgaaac gttgaagtgt atacaggatc gtctggcaac ccacggatcc
2341 tatgacttga tgcaatgggt aagatgaatg acagtgttag aggaaaagga aatgtccgcc
2401 ttcagctgat atccacgcca atgatacagc gatatacctc caatatctgt gggaaacgaga
2461 catgacatat ttgtgggaac aacttcaaac agcagagcaa gacctcaata tgcacatcca
2521 aagccaaaca ttggcaagac gagagacagt cacattgtcg tcgaaagatg gcatcgtacc
2581 caaatcatca gctctcatta tcgcctaaac cacagattgt ttgccgtccc ccaactccaa
2641 aacgttaacta caaaagacat gggcgaatgc aaagacctga aagcaaaccc tttttgcgac
2701 tcaattccct cctttgtcct cggaaatgat atccttcacc aagtaaaaga aaaagaagat
2761 tgagataata catgaaaagc acaacggaaa cgaaaagacc aggaaaagaa taaatctatc
2821 acgcaccttg tcccacactc aaaagcaaca gggggggtaa aatgaaat

```

도면9

서열 번호 4

트리코테르마 레에세이 HFB1 (P52754.1)

```

1   MKFFAIALF AAAVAQPLE DRNNGNVC PFGLFSNPQC CATQVLGLIG LDCKVPSQNV
61  YDGTDFRNVK AKTGAQPLCC VAPVAGQALL CQTAVGA

```

도면10

서열 번호 5

쉬조필름 콤포문(Schizophyllum commune) SC3 (M32329.1)

```

1 agtcgaacac cccagttcaa ctacccccagc ccttccttcc ttcgctatcc ttccttacaa
61 cctgctcgcc atgttctgccc gtctccccgt cgtgttctcc tacgctctcg tcgcttccg
121 cgcctctgct gctgcccctcc caggtggcca cccgggcaag acgtacgtcg acctctcaac
181 gtctctataat gtcttctgctga tgaagccccg tatagcacgc cgcggttac gacgacggtg
241 acggtgacca cgggtgagtag ctttctcgcc gtgcagcact cgaacgcatt ggtcaatttt
301 tgcctcatagc cgcctctgac gacgaccatc gccgcgggtg gcacgtgtac tacggggtcg
361 ctctcttctgt gcaaccagggt tcaatcggtg cgtacatcaa agcggcaca ccaggcatct
421 cagctgacgg ccacatcgta caggcgagca gcagccctgt taccgccctc ctcgccctgc
481 tcggcattgt cctcagcgac ctcaacgttc tegtgtgcat cagctgtctc cccctcactg
541 tgagatcttt ttgttcaactg tcccaattac tgcgcactga cagactttgc caggtcatcg
601 gtgtcggagg cagcgggtgt tggcgcgaga cgtctgtctg cgaacaacc caattcgtat
661 gtatactttc catgctgtgc cctttctcgg ctaatcatct gtagaacggg ctgatcaaca
721 tcgggttgac ccccatcaac atcctctgag caggtgaacg cgcctgtcgg tgggatttc
781 gggcgacggg agcctcgggc aatctgagcc tegtactgc ctagcaaat cggaatccct
841 tcgatgtcat agggctcggg acaagtgtac gtcttctac atactccaag gtgttgactc
901 attccctcag ataatgaaca ttgtgttgtt tgtgttgtt tctct

```

도면11

서열 번호 6

쉬조필름 콤포문 SC3 (AAA96324.1)

```

1 MFARLPVVFL YAFVAFGALV AALPGGHPGT TTPPVTTTIT VTPPSTTTI AAGGTCTTGS
61 LSCCNQVQSA SSSPVTALLG LLGIVLSDIN VLVGISCSPL TVIGVGSSGC SAQTVCCENT
121 QFNGLINIGC TPINIL

```

도면12

서열 번호 7

뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa) EAS (X67339.1)

```

1 atcatcagca tcaacatctt cacttcacaa catctttcca accttccaac tcaccttcca
61 aaccaccttc aaaccaact cccagcttct ttcagcaaac ccccaaccgc caaaatgcag
121 ttccaccagcg tcttcacat cctgcacatt gccatgacgc cctgtcggc cccgctgag
181 gttgttcccc gcgccaaccac catcggtccc aacacctgct ccatcgacga ctacaagcct
241 tactgtctgcc agtctatgtc cggccccgcc ggctcccttg gtctcctcaa cctcatcccc
301 gtgcacctca gcgcctcgct cggctcggtt gtcggtgtca tcgggtccca atgtggtgcc
361 agcgtcaagt gctgcaagga cgaatgtacc aacacccgca actccttctt catcatcaac
421 gctgccaact gcgttgcta agtggtttac cggcaacagc gcaaagtcta ggcaatgcct
481 tgttctcaac gctgctgcca gtccagcacc ccccttctgc agcaaggagc ccccttctgc
541 tggactggca gcacaacgag ctgctactac aacacaagca tcatgcctgg acgcaacaga
601 agccgataat cttgggggtt ggttttgggg gatgaagtg atgagttgat ggattggatc
661 gatattctac aatgcgtgtc tcttctgttt aagatctgct ttactatttt cctattttct
721 tttacacata gctatgtatc actaaggcct ggtgattaat acactctctt aacct

```

도면13

서열 번호 8

뉴로스포라 크라사 EAS (AAB24462.1)

```

1 MQFTSVFTIL AIAMTAAAP ABVVPRATTI GPNTCSIDY KPYCCQSMG PAGSPGLLNL
61 IPVDLSASIG CVVGVIGSQ GASVKCKDD VINTGNSFLI INANCV

```

도면14

서열 번호 9

탈라로마이세스 서모필루스(Talaromyces thermophilus) TT1

(전구체형 TT1 하이드로포빈을 코딩하는 DNA 서열, 미국 특허 제7241734호의

서열 번호 4)

```

1 atgaagttag ccggtgtctt gcttctgtgc gccgctgcgg cgactgccct gccaaaacgtc
61 ggccccagtg ggaagacggc tcacaagccg caccaggagc ctttctggcc tgtgcagcag
121 gacgtgaccg tggaaacagc caaggtcttc tgtggtgaag gcaaccaggt cgcttctctc
181 aacgaggtca gctacgcggg cgacaccacc gaaatcgga cgggccccct ggctggcacc
241 ctcaaggacc tgcctggcgg caagaacggc gccaaagggc tgggtctctt cgacaagtgc
301 tcgctgtctc atgtcgatct cctgcttggc ctgtcgagcc tcatcaacca agaatgcaag
361 cagcacattg cctgctgcca gggcaacgag gccgattcct ccaacgacct catcggtctc
421 aacattcctt gattgcctt tggctcgctg ctg

```

도면15

서열 번호 10

탈라로마이세스 서모필루스 TT1 (전구체형 TT1 하이드로포빈의 아미노산 서열,
미국 특허 제7241734호의 서열 번호 3)

```

1 MKFAGVLLAV AARTALPNV GPSCKTAHKP HQEPFVQVQQ DVTVEQAKAI CGEGNQVACC
61 NEVSYAGDTT EATGFLAGT LKDLLGGKNG AKGLGLFDKC SRLNVDLLLG LSSLINQECK
121 QRIACCGGNE ADSSNDLIGL NIPCIALGSL L

```

도면16

서열 번호 11

```

EVSQDLFNQFNLFQAQYSAAYCGKNNDAPAGTNTCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGVGD
VTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLNFIDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLRQ
KVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTV
QTGGTLRYRTHNTDIVRPLPPREFGYSHSSPEYWIKSGTLVPVRRRDIVKIEGIDATGGNNQPNIP
DIPAHLLWYFGLIGTCL

```

도면17

서열 번호 12

```

MLPWKRALRPLSALMLAVAVALTTPAATATADTTTAAPSSGWNDYDCKPSAAHPRPVVLV
HGTLGNSVDNWLVLAPYLKRGYCVFSLDYGQLPGVPFFHGLGPVDKSAEQLDAYVDKVLV
ATGAPEADIVGHSQGGMMPRYYLKFLLGGAAGVNALVGIAPSNHGTDLNGFTALLPYFPGAAD
LLGRHTPALADQVTGSAFLTRLNADGDTVAGVRYTVIATRYDEVVTPWRSQYLSGPNVRNVL
LQDLCPLDLSEHVAIGVFDLIAYHEVANALDPAHATPTTCASVFG

```

도면18

서열 번호 13

Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Asp Phe Thr Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr
Cys Asn Ser Gly Thr Ala Ala Gly Ala Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Ile Glu Ser
Asn Gly Val Thr Val Val Ala Ser Phe Thr Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ser Thr Asp
Ser Ser Arg Lys Glu Ile Val Val Ala Ile Arg Gly Ser Ser Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu
Asp Phe Asp Gln Ser Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Asn Ala
Trp Ala Glu Ile Ser Ala Gln Ala Ser Ala Ala Val Ala Lys Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Lys
Val Val Ala Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Leu Ser Ala Ala Asn Leu Arg Ala Ala
Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Ala Ala Leu Ser Ala Phe Ile
Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Phe Arg Val Thr His Asp Lys Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro
Leu Ile Phe Gly Tyr Arg His Thr Pro Glu Tyr Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Lys Val Asp
Tyr Ala Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn Leu Met Cys Asn Gly Gly Thr Leu
Gly Leu Asp Ile Asp Ala His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser
Trp Arg

도면19

리파아제 3 - 서열 번호 29

```

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu
-27   -25   -20   -15
Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser
-10   -5     1     5
Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr
      10     15     20
Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala
      25     30     35
Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu
      40     45     50
Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala
      55     60     65
Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr
      70     75     80     85
Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp
      90     95    100
Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp
     105    110    115
Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser
     120    125    130
Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly
     135    140    145
Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser
     150    155    160    165
Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu
     170    175    180
Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr
     185    190    195
His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe
     200    205    210
Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser
     215    220    225
Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
     230    235    240    245
Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Val Ala His Leu Trp Tyr
     250    255    260
Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu *
     265    270

```

도면19a

서열 번호 14

```

Ser Val Ser Thr Ser
 1      5

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr
      10      15      20

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala
      25      30      35

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu
      40      45      50

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala
      55      60      65

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr
      70      75      80      85

Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp
      90      95      100

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp
      105      110      115

Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser
      120      125      130

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly
      135      140      145

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser
      150      155      160      165

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu
      170      175      180

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr
      185      190      195

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe
      200      205      210

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser
      215      220      225

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
      230      235      240      245

Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Val Ala His Leu Trp Tyr
      250      255      260

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu *
      265      270
  
```

도면20

서열 번호 15

```

VYITEVSQNLNSELRGEEELLEQVEEIAAISGKGKVNVLVGHSHGGPTVRYVAAVRPDLVASVTS
VGAPHKGSDDTADFIQIPPGSAGEAIVAGIVNGLGALINFLSGSSSTSPQNALGALESLNSEGAA
AFNAKYPGQIPTSACGEGAYKVNVSYYWSGTSPLTNVLDVSDLLGASSLTFDEPNDDLGVG
RCSSHLGKVRDDYRMNHLDEVNQTFGLTSLFETDPVTYRQQANRIKLAGL
  
```

도면21

서열 번호 16

```

ANPYERGPNPTDALLEASSGPFVSEENVSRLSASGFGGGTIYYPRENNITYGAVAISPGYTGTGTE
ASIAWLGERIASHGFVITIDITITLDQPDRAEQNLNAALNHMINRASSTVRSRIDSSRLAVMGH
SMGGGGTLRLASQRPDLKAAIPLTPWHLNKNWSSVTPTLIIGADLDTIAPVATHAKPFYNLSL
SSISKAYLELDGATHFAPNIPNKIIGKYSVAWLKRFVDNDTRYTQFLCPGPRDGLFGEVEEYRS
TCPF
  
```

도면22

서열 번호 17

DTTTAAPSSGWN DYDCKP SAAHPRFVVLVHGTLGNSVDNWLVLAPYL VKRGYCVFSLDYGQ
LPGVPPFFHGLGPVDKSAEQLDAYVDKVLAAATGAPEADIVGHSQGGMMPRYYLKFLGGA AKV
NALVGIAPSNHGTDLNGFTALLPYFPGAADLLGRHTPALADQVTGSAFLTRLNADGDTVAGV
RYTVIATRYDEVVTPWRSQYLSGPNVRNVLLQDL CPLDLSEHV AIGVFDLIA YHEVANALDPA
HATPTTCASVFG

도면23

서열 번호 18

MRSSLVLFFVSAW TALASPIRREV SQDLFNQFNLF AQYSAAYCGKNNDAPAGTNTCTGNAC
PEVEKADATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLNF DLKEINDICSG
CRGHDGFTSSWRSVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRNGYDID
VFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQTGGTLYRITH TNDIVPRLPPREFGYSHSSPEY WIKSGTLPVVR
RRDIVKIEGIDATGGNNQPNIPDIP AHLWYFGLIGTCL

도면24

서열 번호 19

MNNKKTLLALCIGSSLLSGPAEAGLFGSTGYTKTKYPIVLTHGLLGFD SILGV DYWYGIPSSL
RSDGASVYITEVSQ LNTSELRGEELLEQVEEIAAISGKGKVN LVGHSHGGPTVRYVAAVRPDL
VASVTSVGAPHKGS DTADFIRQIPPGSAGEAIVAGIVNGLGALINFLSGSSSTSPQNALGALES L
NSEGAAAFNAKYPQGIPTSACGEGAYKVN GVSYYSWGS TSPLTNVLDVSDLLGASSLTFDEP
NDGLVGRCSSHLGK VIRDDYRMNHLEVNQTFGLTSLFETDPVTVYRQQANRLKLAGL

도면25

서열 번호 20

MAVMTPRRERSLLSRALQV TAAATALVTAVSLAAPAHAA NPYERGPNPTDALLEASSGPFS
VSEENVSRLSASGFGGGTIYYPRENNTYGAV AISPGYTGTEASIAWLGERIASHGFVVITIDITIT
LDQPD SRAEQNLNAALNHMINRASSTVRSRIDSSRLAVMGHSMGGGGTLRLASQRPDLKAAIPL
TPWHLNKNWSSVTVPTLIIGADLDTIAPVATHAKPFYNSLPSSISKAYLELDGATHFAPNIPNKII
GKYSVAWLKRFDNDTRYTQFLCPGPRDGLFGEVEEYRSTCPF

도면26

서열 번호 21

1	EAEA	AVGVT	TDFT	NFKFYI	QHGA	AAYCNS	GTAAG	AKITC	SNNGC	PTIES
51	NGVT	VVASFT	GSKT	GIGGYV	STDSS	RKEIV	VAIRG	SSNIR	NWLTN	LDLFDQ
101	SDCS	LVSGCG	VHSG	FQNAWA	EISA	QASAAV	AKARK	ANPSF	KVVAT	GHS LG
151	GAVAT	LSAAN	LRAAG	TPVDI	YTYG	APRVGN	AALSA	FISNQ	AGGEF	RVTHD
201	KDPV	PRLPPL	IFGY	RHTTPE	YWL	SGGGDK	VDYA	ISDVKV	CEGA	ANLMCN
251	GGTL	GLDIDA	HLHY	FQATDA	CNAG	GFSWR				

도면27

서열 번호 22

GACACCACGACCGCGGCACCCTCCTCGGGCTGGAACGACTACGACTGCAAG
CCGTCCGCCCGCGCACCCCGCCCGTGGTCTCTCGTCCACGGCACGCTCGGC
AACAGCGTGGACAACTGGCTGGTCTCTGGCCCGTACCTCGTCAAGCGCGGC
TACTGCGTGTCTCTCTGGACTACGGCCAGCTGCCGGGCGTGCCCTTCTTCC
ACGGCCTGGGCCCCGGTGGACAAGAGCGCCGAGCAGCTGGACGCCTACGTGG
ACAAGGTGCTCGCCGCCACCGCGCGCCCGGAGGCGGACATCGTCTGGGCACT
CGCAGGGGGGCATGATGCCCGGTACTACCTGAAGTTCTCTCGGCGGGGCGG
CCAAGGTCAACGCCCTGGTGGGCATCGCCCCCTCGAACCACGGGACGGACC
TCAACGGCTTACCGCCCTCCTGCCGTACTTCCCGGGCGCCGCGGACCTCCT
CGGCCGGGCACACCCCGGCGCTGGCCGACCAAGGTACCGGGAGCGCGTTCCT
GACCCGCTGAACCGGGACGGCGACACGGTCGCGGGGGTCCGCTACACCGT
CATCGCCACGCGCTACGACGAGGTCTGTCACCCCTGGCGGTCCCACTACCT
GAGCGGCCGGAACGTCCGGAACGTGCTGCTCCAGGACCTGTGCCCTCTCGA
CTTGAGCGGAACACGTGGGCATCGGCGTGTTCGACCTCATCGCATAACACGAG
GTCGCCAACGCCCTGGACCCGGCGCACGCCACCCCAACGACCTGCGCGTCC
GTCTTCGGC

도면28

서열 번호 23

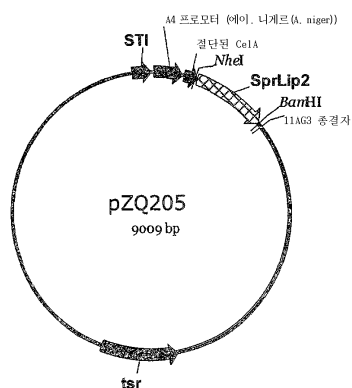
ATGGGCTTTGGGAGCGCTCCCATCGCGTTGTGTCCGCTTCGCACGAGGAGGAACGCTTTGA
AACGCCTTTTGGCCCTGCTCGCGACCGGGCGTGTGATCGTCCGGCTGACTGCGCTAGCCGG
CCCCCGGCACAGGCCGACACACGACCGCGGCACCTCTCGGGCTGGAACGACTACGA
CTGCAAGCGTCCGCCGCGCACCCCGCCCGTGGTCTCTGTCACGGCACGCTCGGCAAC
AGCGTGGACAACGTGGTCTGCCCCGTACCTCGTCAAGCGCGGCTACTGCGTGTCT
CCCTGGACTACGGCCAGCTGCCGGGCGTGCCCTTCTTCCACGGCTGGGCGCGGTGGACA
AGAGCGCCGAGCAGCTGGACGCTACGTGGACAAGGTGCTCGCCGCCACCGCGCCCCGG
AGGCGGACATCGTCGGGCACTCGCAGGGGGGCATGATGCCCGGTACTACCTGAAGTTC
TCGGCGGGCGGCGCAAGGTCAACGCCCTGGTGGGCATCGCCCCCTCGAACCACGGGACGG
ACCTCAACGGCTTACCGCCCTCTGCGGTACTTCCCGGGCGCCCGGACCTCTCGGCCG
GCACACCCCGCGCTGGCCGACCAAGGTACCGGGAGCGGTTCTGACCCGCTGAACGC
GGACGGGACACGCTCGCGGGGTCCGCTACACCGTCATCGCCACGCGCTACGACGAGGT
CGTACCCCTTGGCGTCCAGTACTGAGCGGCCGGAACGTCCGGAACGTGCTGCTCCA
GGACCTGTGCCCTCGACTTGAGCGAACACGTGGCCATCGCGGTGTTCGACCTCATCGCA
TACCACGAGGTGCGCAACGCCCTGGACCCGGCGCACGCCACCCCAACGACCTGCGCGTCC
GTCTTCGGC

도면29

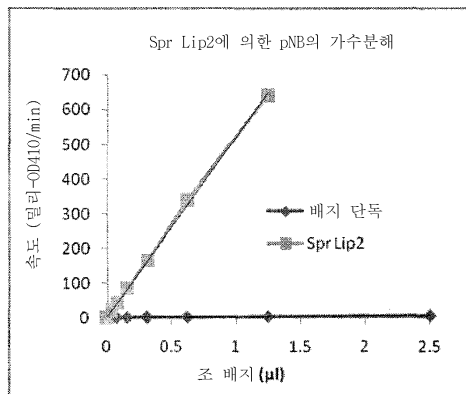
서열 번호 24

MGFGSAPIALCPLRTRRNALKRLLALLATGVSIVGLTALAGPPAQADTTTAAPSSGWNDYDCK
PSAAHPRPVVLVHGTGLGNSVDNWLVLAPYLVKRGYCVFSLDYGLPGVPFFHGLGPVDSAE
QLDAYVDKVLAAATGAPEADIVGHSQGGMMPRYYLKFLGGAAKVNALVGIAPSNHGTDLNGF
TALLPYFPGAADLLGRHTPALADQVTGSAFLTRLNADGDTVAGVRYTVIATRYDEVVTPWRS
QYLSGPNVRNVLLQDLCLDLSEHVAIGVFDLIAHYEVANALDPAHATPTTCASVFG

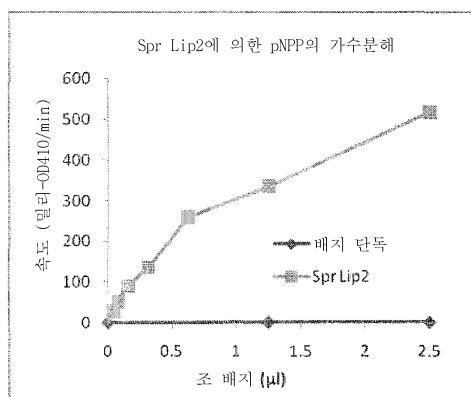
도면30



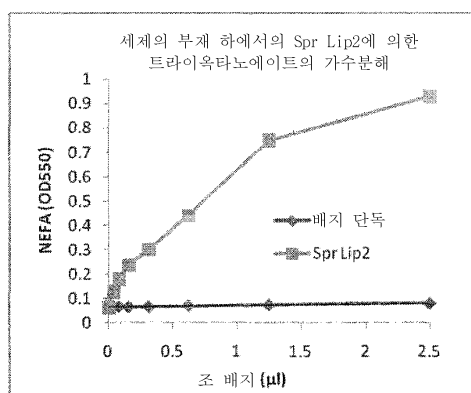
도면31



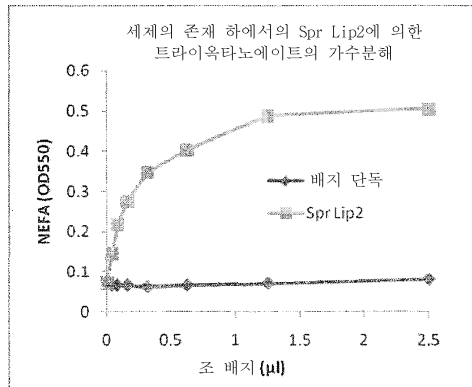
도면32



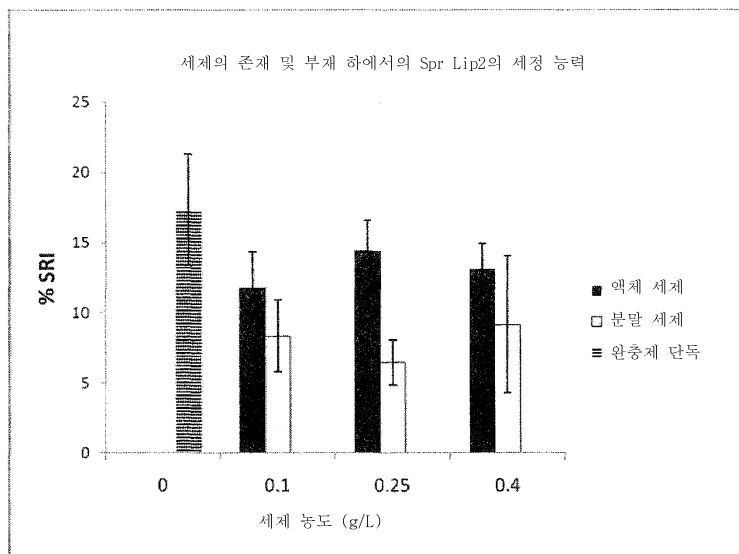
도면33



도면34



도면35



도면36

서열 번호 25

MKCCRIIMFVLLGLWVFGLSVPGGRTEAASLRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVGRGDIEQWLN
DNGYRTFTLAVGLSSNWDRAEYALVGGTVDYGAHAHAKHGHRFGRTYPGLLPELKRGRGTHIAH
SQGGOTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHFVLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFTRFFD
LQKAVLEAAVASNVFYTQVDFKLDQWGLRRQPGESFDHYFERLKRSPVWTSTDTARYDLSVSGARKL
NQWVOASPNNTYLSFSTERTYRGALTGNHYFELGMNAFSAVVCAPFLGSYRNPTLGIDDRWLENDGIVNT
VSMNGPKRGSSDRIVPYDGTLLKKGWVNDMGTYNVNDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLRRLAQSLQP

도면37

서열 번호 26

DDYSVVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGFVNYESMKWLDDWGKITVFRAMYTSSG
GYIDDFSVKEKVKETVEAIDLGIYVIDWHILSDNDPNIIYKEBAKDFDEMSELYGDYPNVIYETIANEP
NGSDVTWDLQIKPYAEEVIFVIRNDNDPNIIYVIGTGTWSDVHHAADNLADPNVMYAFHFYAGTHGQNL
RDQVYALDQGAALFVSEWGTSAATDGGVFLDEAQWIDFMDERLNSWANWSLTHKDESSAALMPGANP
TGGWTEAELSPSGTFVREKIRASASDNDPIPDDEASLRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGV
RGDIEQWLNNDNGYRTFTLAVGLSSNWDRAEYALVGGTVDYGAHAHAKHGHRFGRTYPGLLPELKR
GGRTHIAHSGGGOTARMLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHFVLSVTTIATPHDGTTLVNM
VDFTDRFFDLQKAVLEAAVASNVFYTQVDFKLDQWGLRRQPGESFDHYFERLKRSPVWTSTDTARYD
LSVSGAELNQWVOASPNNTYLSFSTERTYRGALTGNHYFELGMNAFSAVVCAPFLGSYRNPTLGIDDRW
LENDGIVNTVSMNGPKRGSSDRIVPYDGTLLKKGWVNDMGTYNVNDHLEIIGVDPNPSFDIRAFYLRRLAQSLQP

도면38

서열 번호 27

MKPVKRRITIALVTILMLSVTSLFALQPSAKAAEHNPVVMVHGIGGASFNPAIGIKSYLVSQGWSRDKLYAV
DFWDKTGTNYNNGPVLRSFVQKVLDETGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDDGNKVANVVTLGANRLT
TGKALPGTDPNQKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGNRVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGGQN
TN

도면39

서열 번호 28

DDYVVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKQMSHGLQMYGQFVNYESMKWLRDDWGITVFRAM
YTSSGGYIDDPVKEKVTVEAAILDLGIYVILDWHLSDNDPNIVIGTGTWSQDVHHAADNLADPNV
NVIYEIANEPNGSDVTWQNIKPYAEEVIFVIRDNDPNIVIGTGTWSQDVHHAADNLADPNV
MYAFHFYAGTHGQNLRDQVDYALDQGAIFVSEWGTSAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDERNLSWA
NWSLTHKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIREASDNDNDPIPDDEAEHNPVVM
VHGIGGASFNPAIGIKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVLRSFVQKVLDETGAKKVDI
VAHSMGGANTLYYIKNLDDGNKVANVVTLGANRLTGTGKALPGTDPNQKILYTSIYSSADMIVM
YLSRLDGNRVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGGQNTN

도면40

서열 번호 30

atgcatacgcggtgtaac

서열 목록

<110> DANISCO US, Inc

<120> Compositions

<130> P040179W0

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 667

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 1

caacttcaact caactctctt ttctcaactc tccaaacaca aacattcttt gtgtaatacc 60

aacctatcacc acctttcaag atgcagttct tcgccgtcgc cctcttcgcc accagcgccc 120

tggctgctgt ctgccctacc ggcctcttct ccaacctct gtgctgtgcc accaacgtcc 180

tcgacctcat tggcgttgac tgcaagacc gtagttgaa ttccaatctc tgggcatcct 240

gacattggac gatacagttg acttacacga tgctttacag ctaccatcgc cgtcgacact 300

ggcgccatct tccaggetca ctgtgccagc aagggtccca agcctctttg ctgcgttgc 360

cccgtggtaa gtagtgctcg caatggcaaa gaagtaaaaa gacatttggg cctgggatcg 420

ctaactcttg atatcaaggc cgaccaggct ctctgtgcc agaaggccat cggcaccttc 480

taaagcaatg gcttgcttta ctgccggcag tctttgagaa ctctgggctc aaaaaagacg 540

acttgcattgt atcatggggg ctgcgaaatg ggaggatttg gaggggattg aggctgggtt 600
 tggcctatta gaggattgca taatggaaga ttgctgagca ggacatagac gtatctagag 660

ttctagt 667

<210> 2
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei
 <400> 2

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

Asp Thr Gly Ala Ile Phe Gln Ala His Cys Ala Ser Lys Gly Ser Lys
 50 55 60
 Pro Leu Cys Cys Val Ala Pro Val Ala Asp Gln Ala Leu Leu Cys Gln
 65 70 75 80
 Lys Ala Ile Gly Thr Phe
 85

<210> 3
 <211> 2868
 <212> DNA
 <213> Trichoderma reesei
 <400> 3

tttgatggc tggatctcga aaggcccttg tcatcgccaa gcgtggctaa tatcgaatga 60
 gggacaccga gttgcatatc tctgatcat tcaaagcaca agtgtgaggt aggcaatcct 120

cgatatccat tgetgggctg aaagcttcac acgtatcgca taagcgtctc caaccagtgc 180
 ttaggtgacc ctttaaggata cttacagtaa gactgtatta agtcagtcac tctttcactc 240
 gggctttgaa tacgatcctc aatactcccg ataacagtaa gaggatgata cagcctgcag 300
 ttggcaaatg taagcgtaat taaactcagc tgaacggccc ttgttgaaag tctctctcga 360
 tcaaagcaaa gctatccaca gacaagggtt aagcaggctc actcttccta cgccttggat 420

atgcagcttg gccagcatcg cgcatggcca atgatgcacc cttcacggcc caacggatct	480
cccgttaaac tcccctgtaa cttggcatca ctcatctgtg atcccaacag actgagttgg	540
gggctgcggc tggcggatgt cggagcaaag gatcacttca agagcccaga tccggttgg	600
ccattgcaa tggatctaga ttcggcacct tgatctcgat cactgagaca tggtagattg	660
cccggacgca ccacaactcc cctgtgtca ttgagtcctc atatgctct tctcagcgtg	720
caactctgag acggattagt cctcacgatg aaattaactt ccagcttaag ttcgtagcct	780
tgaatgagtg aagaaatttc aaaaacaaac tgagtagagg tcttgagcag ctggggtgg	840
acgccctcc tgcactcttg ggacatcgta cggcagagaa tcaacggatt cacacctttg	900
ggtcgagatg agctgatctc gacagatacg tgcttcacca cagctgcagc tacctttgcc	960
caaccattgc gttccaggat cttgatctac atcaccgcag caccgcagcc aggacggaga	1020
gaacaatccg gccacagagc agcaccgctt tccaactctg ctctggcaa cgtcacacaa	1080
cctgatatta gatatccacc tgggtgattg ccattgcaga gaggtggcag ttggtgatac	1140
cgactggcca tgcaagacgc ggccgggcta gctgaaatgt ccccgagagg acaattggga	1200
gcgtctatga cggcgtggag acgacgggaa aggactcagc cgtcatgttg tgttgccaat	1260
ttgagattgt tgaccgggaa aggggggacg aagaggatgg ctgggtgagg tggattggg	1320
aggatgcac attcgactca gtgagcgatg tagagctcca agaataaaa tatcccttct	1380
ctgtcttctc aaaatctctt tccatcttgt ccttcacag caccagagcc agcctgaaca	1440
cctccagtca acttccctta ccagtacatc tgaatcaaca tccattcttt gaaatctcac	1500
cacaaccacc atcttcttca aaatgaagtt ctctgccatc gccgtctctt ttgccgccgc	1560
tgccgttgcc cagcctctcg aggaccgcag caacggcaac ggcaatgttt gccctcccgg	1620
cctcttcagc aacccccagt gctgtgccac ccaagtctt ggctcatcg gccttgactg	1680
caaagtccgt aagttgagcc ataacataag aatcctcttg acggaaatat gccttctcac	1740
tcctttacc ctgaacagcc tcccagaacg ttacgacgg caccgacttc cgcaacgtct	1800
gcgcaaaaac cggcgcccag cctctctgct gcgtggcccc cgttgtaagt tgatgcccc	1860
gtcaagctc cagtccttgg caaacccatt ctgacacca gactgcaggc cggccaggct	1920
cttctgtgcc agaccgccgt cgggtcttga gatgccgcc cggggtcaag gtgtgccgt	1980
gagaaagccc acaaagtgtt gatgaggacc atttccgta ctgggaaagt tggctccacg	2040
tgtttgggca ggtttgggca agttgtgtag atattccatt cgtacgcat tcttattctc	2100
caatatttca gtacactttt cttcataaat caaaaagact gctattctct ttgtgacatg	2160

ccggaaggga acaattgctc ttggctctctg ttatttgcaa gtaggagtgg gagattcgcc 2220

ttagagaaag tagagaagct gtgcttgacc gtggtgtgac tcgacgagga tggactgaga 2280

gtgttaggat taggtcgaaac gttgaagtgt atacaggatc gtctggcaac ccacggatcc 2340

tatgacttga tgcaatgggtg aagatgaatg acagtgtgaa aggaaaagga aatgtccgcc 2400

ttcagctgat atccacgcca atgatacagc gatatacctc caatatctgt gggaacgaga 2460

catgacatat ttgtgggaac aacttcaaac agcgagccaa gacctcaata tgcacatcca 2520

aagccaaaca ttggcaagac gagagacagt cacattgtcg tcgaaagatg gcatcgtacc 2580

caaatcatca gctctcatta tcgcctaaac cacagattgt ttgccgtccc ccaactccaa 2640

aacgttacta caaaagacat gggcgaatgc aaagacctga aagcaaacc tttttcgac 2700

tcaattccct cctttgtcct cggaatgatg atccttcacc aagtaaaaga aaaagaagat 2760

tgagataata catgaaaagc acaacggaaa cgaagaacc aggaaaagaa taaatctatc 2820

acgcaccttg tccccacact aaaagcaaca gggggggtaa aatgaaat 2868

<210> 4

<211> 97

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 4

Met Lys Phe Phe Ala Ile Ala Ala Leu Phe Ala Ala Ala Val Ala

1 5 10 15

Gln Pro Leu Glu Asp Arg Ser Asn Gly Asn Gly Asn Val Cys Pro Pro

20 25 30

Gly Leu Phe Ser Asn Pro Gln Cys Cys Ala Thr Gln Val Leu Gly Leu

35 40 45

Ile Gly Leu Asp Cys Lys Val Pro Ser Gln Asn Val Tyr Asp Gly Thr

50 55 60

Asp Phe Arg Asn Val Cys Ala Lys Thr Gly Ala Gln Pro Leu Cys Cys

65 70 75 80

Val Ala Pro Val Ala Gly Gln Ala Leu Leu Cys Gln Thr Ala Val Gly

85 90 95

Ala

<210> 5
 <211> 945
 <212> DNA
 <213> Schizophyllum commune
 <400> 5
 agtcgaacac cccagttcaa ctaccccagc ccttcccttcc ttcgtatatcc ttccttataa 60
 cctgctcgcc atgttcgccc gtctccccgt cgtgttcctc tacgccttcg tcgcgttcgg 120
 cgccctcgtc gtgcccctcc caggtggcca cccgggcacg acgtacgtcg acctctcacc 180
 gtctctaat gtcttctga tgaagccccg tatagcacgc cgccggttac gacgacggtg 240
 acggtgacca cggtagtag ctttctcgcc gtcgacgact cgaacgcatt ggctaatttt 300
 tgctcatagc cgccctcgac gacgaccatc gccgccggtg gcacgtgtac tacggggtcg 360
 ctctcttgt gcaaccaggt tcaatcggta cgtacatcaa agcggcacga ccaggcatct 420
 cagctgacgg ccacatcgta caggcgagca gcagccctgt taccgccctc ctcggcctgc 480
 tcggcattgt ctcagcgac ctcaacgttc tcgttgcat cagctgtct cccctcactg 540
 tgagatcttt ttgttactg tcccaattac tgcgactga cagactttgc caggtcatcg 600
 gtgtcggagg cagcggctgt tcggcgaga cgtctgtcg cgaaaacacc caattcgtat 660
 gtatactttc catgcgtgtc ctttctcgc ctaatcatct gtagaacggg ctgatcaaca 720
 tcggttgac ccccatcaac atcctctgag caggtgaacg cgcctgtcgg tgggatattc 780
 gggcgacggg agcctcgggc aatctgagcc tcgttactgc ctagcaaatt cggaatccct 840
 tcgatgtcat aggttcgagg acaagtgatc gtcttctac ataactcaag gtgttgactc 900
 attccctcag ataatgaaca ttgttgtgt tgttgttgt tctct 945

<210> 6
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Schizophyllum commune
 <400> 6

Met Phe Ala Arg Leu Pro Val Val Phe Leu Tyr Ala Phe Val Ala Phe

1 5 10 15

Gly Ala Leu Val Ala Ala Leu Pro Gly Gly His Pro Gly Thr Thr Thr

20 25 30

Pro Pro Val Thr Thr Thr Val Thr Val Thr Thr Pro Pro Ser Thr Thr

35 40 45

Thr Ile Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ser Leu Ser Cys Cys
50 55 60

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

Leu Leu Gly Ile Val Leu Ser Asp Leu Asn Val Leu Val Gly Ile Ser

85 90 95
Cys Ser Pro Leu Thr Val Ile Gly Val Gly Gly Ser Gly Cys Ser Ala
100 105 110

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

Gly Cys Thr Pro Ile Asn Ile Leu
130 135

<210> 7

<211> 776

<212> DNA

<213> Neurospora crassa

<400> 7

atcatcagca tcaacatctt cacttcacaa catcttctca accttccaac tcaccttcca 60

aaccaccttc aaaaccaact cccagcttct ttcagcaaac cccaaccgc caaatgcag 120

ttcaccagcg tcttcacat cctcgccatt gccatgaccg ccgtgcggc cccggctgag 180

gttggtcccc gcgccaccac catcgcccc aacacctgct ccatcgacga ctacaagcct 240

tactgtgcc agtctatgtc cggccccgcc ggtccccctg gtctctcaa cctcatcccc 300

gtcgacctca gcgcctcgct cggctgcgtt gtcggtgtca tcggctccca atgtggtgcc 360

agcgtcaagt gctgcaagga cgatgttacc aacaccggca actccttctt catcatcaac 420

gtgccaact gcgtgccta agtgtttacg cggcaacagc gcaaagtcta ggcaatgcct 480

tgttctcaac gctgctgcca gtccagcacc ccccttctgc agcaaggagc ccccttctgc 540

tggactggca gcacaacgag ctgctactac aacacaagca tcatgcctgg acgcaacaga 600

agccgataat ctgggggttt ggttttgggg gatgaagggtg atgagttgat ggattggatc 660

gatatcttac aatgcgtgtc tcttctgtt aagatctgct ttactatctt cctattttct 720

tttacacata gctatgtatc actaaggcct ggtgattaat acactctctt aacctt 776

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Gln Phe Thr Ser Val Phe Thr Ile Leu Ala Ile Ala Met Thr Ala

1	5	10	15
Ala Ala Ala Pro Ala Glu Val Val Pro Arg Ala Thr Thr Ile Gly Pro			
20	25	30	
Asn Thr Cys Ser Ile Asp Asp Tyr Lys Pro Tyr Cys Cys Gln Ser Met			
35	40	45	
Ser Gly Pro Ala Gly Ser Pro Gly Leu Leu Asn Leu Ile Pro Val Asp			
50	55	60	
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Cys Val Val Gly Val Ile Gly Ser Gln Cys			
65	70	75	80

Gly Ala Ser Val Lys Cys Cys Lys Asp Asp Val Thr Asn Thr Gly Asn
85 90 95
Ser Phe Leu Ile Ile Asn Ala Ala Asn Cys Val Ala
100 105

<210> 9

<211> 453

<212> DNA

<213> Talaromyces thermophilus

<400> 9

atgaagttcg ccggtgtctt gcttgctgtc gccgctgcgg cgactgcct gccaaacgtc	60
ggtccagtg ggaagacggc tcacaagccg caccaggagc ctttctggcc tgtgcagcag	120
gacgtgaccg tggaacaggc caaggctatc tgtggtgaag gcaaccaggt cgcttgctgc	180
aacgaggtca gctacgcggg cgacaccacc gaaatcgca ccggccccct ggctggcacc	240
ctcaaggacc tgctcggcgg caagaacggc gccaaaggcc tgggtctctt cgacaagtgc	300
tcgcgtctca atgtgatct cctgcttggc ctgtcgagcc tcatcaacca agaatgcaag	360
cagcacattg cctgctgcca gggcaacgag gccgattcct ccaacgacct catcggtctc	420
aacattcctt gcattgccct tggtcgtctg ctg	453

<210> 10

<211> 151

<212> PRT

<213> Talaromyces thermophilus

<400> 10

Met Lys Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala

1	5	10	15
Leu Pro Asn Val Gly Pro Ser Gly Lys Thr Ala His Lys Pro His Gln			
20	25	30	
Glu Pro Phe Trp Pro Val Gln Gln Asp Val Thr Val Glu Gln Ala Lys			
35	40	45	
Ala Ile Cys Gly Glu Gly Asn Gln Val Ala Cys Cys Asn Glu Val Ser			
50	55	60	
Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Glu Ile Ala Thr Gly Pro Leu Ala Gly Thr			
65	70	75	80

Leu Lys Asp Leu Leu Gly Gly Lys Asn Gly Ala Lys Gly Leu Gly Leu			
85	90	95	
Phe Asp Lys Cys Ser Arg Leu Asn Val Asp Leu Leu Leu Gly Leu Ser			
100	105	110	
Ser Leu Ile Asn Gln Glu Cys Lys Gln His Ile Ala Cys Cys Gln Gly			
115	120	125	
Asn Glu Ala Asp Ser Ser Asn Asp Leu Ile Gly Leu Asn Ile Pro Cys			
130	135	140	
Ile Ala Leu Gly Ser Leu Leu			

145	150
-----	-----

<210> 11

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature amino acid sequence of Lipex

<400> 11

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr			
1	5	10	15
Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr			

20 25 30
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45

 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val

 115 120 125
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190

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

260

265

<210> 12

<211> 289

<212> PRT

<213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 12

Met Leu Pro Trp Lys Arg Ala Leu Arg Pro Leu Ser Ala Leu Met Leu

1 5 10 15

Ala Val Ala Val Ala Leu Thr Pro Ala Ala Thr Ala Thr Ala Asp Thr

20 25 30

Thr Thr Ala Ala Pro Ser Ser Gly Trp Asn Asp Tyr Asp Cys Lys Pro

35 40 45

Ser Ala Ala His Pro Arg Pro Val Val Leu Val His Gly Thr Leu Gly

50 55 60

Asn Ser Val Asp Asn Trp Leu Val Leu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Arg

65 70 75 80

Gly Tyr Cys Val Phe Ser Leu Asp Tyr Gly Gln Leu Pro Gly Val Pro

85 90 95

Phe Phe His Gly Leu Gly Pro Val Asp Lys Ser Ala Glu Gln Leu Asp

100 105 110

Ala Tyr Val Asp Lys Val Leu Ala Ala Thr Gly Ala Pro Glu Ala Asp

115 120 125

Ile Val Gly His Ser Gln Gly Gly Met Met Pro Arg Tyr Tyr Leu Lys

130 135 140

Phe Leu Gly Gly Ala Ala Lys Val Asn Ala Leu Val Gly Ile Ala Pro

145 150 155 160

Ser Asn His Gly Thr Asp Leu Asn Gly Phe Thr Ala Leu Leu Pro Tyr

165 170 175

Phe Pro Gly Ala Ala Asp Leu Leu Gly Arg His Thr Pro Ala Leu Ala

180 185 190

Asp Gln Val Thr Gly Ser Ala Phe Leu Thr Arg Leu Asn Ala Asp Gly

195 200 205

Asp Thr Val Ala Gly Val Arg Tyr Thr Val Ile Ala Thr Arg Tyr Asp

210 215 220
 Glu Val Val Thr Pro Trp Arg Ser Gln Tyr Leu Ser Gly Pro Asn Val
 225 230 235 240
 Arg Asn Val Leu Leu Gln Asp Leu Cys Pro Leu Asp Leu Ser Glu His
 245 250 255
 Val Ala Ile Gly Val Phe Asp Leu Ile Ala Tyr His Glu Val Ala Asn

260 265 270
 Ala Leu Asp Pro Ala His Ala Thr Pro Thr Thr Cys Ala Ser Val Phe
 275 280 285
 Gly

<210> 13
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> *Fusarium heterosporum*
 <400> 13

Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Asp Phe Thr Asn Phe Lys Phe Tyr Ile
 1 5 10 15
 Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Gly Thr Ala Ala Gly Ala
 20 25 30

Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Ile Glu Ser Asn Gly
 35 40 45
 Val Thr Val Val Ala Ser Phe Thr Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly
 50 55 60

Tyr Val Ser Thr Asp Ser Ser Arg Lys Glu Ile Val Val Ala Ile Arg
 65 70 75 80
 Gly Ser Ser Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Asp Gln
 85 90 95

Ser Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln

100 105 110
 Asn Ala Trp Ala Glu Ile Ser Ala Gln Ala Ser Ala Ala Val Ala Lys
 115 120 125

Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Lys Val Val Ala Thr Gly His Ser
130 135 140

Leu Gly Gly Ala Val Ala Thr Leu Ser Ala Ala Asn Leu Arg Ala Ala
145 150 155 160

Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn
165 170 175

Ala Ala Leu Ser Ala Phe Ile Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Phe Arg
180 185 190

Val Thr His Asp Lys Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe
195 200 205

Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Tyr Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Asp Lys Val Asp Tyr Ala Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala
225 230 235 240

Ala Asn Leu Met Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Asp Ala
245 250 255

His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe
260 265 270

Ser Trp Arg
275

<210> 14

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature amino acid sequence of Lipase 3

<400> 14

Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn
20 25 30

Leu Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr
35 40 45

Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile
 85 90 95

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

 165 170 175
 Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala
 180 185 190
 Asn Phe Arg Val Thr His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro
 195 200 205
 Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser
 210 215 220
 Gly Asn Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly
 225 230 235 240

 Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Val
 245 250 255
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
 260 265 270

 <210> 15
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Mature amino acid sequence of Lipomax

<400> 15

Val Tyr Ile Thr Glu Val Ser Gln Leu Asn Thr Ser Glu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Glu Glu Leu Leu Glu Gln Val Glu Glu Ile Ala Ala Ile Ser Gly Lys
20 25 30

Gly Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Val Arg
35 40 45

Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Val
50 55 60

Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Ile Arg Gln Ile
65 70 75 80

Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Ile Val Ala Gly Ile Val Asn Gly

85 90 95
Leu Gly Ala Leu Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Thr Ser Pro

100 105 110

Gln Asn Ala Leu Gly Ala Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala
115 120 125

Ala Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly
130 135 140

Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly
145 150 155 160

Thr Ser Pro Leu Thr Asn Val Leu Asp Val Ser Asp Leu Leu Leu Gly
165 170 175

Ala Ser Ser Leu Thr Phe Asp Glu Pro Asn Asp Gly Leu Val Gly Arg
180 185 190

Cys Ser Ser His Leu Gly Lys Val Ile Arg Asp Asp Tyr Arg Met Asn
195 200 205

His Leu Asp Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu
210 215 220

Thr Asp Pro Val Thr Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Leu

225				230				235				240			
Ala Gly Leu															
<210> 16															
<211> 261															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220><223> Mature amino acid sequence of TfuLip2															
<400> 16															
Ala Asn Pro Tyr Glu Arg Gly Pro Asn Pro Thr Asp Ala Leu Leu Glu															
1				5				10				15			
Ala Ser Ser Gly Pro Phe Ser Val Ser Glu Glu Asn Val Ser Arg Leu															
				20				25				30			
Ser Ala Ser Gly Phe Gly Gly Gly Thr Ile Tyr Tyr Pro Arg Glu Asn															
35				40				45							
Asn Thr Tyr Gly Ala Val Ala Ile Ser Pro Gly Tyr Thr Gly Thr Glu															
50				55				60							
Ala Ser Ile Ala Trp Leu Gly Glu Arg Ile Ala Ser His Gly Phe Val															
65				70				75				80			
Val Ile Thr Ile Asp Thr Ile Thr Thr Leu Asp Gln Pro Asp Ser Arg															
				85				90				95			
Ala Glu Gln Leu Asn Ala Ala Leu Asn His Met Ile Asn Arg Ala Ser															
100				105				110							
Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Asp Ser Ser Arg Leu Ala Val Met Gly															
115				120				125							
His Ser Met Gly Gly Gly Gly Thr Leu Arg Leu Ala Ser Gln Arg Pro															
130				135				140							
Asp Leu Lys Ala Ala Ile Pro Leu Thr Pro Trp His Leu Asn Lys Asn															
145				150				155				160			
Trp Ser Ser Val Thr Val Pro Thr Leu Ile Ile Gly Ala Asp Leu Asp															
				165				170				175			
Thr Ile Ala Pro Val Ala Thr His Ala Lys Pro Phe Tyr Asn Ser Leu															

180 185 190
Pro Ser Ser Ile Ser Lys Ala Tyr Leu Glu Leu Asp Gly Ala Thr His
195 200 205
Phe Ala Pro Asn Ile Pro Asn Lys Ile Ile Gly Lys Tyr Ser Val Ala
210 215 220
Trp Leu Lys Arg Phe Val Asp Asn Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Phe Leu
225 230 235 240
Cys Pro Gly Pro Arg Asp Gly Leu Phe Gly Glu Val Glu Glu Tyr Arg
245 250 255

Ser Thr Cys Pro Phe

260

<210> 17

<211> 259

<212> PRT

<213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 17

Asp Thr Thr Thr Ala Ala Pro Ser Ser Gly Trp Asn Asp Tyr Asp Cys

1 5 10 15

Lys Pro Ser Ala Ala His Pro Arg Pro Val Val Leu Val His Gly Thr

20 25 30

Leu Gly Asn Ser Val Asp Asn Trp Leu Val Leu Ala Pro Tyr Leu Val

35 40 45

Lys Arg Gly Tyr Cys Val Phe Ser Leu Asp Tyr Gly Gln Leu Pro Gly

50 55 60

Val Pro Phe Phe His Gly Leu Gly Pro Val Asp Lys Ser Ala Glu Gln

65 70 75 80

Leu Asp Ala Tyr Val Asp Lys Val Leu Ala Ala Thr Gly Ala Pro Glu

85 90 95

Ala Asp Ile Val Gly His Ser Gln Gly Gly Met Met Pro Arg Tyr Tyr

100 105 110

Leu Lys Phe Leu Gly Gly Ala Ala Lys Val Asn Ala Leu Val Gly Ile

115 120 125

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

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

<210> 18
<211> 291
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Full amino acid sequence of Lipex
<400> 18

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
1 5 10 15
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
20 25 30
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
35 40 45
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
50 55 60

Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Asp	Ser
65			70			75			80						
Gly	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys
85			90			95									
Leu	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Ile	Glu	Asn	Trp	Ile
100			105			110									
Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Asp	Ile	Cys	Ser	Gly
115			120			125									
Cys	Arg	Gly	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Ser	Ser	Trp	Arg	Ser	Val	Ala	Asp
130			135			140									
Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	His	Pro	Asp	Tyr
145			150			155			160						
Arg	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val
165			170			175									
Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Phe	Ser
180			185			190									
Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr
195			200			205									
Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile
210			215			220									
Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro
225			230			235			240						
Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Asp
245			250			255									
Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro
260			265			270									
Asn	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly
275			280			285									
Thr	Cys	Leu													
290															
<210>	19														
<211>	313														

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full amino acid sequence of Lipomax

<400> 19

Met Asn Asn Lys Lys Thr Leu Leu Ala Leu Cys Ile Gly Ser Ser Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ser Gly Pro Ala Glu Ala Gly Leu Phe Gly Ser Thr Gly Tyr

20 25 30

Thr Lys Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Thr His Gly Leu Leu Gly Phe

35 40 45

Asp Ser Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Tyr Gly Ile Pro Ser Ser Leu

50 55 60

Arg Ser Asp Gly Ala Ser Val Tyr Ile Thr Glu Val Ser Gln Leu Asn

65 70 75 80

Thr Ser Glu Leu Arg Gly Glu Glu Leu Leu Glu Gln Val Glu Glu Ile

85 90 95

Ala Ala Ile Ser Gly Lys Gly Lys Val Asn Leu Val Gly His Ser His

100 105 110

Gly Gly Pro Thr Val Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Val

115 120 125

Ala Ser Val Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala

130 135 140

Asp Phe Ile Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Ile Val

145 150 155 160

Ala Gly Ile Val Asn Gly Leu Gly Ala Leu Ile Asn Phe Leu Ser Gly

165 170 175

Ser Ser Ser Thr Ser Pro Gln Asn Ala Leu Gly Ala Leu Glu Ser Leu

180 185 190

Asn Ser Glu Gly Ala Ala Ala Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile

195 200 205

Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser

210 215 220

Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Thr Ser Pro Leu Thr Asn Val Leu Asp Val
 225 230 235 240
 Ser Asp Leu Leu Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Asp Glu Pro Asn

245 250 255
 Asp Gly Leu Val Gly Arg Cys Ser Ser His Leu Gly Lys Val Ile Arg
 260 265 270

Asp Asp Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly
 275 280 285
 Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Asp Pro Val Thr Val Tyr Arg Gln Gln

290 295 300
 Ala Asn Arg Leu Lys Leu Ala Gly Leu
 305 310

<210> 20

<

211> 301

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full amino acid sequence of TfuLip2

<400> 20

Met Ala Val Met Thr Pro Arg Arg Glu Arg Ser Ser Leu Leu Ser Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Val Thr Ala Ala Ala Ala Thr Ala Leu Val Thr Ala Val
 20 25 30

Ser Leu Ala Ala Pro Ala His Ala Ala Asn Pro Tyr Glu Arg Gly Pro
 35 40 45

Asn Pro Thr Asp Ala Leu Leu Glu Ala Ser Ser Gly Pro Phe Ser Val

50 55 60
 Ser Glu Glu Asn Val Ser Arg Leu Ser Ala Ser Gly Phe Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Thr Ile Tyr Tyr Pro Arg Glu Asn Asn Thr Tyr Gly Ala Val Ala Ile
 85 90 95

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

Arg Ile Ala Ser His Gly Phe Val Val Ile Thr Ile Asp Thr Ile Thr
115 120 125

Thr Leu Asp Gln Pro Asp Ser Arg Ala Glu Gln Leu Asn Ala Ala Leu
130 135 140

Asn His Met Ile Asn Arg Ala Ser Ser Thr Val Arg Ser Arg Ile Asp
145 150 155 160

Ser Ser Arg Leu Ala Val Met Gly His Ser Met Gly Gly Gly Gly Thr
165 170 175

Leu Arg Leu Ala Ser Gln Arg Pro Asp Leu Lys Ala Ala Ile Pro Leu
180 185 190

Thr Pro Trp His Leu Asn Lys Asn Trp Ser Ser Val Thr Val Pro Thr

195 200 205

Leu Ile Ile Gly Ala Asp Leu Asp Thr Ile Ala Pro Val Ala Thr His
210 215 220

Ala Lys Pro Phe Tyr Asn Ser Leu Pro Ser Ser Ile Ser Lys Ala Tyr
225 230 235 240

Leu Glu Leu Asp Gly Ala Thr His Phe Ala Pro Asn Ile Pro Asn Lys
245 250 255

Ile Ile Gly Lys Tyr Ser Val Ala Trp Leu Lys Arg Phe Val Asp Asn
260 265 270

Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Phe Leu Cys Pro Gly Pro Arg Asp Gly Leu
275 280 285

Phe Gly Glu Val Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Cys Pro Phe
290 295 300

<210> 21

<211> 279

<212> PRT

<213> Fusarium heterosporum

<400> 21

Glu Ala Glu Ala Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Asp Phe Thr Asn Phe
1 5 10 15

Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Gly Thr

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

Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg

275

<210> 22

<211> 777

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic SprLip2 gene

<400> 22

gacaccacga ccgcggcacc ctctcgggc tggaacgact acgactgcaa gccgtccgcc 60

gcgcaccccc gccccgtggt cctcgtccac ggcacgctcg gcaacagcgt ggacaactgg 120

ctggtcctgg ccccgtaact cgtcaagcgc ggctactgcg tgttctccct ggactacggc 180

cagctgccgg gcgtgccctt cttccacggc ctgggcccg tggacaagag ccccagcag 240

ctggacgct acgtggacaa ggtgctcgcc gccaccggcg ccccgaggc ggacatcgtc 300

gggcactcgc aggggggcat gatgccccgg tactacctga agttcctcgg cggggcggcc 360

aaggtcaacg ccttggtggg catcgtcccc tcgaaccacg ggacggacct caacggcttc 420

accgcccccc tgcgtactt cccgggcgcc gccgacctcc tcggccggca cccccggcg 480

ctggccgacc aggtcacggg gagcgcgttc ctgacctgcc tgaacgcgga cggcgacacg 540

gtcgcggggg tccgtacac cgtcatcgcc acgcgtacg acgaggtcgt cccccctgg 600

cggccccagt acctgagcgg cccgaacgtc cggaacgtgc tgctccagga cctgtgcccc 660

ctcgacttga gcgaacacgt ggccatcgcc gtgttcgacc tcctgcata ccacgaggtc 720

gccaacgccc tggaccggcg gcacgccacc cccagacct gcgcgtccgt cttcggc 777

<210> 23

<211> 915

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SprLip2 gene from expression plasmid pZQ205

<400> 23

atgggctttg ggagcgtcc catcgcgttg tgcgcttc gcacgaggag gaacgctttg 60

aaacgccttt tggccctgct cgcgaccggc gtgtcgatcg tcggcctgac tgcgctagcc 120

ggccccccgg cacaggccga caccacgacc gcggcaccct cctcgggctg gaacgactac 180

gactgcaagc cgtccgcgc gcacccccgc cccgtggtcc tcgtccacgg cacgctcggc 240

aacagcgtgg acaactggct ggtcctggcc ccgtacctcg tcaagcgcgg ctactgcgtg 300

ttctccctgg actacggcca gctgccgggc gtgcccttct tccacggcct gggcccgggtg 360
gacaagagcg ccgagcagct ggacgcctac gtggacaagg tgctcgccgc caccggcgcc 420
ccggaggcgg acatcgtcgg gcactcgag gggggcatga tgccccgta ctacctgaag 480

ttcctcggcg gggcggccaa ggtcaacgcc ctggtgggca tcgccccctc gaaccacggg 540
acggacctca acggttcac cgccctctg ccgtacttcc cgggcgccgc cgacctctc 600
ggccggcaca ccccgcgct ggccgaccag gtcaccggga gcgcgttct gaccgcctg 660
aacgcggacg gcgacacggt cgcgggggtc cgctacaccg tcatcgccac gcgtacgac 720
gaggtcgtca cccctggcg gtcccagtag ctgagcggcc cgaacgtccg gaacgtgctg 780
ctccaggacc tgtgccccct cgacttgagc gaacacgtgg ccatcggcgt gttcgacctc 840
atcgcatacc acgaggtcgc caacgccctg gaccggcgcc acgccacccc caccacctgc 900

gcgtccgtct tcggc 915

<210> 24

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SprLip2 produced from plasmid pZQ205

<400> 24

Met Gly Phe Gly Ser Ala Pro Ile Ala Leu Cys Pro Leu Arg Thr Arg

1 5 10 15

Arg Asn Ala Leu Lys Arg Leu Leu Ala Leu Ala Thr Gly Val Ser

20 25 30

Ile Val Gly Leu Thr Ala Leu Ala Gly Pro Pro Ala Gln Ala Asp Thr

35 40 45

Thr Thr Ala Ala Pro Ser Ser Gly Trp Asn Asp Tyr Asp Cys Lys Pro

50 55 60

Ser Ala Ala His Pro Arg Pro Val Val Leu Val His Gly Thr Leu Gly

65 70 75 80

Asn Ser Val Asp Asn Trp Leu Val Leu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Arg

85 90 95

Gly Tyr Cys Val Phe Ser Leu Asp Tyr Gly Gln Leu Pro Gly Val Pro

100 105 110

Phe Phe His Gly Leu Gly Pro Val Asp Lys Ser Ala Glu Gln Leu Asp
 115 120 125
 Ala Tyr Val Asp Lys Val Leu Ala Ala Thr Gly Ala Pro Glu Ala Asp
 130 135 140
 Ile Val Gly His Ser Gln Gly Gly Met Met Pro Arg Tyr Tyr Leu Lys
 145 150 155 160
 Phe Leu Gly Gly Ala Ala Lys Val Asn Ala Leu Val Gly Ile Ala Pro
 165 170 175
 Ser Asn His Gly Thr Asp Leu Asn Gly Phe Thr Ala Leu Leu Pro Tyr
 180 185 190
 Phe Pro Gly Ala Ala Asp Leu Leu Gly Arg His Thr Pro Ala Leu Ala
 195 200 205
 Asp Gln Val Thr Gly Ser Ala Phe Leu Thr Arg Leu Asn Ala Asp Gly
 210 215 220
 Asp Thr Val Ala Gly Val Arg Tyr Thr Val Ile Ala Thr Arg Tyr Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Val Thr Pro Trp Arg Ser Gln Tyr Leu Ser Gly Pro Asn Val
 245 250 255
 Arg Asn Val Leu Leu Gln Asp Leu Cys Pro Leu Asp Leu Ser Glu His
 260 265 270
 Val Ala Ile Gly Val Phe Asp Leu Ile Ala Tyr His Glu Val Ala Asn
 275 280 285
 Ala Leu Asp Pro Ala His Ala Thr Pro Thr Thr Cys Ala Ser Val Phe
 290 295 300
 Gly
 305
 <210> 25
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> Geobacillus stearothermophilus
 <400> 25
 Met Lys Cys Cys Arg Ile Met Phe Val Leu Leu Gly Leu Trp Phe Val

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

260 265 270
Ser Val Ser Gly Ala Glu Lys Leu Asn Gln Trp Val Gln Ala Ser Pro

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

290 295 300
Leu Thr Gly Asn His Tyr Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Phe Ser Ala

305 310 315 320
Val Val Cys Ala Pro Phe Leu Gly Ser Tyr Arg Asn Pro Thr Leu Gly

325 330 335
Ile Asp Asp Arg Trp Leu Glu Asn Asp Gly Ile Val Asn Thr Val Ser

340 345 350
Met Asn Gly Pro Lys Arg Gly Ser Ser Asp Arg Ile Val Pro Tyr Asp

355 360 365

Gly Thr Leu Lys Lys Gly Val Trp Asn Asp Met Gly Thr Tyr Asn Val
370 375 380

Asp His Leu Glu Ile Ile Gly Val Asp Pro Asn Pro Ser Phe Asp Ile
385 390 395 400

Arg Ala Phe Tyr Leu Arg Leu Ala Glu Gln Leu Ala Ser Leu Gln Pro
405 410 415

<210> 26

<211> 705

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCE-GeoT1 fusion protein

<400> 26

Asp Asp Tyr Ser Val Val Glu Glu His Gly Gln Leu Ser Ile Ser Asn

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

20 25 30
Ser Ser His Gly Leu Gln Trp Tyr Gly Gln Phe Val Asn Tyr Glu Ser

35 40 45
Met Lys Trp Leu Arg Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala

50 55 60
 Met Tyr Thr Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Asp Pro Ser Val Lys Glu
 65 70 75 80

 Lys Val Lys Glu Thr Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Gly Ile Tyr Val
 85 90 95
 Ile Ile Asp Trp His Ile Leu Ser Asp Asn Asp Pro Asn Ile Tyr Lys
 100 105 110
 Glu Glu Ala Lys Asp Phe Phe Asp Glu Met Ser Glu Leu Tyr Gly Asp
 115 120 125
 Tyr Pro Asn Val Ile Tyr Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Ser Asp
 130 135 140
 Val Thr Trp Asp Asn Gln Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Pro

 145 150 155 160
 Val Ile Arg Asp Asn Asp Pro Asn Asn Ile Val Ile Val Gly Thr Gly
 165 170 175
 Thr Trp Ser Gln Asp Val His His Ala Ala Asp Asn Gln Leu Ala Asp
 180 185 190
 Pro Asn Val Met Tyr Ala Phe His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln
 195 200 205
 Asn Leu Arg Asp Gln Val Asp Tyr Ala Leu Asp Gln Gly Ala Ala Ile
 210 215 220

 Phe Val Ser Glu Trp Gly Thr Ser Ala Ala Thr Gly Asp Gly Gly Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Asp Glu Ala Gln Val Trp Ile Asp Phe Met Asp Glu Arg Asn
 245 250 255
 Leu Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr His Lys Asp Glu Ser Ser Ala
 260 265 270
 Ala Leu Met Pro Gly Ala Asn Pro Thr Gly Gly Trp Thr Glu Ala Glu
 275 280 285
 Leu Ser Pro Ser Gly Thr Phe Val Arg Glu Lys Ile Arg Glu Ser Ala

 290 295 300

Ser Asp Asn Asn Asp Pro Ile Pro Asp Pro Asp Asp Glu Ala Ser Leu
305 310 315 320
Arg Ala Asn Asp Ala Pro Ile Val Leu Leu His Gly Phe Thr Gly Trp
325 330 335
Gly Arg Glu Glu Met Phe Gly Phe Lys Tyr Trp Gly Gly Val Arg Gly
340 345 350
Asp Ile Glu Gln Trp Leu Asn Asp Asn Gly Tyr Arg Thr Phe Thr Leu
355 360 365

Ala Val Gly Pro Leu Ser Ser Asn Trp Asp Arg Ala Cys Glu Ala Tyr
370 375 380
Ala Gln Leu Val Gly Gly Thr Val Asp Tyr Gly Ala Ala His Ala Ala
385 390 395 400
Lys His Gly His Ala Arg Phe Gly Arg Thr Tyr Pro Gly Leu Leu Pro
405 410 415
Glu Leu Lys Arg Gly Gly Arg Ile His Ile Ile Ala His Ser Gln Gly
420 425 430
Gly Gln Thr Ala Arg Met Leu Val Ser Leu Leu Glu Asn Gly Ser Gln
435 440 445
Glu Glu Arg Glu Tyr Ala Lys Ala His Asn Val Ser Leu Ser Pro Leu
450 455 460
Phe Glu Gly Gly His His Phe Val Leu Ser Val Thr Thr Ile Ala Thr
465 470 475 480
Pro His Asp Gly Thr Thr Leu Val Asn Met Val Asp Phe Thr Asp Arg
485 490 495
Phe Phe Asp Leu Gln Lys Ala Val Leu Glu Ala Ala Ala Val Ala Ser
500 505 510

Asn Val Pro Tyr Thr Ser Gln Val Tyr Asp Phe Lys Leu Asp Gln Trp
515 520 525
Gly Leu Arg Arg Gln Pro Gly Glu Ser Phe Asp His Tyr Phe Glu Arg
530 535 540
Leu Lys Arg Ser Pro Val Trp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Arg Tyr Asp
545 550 555 560

Leu Ser Val Ser Gly Ala Glu Lys Leu Asn Gln Trp Val Gln Ala Ser
 565 570 575
 Pro Asn Thr Tyr Tyr Leu Ser Phe Ser Thr Glu Arg Thr Tyr Arg Gly
 580 585 590
 Ala Leu Thr Gly Asn His Tyr Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Phe Ser
 595 600 605
 Ala Val Val Cys Ala Pro Phe Leu Gly Ser Tyr Arg Asn Pro Thr Leu
 610 615 620
 Gly Ile Asp Asp Arg Trp Leu Glu Asn Asp Gly Ile Val Asn Thr Val
 625 630 635 640
 Ser Met Asn Gly Pro Lys Arg Gly Ser Ser Asp Arg Ile Val Pro Tyr
 645 650 655
 Asp Gly Thr Leu Lys Lys Gly Val Trp Asn Asp Met Gly Thr Tyr Asn
 660 665 670
 Val Asp His Leu Glu Ile Ile Gly Val Asp Pro Asn Pro Ser Phe Asp
 675 680 685
 Ile Arg Ala Phe Tyr Leu Arg Leu Ala Glu Gln Leu Ala Ser Leu Gln
 690 695 700
 Pro
 705
 <210> 27
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 27
 Met Lys Phe Val Lys Arg Arg Ile Ile Ala Leu Val Thr Ile Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Ser Val Thr Ser Leu Phe Ala Leu Gln Pro Ser Ala Lys Ala Ala
 20 25 30
 Glu His Asn Pro Val Val Met Val His Gly Ile Gly Gly Ala Ser Phe
 35 40 45
 Asn Phe Ala Gly Ile Lys Ser Tyr Leu Val Ser Gln Gly Trp Ser Arg

50 55 60
 Asp Lys Leu Tyr Ala Val Asp Phe Trp Asp Lys Thr Gly Thr Asn Tyr
 65 70 75 80

 Asn Asn Gly Pro Val Leu Ser Arg Phe Val Gln Lys Val Leu Asp Glu
 85 90 95
 Thr Gly Ala Lys Lys Val Asp Ile Val Ala His Ser Met Gly Gly Ala
 100 105 110
 Asn Thr Leu Tyr Tyr Ile Lys Asn Leu Asp Gly Gly Asn Lys Val Ala
 115 120 125
 Asn Val Val Thr Leu Gly Gly Ala Asn Arg Leu Thr Thr Gly Lys Ala
 130 135 140
 Leu Pro Gly Thr Asp Pro Asn Gln Lys Ile Leu Tyr Thr Ser Ile Tyr

 145 150 155 160
 Ser Ser Ala Asp Met Ile Val Met Asn Tyr Leu Ser Arg Leu Asp Gly
 165 170 175
 Ala Arg Asn Val Gln Ile His Gly Val Gly His Ile Gly Leu Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Ser Gln Val Asn Ser Leu Ile Lys Glu Gly Leu Asn Gly Gly Gly
 195 200 205
 Gln Asn Thr Asn
 210
 <210> 28
 <211> 498
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BCE-LipA fusion protein
 <400> 28
 Asp Asp Tyr Ser Val Val Glu Glu His Gly Gln Leu Ser Ile Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Glu Leu Val Asn Glu Arg Gly Glu Gln Val Gln Leu Lys Gly Met
 20 25 30
 Ser Ser His Gly Leu Gln Trp Tyr Gly Gln Phe Val Asn Tyr Glu Ser

35 40 45
 Met Lys Trp Leu Arg Asp Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala

 50 55 60
 Met Tyr Thr Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Asp Pro Ser Val Lys Glu
 65 70 75 80
 Lys Val Lys Glu Thr Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Gly Ile Tyr Val
 85 90 95
 Ile Ile Asp Trp His Ile Leu Ser Asp Asn Asp Pro Asn Ile Tyr Lys
 100 105 110
 Glu Glu Ala Lys Asp Phe Phe Asp Glu Met Ser Glu Leu Tyr Gly Asp
 115 120 125

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

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

 Ala Leu Met Pro Gly Ala Asn Pro Thr Gly Gly Trp Thr Glu Ala Glu
 275 280 285

Leu Ser Pro Ser Gly Thr Phe Val Arg Glu Lys Ile Arg Glu Ser Ala
 290 295 300
 Ser Asp Asn Asn Asp Pro Ile Pro Asp Pro Asp Asp Glu Ala Glu His
 305 310 315 320
 Asn Pro Val Val Met Val His Gly Ile Gly Gly Ala Ser Phe Asn Phe
 325 330 335
 Ala Gly Ile Lys Ser Tyr Leu Val Ser Gln Gly Trp Ser Arg Asp Lys
 340 345 350
 Leu Tyr Ala Val Asp Phe Trp Asp Lys Thr Gly Thr Asn Tyr Asn Asn
 355 360 365
 Gly Pro Val Leu Ser Arg Phe Val Gln Lys Val Leu Asp Glu Thr Gly
 370 375 380
 Ala Lys Lys Val Asp Ile Val Ala His Ser Met Gly Gly Ala Asn Thr
 385 390 395 400
 Leu Tyr Tyr Ile Lys Asn Leu Asp Gly Gly Asn Lys Val Ala Asn Val
 405 410 415
 Val Thr Leu Gly Gly Ala Asn Arg Leu Thr Thr Gly Lys Ala Leu Pro
 420 425 430
 Gly Thr Asp Pro Asn Gln Lys Ile Leu Tyr Thr Ser Ile Tyr Ser Ser
 435 440 445
 Ala Asp Met Ile Val Met Asn Tyr Leu Ser Arg Leu Asp Gly Ala Arg
 450 455 460
 Asn Val Gln Ile His Gly Val Gly His Ile Gly Leu Leu Tyr Ser Ser
 465 470 475 480
 Gln Val Asn Ser Leu Ile Lys Glu Gly Leu Asn Gly Gly Gly Gln Asn
 485 490 495
 Thr Asn

<210> 29

<211> 297

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full amino acid sequence of Lipase 3

<400> 29

Met Phe Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Leu Thr Ala Leu Ala Ala Leu

1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Leu Ala Val Arg Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp Ser Ala Ala Ala Tyr

35 40 45

Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn Leu Thr Cys Thr Ala

50 55 60

Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr Thr Met Leu Leu Glu

65 70 75 80

Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala Gly Phe Leu Ala Ala

85 90 95

Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe Arg Gly Ser Ser Thr

100 105 110

Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile Leu Glu Asp Asn Asp

115 120 125

Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly Phe Trp Lys Ala Trp

130 135 140

Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile Lys Ser Ala Met Ser

145 150 155 160

Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly

165 170 175

Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg Asn Asp Gly Tyr Ser

180 185 190

Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile Gly Asn Tyr Ala Leu

195 200 205

Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala Asn Phe Arg Val Thr

210 215 220

His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro Met Asp Phe Gly Phe

225 230 235 240

Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Gly Asn Gly Ala Ser
 245 250 255

Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly Ile Asn Ser Thr Ala
 260 265 270

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

Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
 290 295

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NsiI-MluI-HpaI enzyme restriction sites

<400> 30

atgcatacgc gtgttaac

18