(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/57

(45) 공고일자 2002년03월09일
(11) 등록번호 10-0327865
(24) 등록일자 2002년02월26일

(21) 출원번호	10-2001-7002501	(65) 공개번호	특0000-0000000
(22) 출원일자	2001년02월27일	(43) 공개일자	0000년00월00일
(62) 원출원	특허특1996-0700040		
	원출원일자 : 1996년01월06일	심사청구일자	1999년01월20일
번역문 제출일자	2001년02월27일		
(86) 국제출원번호	PCT/DK1994/00274	(87) 국제공개번호	WO 1995/02044
(86) 국제출원출원일자	1994년07월05일	(87) 국제공개일자	1995년01월19일

(81) 지정국 국내특허 : 기네, 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 체코, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 몽고, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 슬로바키아, 우크라이나, 미국, 베트남, 중국, 리투아니아, 라트비아, 슬로베니아, 트리니다드토바고, 우즈베키스탄,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단, 케냐,
EA 유라시아특허: 벨라루스, 카자흐스탄, 러시아, 아르메니아,
EP 유럽특허: 핀랜드,
OA OAPI특허: 코트디브와르,

(30) 우선권주장 0811/93 1993년07월06일 덴마크(DK)

(73) 특허권자
노보자임스 에이/에스
피아 스타르
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 크록쇼이베이 36

(72) 발명자
달뵈게헨리크
덴마크디케이-2830비룸파르크베이28
크리스트가우슈테판
덴마크디케이-2820겐토프테래베스코브스베이10에이
안데르센렌논보에
덴마크디케이-3460비르케뢰드린데회이베이9
코포드렌벤케
덴마크디케이-4350우게를뢰세브로르펠데베이8
카우피넨마르쿠스사카리
덴마크디케이-2200코펜하겐엔5.에게가데10
닐센야크베흐
덴마크디케이-2900헬레룹올레올센스알레12
담브만클라우스
덴마크디케이-2860쇠보르그7.티에이치.회예글라드삭세61

(74) 대리인 박종혁

심사관 : 이처영

(54) 프로테아제 활성이 있는 효소

요약

프로테아제 활성을 나타내는 효소를 암호화하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조체로서,상기 DNA 서열이 SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 DNA 서열 또는 SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 DNA 서열과 적어도 80% 상동인, 상기 서열들중 어느 것의 유사체로 이루어지는 DNA 구조체. 이 DNA 서열에 의해 암호화되는 프로테아제는 산성 최적 pH를 가진다.

대표도

도 1

색인어

프로테아제, 과산화수소, 산성

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 프로테아제 I 및 II의 pH 활성 프로필을 각각 예시하고,

도 2는 프로테아제 I 및 II의 온도-활성 프로필을 각각 예시하고,

도 3 및 도 4는 프로테아제 I 및 II의 pH 안정성을 각각 예시하고,

도 5 및 도 6은 프로테아제 I 및 II의 온도 안정성을 각각 예시하고,

도 7는 각종 프로테아제의 콘택트렌즈 세척 성능을 예시하고,

도 8은 본 발명 효소의 글루텐 스트레칭 효과를 예시한다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

발명의 분야

본 발명은 프로테아제 활성이 있는 효소를 암호화하는 DNA 구조체, 그러한 효소의 제조방법, 프로테아제 활성이 있는 효소, 및 이 효소를 함유하는 효소제제에 관한 것이다.

발명의 배경

프로테아제는 펩티드 결합을 절단할 수 있는 효소이다. 산성 프로테아제(즉 산성 최적 pH를 갖는 프로테아제)는 포유동물 및 미생물을 포함하여 여러가지 많은 유기체에 의해 생산됨이 발견되었다. 예컨대 미생물 산성 프로테아제는 바실러스 (Bacillus) sp.(JP 01240184)의 균주와 같은 세균균주, 예컨대 리조퍼스 (Rhizopus) sp.(EP 72978), 스키탈리디움 (Schytalidium) sp.(JP 48091273), 설포로버스 (Sulpholobus) sp. 및 써모플라즈마 (Thermoplasma) sp.(WO/90 10072) 그리고 아스퍼질러스 (Aspergillus) sp.(JP 50121486, EP 82 395)의 균류균주에 의해 생산됨이 발견되었다.

JP 3058794는 리조퍼스 니베우스 (R. niveus)로부터의 산성 프로테아제를 암호화하는 유전자의 클로닝 및 그것의 재조합 발현을 개시하고 있다. 아스파르트산 프로테아제를 암호화하는 크리포넥티라 파라지티카 (Cryphonectira parasitica)로부터의 유전자 클로닝 및 발현은 최(Choi) 등(1993)에 의해 기술되어 있다. 다카하시(Takahashi) 등(1991), 이노우에(Inoue) 등(1991) 및 JP 407 5586에는 산성 프로테이나제(프로테아제 A)를 암호화하는 아스퍼질러스 니거(Aspergillus niger)로부터의 유전자 클로닝이 개시되어 있다.

베르카(Berka) 등(1990)은 아스퍼질러스 아와모리 (Aspergillus awamori)로부터의 아스파르트산 프로테이나제 아스페르길로펩신을 암호화하는 유전자를 개시하고 있다. 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae)로부터의 아스파르트산 프로테이나제 아스페르길로펩신 O를 암호화하는 유전자의 클로닝은 베르카 등(1993)에 의해 기술되어 있다. 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae)로부터의 산성 프로테아제(PEPA)를 암호화하는 유전자 클로닝은 고미(Gomi) 등(1993)에 의해 개시되어 있다.

산성 프로테아제는 예컨대 식품 및 사료의 제조, 가죽 산업(예컨대 탈모 가죽), 단백질 가수분해물의 생산 그리고 포도주 제조 및 양조 산업에서 산업적으로 널리 사용되고 있다.

특히 식품 및 사료 산업에서는 여러가지 많은 용도의 단일성분 산성 프로테아제가 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

발명의 개요

본 발명의 목적은 단일성분 프로테아제를 제조하는 것이다.

따라서, 제1양태에서 본 발명은 프로테아제 활성을 나타내는 효소를 암호화하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조체로서, 상기 DNA 서열이 SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열 또는 SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열과 적어도 80% 상동인 그것의 유사서열로 이루어지는 DNA 구조체에 관한 것이다.

제2양태에서 본 발명은 프로테아제 활성을 나타내는 효소를 암호화하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조체로서, 상기 DNA 서열이 SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열 또는 SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열과 적어도 80% 상동인 그것의 유사서열로 이루어지는 DNA 구조체에 관한 것이다.

SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열은 이하의 개시내용에서 프로테아제 I 이라고 칭하는 효소를 암호화한다. SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열에 의해 암호화된 효소는 프로테아제 II라고 칭한다.

데이타베이스 상동성 조사로, SEQ ID No. 1 및 2에 나타낸 DNA 서열은 일반적으로 신규함을 알았다. 공지된 프로테아제 유전자에 대한 SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열의 최고 상동성은 538 뉴클레오티드의 중복(overlap)에 대해

측정할 때 아스퍼질러스 니거 (Aspergillus niger) 산성 프로테이나제 A에 대해 74.7%임을 알았다. 프로테아제 II의 최고 상동성은 343 뉴클레오티드의 중복에 대해 측정할 때 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae) 아스페르길로펩신 O에 대해 75.5%임을 알았다.

추가의 양태에서 본 발명은 본 발명의 DNA 구조체를 포함하는 발현 벡터, 본 DNA 구조체 또는 발현 벡터를 포함하는 세포, 및 프로테아제 활성을 나타내는 효소의 제조방법으로서 상기 세포를 효소 제조를 허용하는 조건하에 배양하고 배양물로부터 효소를 회수하는 것으로 이루어지는 방법에 관한 것이다.

더욱 추가의 양태에서 본 발명은 프로테아제 활성을 나타내는 효소로서, 위에서 정의한 바와 같은 본 발명의 DNA 구조체에 의해 암호화되거나 또는 본 발명의 방법에 의해 제조되는 효소에 관한 것이다.

추가의 중요한 양태에서 본 발명은 프로테아제 활성이 있는 효소로서, 7.0 미만의 pH에서 및 3% 이하의 과산화수소 존재하에서 활성인 효소에 관한 것이다. 본 명세서에서 효소에 대해 사용되는 '활성이다'라는 말은 효소가 예컨대 본 명세서중의 실시예 5에 기재된 바와 같이 상기한 조건하에서 기질을 가수분해시킬 수 있다는 것을 가리키는 것이다.

7.0 미만의 pH에서 및 3% 이하의 과산화수소 존재하에서 활성이고 실시예 5에 특정된 조건하에서 렌즈로부터 리소짐의 80% 이상을 제거하는 이러한 본 발명 효소를 이하의 개시내용에서는 'H_2O_2 안정성 프로테아제' 라고 부른다. 이 효소는 일반적으로 신규한 것으로 생각된다.

또한 본 발명은 프로테아제 활성이 있는 효소로서, 7.0 미만의 pH에서 활성이고 Phe-Val 또는 Lys-Tyr 연결에 대해 특이적인 효소를 제공한다. 용어 '특이적' 은 기질이 소 글루카곤일 때 효소가 주로 이들 연결을 절단하는 것을 가리킨다.

여기에 기재된 프로테아제 I 및 프로테아제 II는 본 발명 효소의 바람직한 예이다. 이 효소는 산성 프로테아제, 즉 산성 최적 pH를 갖는 프로테아제임을 알았다.

본 발명에 의하면 고도로 정제된 형태의, 즉 명세서중의 재료 및 방법란에 기재된 바와 같은 SDS 겔 전기영동으로 측정할 때 순도가 75%보다 더 높고, 보다 바람직하게는 순도가 90%보다 더 높은 프로테아제를 제공하는 것이 가능하다.

마지막 양태에서 본 발명은 본 발명의 효소를 포함하는 효소제제, 및 단백질 함유 물질의 변형 또는 분해가 바람직한 각종 용도에의 본 효소 또는 효소제제의 사용에 관한 것이다.

발명의 구성 및 작용

발명의 상세한 설명

본 발명의 DNA 구조체, 벡터 및 방법

본 명세서에서 본 발명의 DNA 구조체를 정의하는데 사용되는 용어 '유사체' 는 프로테아제활성이 있는 효소를 암호화하고 각각 SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 DNA 서열과 적어도 80% 상동인 모든 DNA 서열을 포함함은 물론이다. 유사 DNA 서열은 다음 조건하에서 프로테아제 효소를 코딩하는 DNA와 동일한 프로브에 하이브리드화되는 DNA 서열일 수 있다: 5×SSC에 사전침지하고 5×SSC, 5×덴하르트 용액, 50mM 인산나트륨(pH 6.8) 및 50㎍의 변성된 초음파처리 송아지 흉선 DNA의 용액중에서 55℃에서 1시간 동안 사전하이브리드화하고, 이어서 50㎕Ci 32-P-dCTP 표지 프로브로 보충된 동일 용액중에서 55℃에서 18시간 동안 하이브리드화한 다음 2×SSC, 0.2% SDS로 55℃에서 30분 동안 3회 세척. 유사 DNA 서열은 바람직하게는 SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 서열과 적어도 90% 상동이고, 바람직하게는 상기 서열과 적어도 95% 상동이다.

유사 DNA 서열은 예컨대 또다른 유기체로부터 분리될 수도 있고, 프로테아제의 다른 아미노산 서열을 생성하지 않는 DNA 구조체가 도입되는 숙주 유기체의 코돈 용례에 대응하는 뉴클레오티드 치환의 도입 또는 상이한 아미노산 서열을 생성함으로써 천연 효소와 다른 성질을 갖는 프로테아제 돌연변이체를 생성할 수도 있는 상이한 단백질 구조를 생성하는 뉴클레오티드 치환의 도입과 같은 것에 의해, SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 DNA 서열을 기초로 하여 제조될 수도 있다. 가능한 다른 변형예는 서열로의 한가지 이상의 뉴클레오티드 삽입, 서열의 어느 한쪽 말단에서의 한가지 이상의 뉴클레오티드 첨가, 또는 어느 한쪽 말단 또는 서열내에서의 한가지 이상의 뉴클레오티드 결실이다.

게다가, 유사 DNA 서열에 의해 암호화된 프로테아제는 SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 DNA 서열에 의해 암호화된 정제 프로테아제에 대해 발생되는 항체와 면역학적으로 교차반응을 하는 것이 바람직하다.

SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열의 유사체가 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오티드 프로브는 예컨대 다음 DNA 서열중의 어느 것 또는 이들의 어떤 조합을 기초로 하여 제조될 수 있다:

(a) AATTAAGCAT CCTCCATCTT
(b) CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC
(c) TCCCGCTCTT CTCTCGATCT
(d) CATCATCCCA ATAACTCGGA
(e) CAAAATGAAG ACCTCTGCTC
(f) TCTTGACCGC TGGCCTGTTG
(g) GCACCGCTGC TATTGCTGCT
(h) CCTCTCACCG CGAAGCGCGC
(i) ACGTGCTCGC GCTGCCAAGC
(j) TGGCACCAGC CGCAAGAGCA
(k) AGGGGGGTCT CAAGCCCGGC
(l) ACCCAGCGAG GCCATAACCT
(m) GACCGGCTCC AAGAACACCG
(n) GAGGTACTCG TCCAACTGGG
(o) CCGGCGCCGT GCCAT
(p) AATTAAGCAT CCTCCATCTT CAAAGCTCAA TCTCGCTAAC TCCCGCTCTT
CTCTCGATCT CATCATCCCA ATAACTCGGA CAAAATGAAG ACCTCTGCTC
TCTTGACCGC TGGCCTGTTG GCACCGCTGC TATTGCTGCT CCTCTCACCG
CGAAGCGCGC ACGTGCTCGC GCTGCCAAGC TGGCACCAGC CGCAAGAGCA
AGGGGGGTCT CAAGCCCGGC ACCCAGCGAG GCCATAACCT GACCGGCTCC
AAGAACACCG GAGGTACTCG TCCAACTGGG CCGGCGCCGT GCCAT

이들 서열은 SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열 또는 그러한 서열의 유사체의 부분 서열을 구성한다.

SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열의 유사체가 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오티드 프로브는 예컨대 다음 DNA 서열중의 어느 것 또는 이들의 어떤 조합을 기초로 하여 제조될 수 있다:

(p1) CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT
(q) CCTCGTGATA TCTGCTTGAA
(r) CATCTCCTCA TCATGGTCGT
(s) CCTCAACAAG GTGCAGCCTT
(t) CTTCTGGGTC TGACCACCGC
(u) CGCCACTGGT CCCCTGGCCG
(v) AGCCGCAGGC TTCTGTCCGG
(w) TCAAGAACTT CTCCGTCAAG
(x) CAGGTCGAGA AGGCGGGCAG
(y) CAAGGGACGT ACCGTTAACC
(z) TGCCGGGTCT GTATGCGAAT
(aa) GCGCTGGCCA AGTATGGCGC
(bb) CCAGGTGCGG CCAGCGTCAA
(cc) GGCCGCCGCC GTCAGTGGCA
(dd) GCGTCGTGAC CACCCGCAGG CCAACGACG
(ee) CTGCTTCTCC TTCTCTTCCT CCTCGTGATA TCTGCTTGAA CATCTCCTCA
TCATGGTCGT CCTCAACAAG GTGCAGCCTT CTTCTGGGTC TGACCACCGC
CGCCACTGGT CCCCTGGCCG AGCCGCAGGC TTCTGTCCGG TCAAGAACTT
CTCCGTCAAG CAGGTCGAGA AGGCGGGCAG CAAGGGACGT ACCGTTAACC
TGCCGGGTCT GTATGCGAAT GCGCTGGCCA AGTATGGCGC CCAGGTGCGG
CCAGCGTCAA GGCCGCCGCC GTCAGTGGCA GCGTCGTGAC CACCCGCAGG CCAACGACG

이들 서열은 SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열 또는 그러한 서열의 유사체의 부분 서열을 구성한다.

본 발명의 DNA 서열은

- 아스퍼질러스 아큘레아투스 (Aspergillus aculeatus)로부터의 DNA 라이브러리를 적합한 벡터에서 클로닝시키고,

- 상기 벡터에 의해 적합한 효모 숙주세포를 형질전환시키고,

- 숙주세포를 적합한 조건하에 배양하여 DNA 라이브러리내의 클론에 의해 암호화된 관심대상의 어떤 효소를 발현시키고,

- 그러한 클론에 의해 생산된 효소의 모든 프로테아제 활성을 측정함으로써 양성 클론을 스크리닝하는 것

을 수반하는 일반 방법으로 분리될 수 있다.

이 스크리닝 방법의 보다 상세한 설명은 이후의 실시예 1 및 WO 93/11249에 제공되어 있고, 이것의 내용은 여기에 참고로 포함되어 있다.

본 효소를 코딩하는 DNA 서열은 예컨대 아스퍼질러스 아큘레아투스 (Aspergillus aculeatus), 예를 들면 네덜란드 델프트의 Centraalbureau voor Schimmelcultures로부터 공공연히 입수가능한 균주 CBS 101.43의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하고 적당한 효소 활성(즉 단백질 및 펩티드내의 펩티드 결합을 가수분해시키는 효소의 능력으로 정의되는 프로테아제 활성)을 나타내는 클론을 선택함으로써 분리될 수 있다. 다음에, 그 클론으로부터 예컨대 실시예 1에 기재된 바와 같이 표준 방법으로 적당한 DNA 서열을 분리할 수 있다.

상동 효소를 코딩하는 DNA 서열, 즉 유사 DNA 서열은 또다른 미생물, 특히 또다른 아스퍼질러스 (Aspergillus) sp.

의 균주, 특히 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus) 또는 아스퍼질러스 니거 (A. niger)의 균주, 트리코더마 (Trichoderma) sp.의 균주, 특히 트리코더마 할지아눔 (T. harzianum) 또는 트리코더마 레에지에 (T. reesie)의 균주, 푸자리움 (Fusarium) sp.의 균주, 특히 푸자리움 옥시스포룸 (F. oxysporum)의 균주, 리조퍼스 (Rhizopus) sp., 예컨대 리조퍼스 니베우스 (R. niveus)의 균주, 스키탈리디움 (Schytalidium) sp.의 균주 또는 후미콜라 (Humicola) sp.의 균주의 cDNA 라이브러리를 마찬가지로 스크리닝함으로써 유래될 수 있다고 예상된다.

대안으로, 본 발명의 DNA 서열은, 잘 알려진 방법에 따라 여기에 개시된 DNA 서열을 기초로 하여 제조된 합성 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 적당한 유기체로부터의 DNA로부터 편리하게 분리될 수도 있다. 예컨대 적합한 올리고뉴클레오티드 프로브는 상기에 나타낸 부분 뉴클레오티드 서열중의 어느 것을 기초로 하여 제조될 수 있다.

본 DNA 서열은 계속해서 재조합 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 벡터는 재조합 DNA법으로 편리하게 처리될 수 있는 벡터라면 어느 것이라도 좋고, 벡터의 선택은 흔히 그것이 도입될 숙주 세포에 좌우될 것이다. 따라서 벡터는 자기복제 벡터, 즉 염색체외의 것으로서 존재하는 벡터일 수 있고, 이것의 복제는 염색체 복제, 예컨대 플라스미드와는 무관하다. 이 대신 벡터는 숙주세포에 도입될 때 숙주세포게놈에 통합되고 그것이 통합된 염색체(들)와 함께 복제되는 것일 수도 있다.

벡터에서 프로테아제를 암호화하는 DNA 서열은 적합한 프로모터 및 터미네이터 서열에 작동가능하게 연결되어야 한다. 프로모터는 선택한 숙주세포에서 전사 활성을 나타내는 어떤 DNA 서열일 수 있으며, 숙주세포와 상동 또는 이종인 단백질을 암호화하는 유전자로부터 유래될 수 있다. 프로테아제, 프로모터 및 터미네이터를 각각 코딩하는 DNA 서열을 연결시키고 그것들을 적합한 벡터에 삽입하는데 사용되는 방법은 당업계에 숙련된 자들에게 잘 알려져 있다(예컨대 Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor, NY, 1989 참조).

본 발명의 효소를 암호화하는 DNA 서열에 의해 형질전환되는 숙주세포는 바람직하게는 진핵 세포, 특히 사상균 세포 또는 효모와 같은 균류 세포이다. 특히 이 세포는 아스퍼질러스(Aspergillus) 의 종, 가장 바람직하게는 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae) 또는 아스퍼질러스 니거 (Aspergillus niger)에 속할 수 있다. 균류 세포는 원형질체 형성 및 원형질체의 형질전환에 이어서 세포벽의 재생성을 수반하는 공정에 의해 그 자체 공지된 방법으로 형질전환될 수 있다. 숙주 미생물로서의 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae)의 사용이 EP 238 023(노보 노르디스크 아크티에 셀스카브)에 기재되어 있는데 그 내용은 여기에 참고로 포함되어 있다. 숙주세포는 또한 효모 세포, 예컨대 사카로미세스 (Saccharomyces), 특히 사카로미세스 세레비지아에 (Saccharomyces cerevisiae), 사카로미세스 클루이베리 (Saccharomyces kluyveri) 또는 사카로미세스 우바룸 (Saccharomyces uvarum)의 균주, 스키조사카로미세스 (Schizosaccharomyces) sp., 예컨대 스키조사카로미세스 폼베 (Schizosaccharomyces pombe)의 균주, 한센눌라 (Hansenula) sp., 피키아 (Pichia) sp., 야로위아 (Yarrowia) sp., 예컨대 야로위아 리포리티카 (Yarrowia lipolytica)의 균주, 또는 클루이베로미세스 (Kluyveromyces) sp., 예컨대 클루이베로미세스 락티스 (Kluyveromyces lactis)의 균주일 수도 있다.

더욱 추가의 양태에서 본 발명은 프로테아제 활성이 있는 효소의 제조방법에 있어서, 상기 효소를 암호화하는 본 발명의 DNA 구조체에 의해 형질전환된 적합한 숙주세포를 효소 제조를 허용하는 조건하에서 배양하고 얻어진 효소를 배양물로부터 회수하는 방법에 관한 것이다.

형질전환된 숙주세포를 배양하는데 사용되는 배지는 당해 숙주세포를 성장시키는데 적합한 어떤 종래의 배지일 수 있다. 발현된 프로테아제는 배양배지에 편리하게 분비될 수 있으며, 원심분리 또는 여과에 의해 배지로부터 세포를 분리하고 황산암모늄과 같은 염에 의해 배지중의 단백질 함유 성분을 침지시킨 다음에 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피법을 행하는 것을 포함하는 잘 알려진 방법으로 회수될 수 있다.

본 발명의 효소

바람직하게는 본 발명의 프로테아제(예컨대 H_2O_2 안정성 또는 Lys-Tyr 또는 Phe-Val 특이적 프로테아제)는 2-7 범위의 pH, 예컨대 6.0 이하의 pH, 예컨대 2-6 범위의 pH, 가장 바람직하게는 4-6범위의 pH에서 활성이다.

두 산성 프로테아제 모두 0.1-5%, 0.5-4%, 1-4% 또는 2-3% 과산화수소와 같은 0.01-5% 과산화수소의 존재하에서 활성이며 콘택트렌즈 세척에 이용가능하다.

본 발명의 H_2O_2 안정성 프로테아제의 바람직한 예는 SEQ ID No. 1에 나타낸 DNA 서열 또는 위에서 정의한 바와 같은 그것의 유사체로서 상기 DNA 서열과 적어도 80% 상동인 유사체에 의해 암호화된 효소이다.

본 발명의 Lys-Tyr 또는 Phe-Val 특이적 프로테아제의 바람직한 예는 SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열 또는 위에서 정의한 바와 같은 그것의 유사체로서 상기 DNA 서열과 적어도 80% 상동인 유사체에 의해 암호화된 효소이다.

본 발명의 효소는 바람직하게는 아스퍼질러스 아큘레아투스 (Aspergillus aculeatus) CBS 101.43으로부터 유래되고 SEQ ID No. 1 또는 2에 나타낸 DNA 서열에 의해 암호화되는 정제 프로테아제에 대해 발생되는 항체와 면역학적으로 반응한다. 본 명세서에서 용어 ' 으로부터 유래' 는 균주 CBS 101.43에 의해 생산되는 프로테아제를 가리킬 뿐만 아니라, 균주 CBS 101.43으로부터 분리된 DNA 서열에 의해 암호화되고 이 DNA 서열에 의해 형질전환된 숙주 유기체에서 제조되는 프로테아제를 가리키기도 한다.

본 발명의 H_2O_2 안정성 프로테아제와 Lys-Tyr 또는 Phe-Val 특이적 프로테아제는 둘 다 균종 아스퍼질러스 아큘레아투스 (Aspergillus aculeatus)의 균주로부터 얻었으나, 그러한 효소는 다른 유기체, 특히 미생물로부터도 마찬가지로 얻을 수 있다고 생각된다. 따라서 본 발명의 효소는 바람직하게는 아스퍼질러스 (Aspergillus), 리조퍼스 (Rhizopus), 트리코더마 (Trichoderma), 예컨대 트리코더마 레에제이 (T. reesei) 또는 트리코더마 할지아눔 (T. harzianum), 페니실리움 (Penicillium), 푸자리움 (Fusarium), 스키탈리디움 (Schytalidium) 또는 후미콜라 (Humicola), 예컨대 후미콜라 인솔렌스 (H. insolens) 또는 후미콜라 라누기노사 (H. lanuginosa)의 균주, 또는 바실러스(Bacillus)의 균주와 같은 세균 또는 균류로부터 얻을 수 있다.

아스퍼질러스 (Aspergillus) sp.의 예로는 아스퍼질러스 니거 (A. niger), 아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae) 또는 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus), 예컨대 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus) CBS 101.43를 들 수 있다.

더욱 추가의 양태에서 본 발명은 프로테아제 함유 물질의 분해 또는 변형에 유용한 효소제제로서, 상기한 바와 같은 프로테아제 활성을 나타내는 효소가 보강되어 있는 제제에 관한 것이다.

본 발명의 효소로 보강된 효소제제는 예컨대 다중의 효소 활성을 포함하는 효소제제, 특히 Pectinex ® , Pectinex Ultra SP ® , Gamanase, Celluclast 또는 Celluzyme과 같은 다중 식물세포벽 분해효소를 포함하는 효소제제 또는 Neutrase ® , Alcalase ® 또는 Flavourzyme ® (모두 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브로부터 입수가능)과 같은 프로테아제 및/또는 엑소펩티다제 함유 효소제제일 수 있다. 본 명세서에서 용어 '보강된' 은 효소제제의 프로테아제 활성이 편리하게도 상기한 방법으로 제조된 본 발명 효소의 첨가로 인해 예컨대 적어도 1.1의 보강 인자만큼 증가되었음을 가리킨다.

선택적으로, 프로테아제 활성을 나타내는 효소로 보강된 효소제제는 본 발명의 효소를 주요 효소 성분으로서 포함하는 것, 예컨대 1성분 효소제제일 수도 있다.

본 효소제제는 당업계에 알려진 방법에 따라 제조할 수 있으며 액체 또는 건조 제제의 형태일 수 있다. 예컨대 본 효소제제는 과립 또는 미소과립의 형태일 수 있다. 제제내에 포함될 효소는 당업계에 공지된 방법에 따라 안정화시킬 수 있다.

본 발명에 따른 효소제제는 식물세포벽 분해 또는 변형용 약제로서 사용될 수 있다. 엑스텐신과 같은 몇몇 단백질은 식물세포벽의 성분이다. 따라서 프로테아제는 식물세포벽의 분해 또는 변형을 용이하게 할 것이다. 그러한 프로테아제 함유 식물세포벽 분해 효소제제는 올리브 및 평지와 같은 식물원으로부터의 오일 추출과 같은 여러가지 많은 용도 또는 사과, 배 및 감귤류와 같은 여러가지 과일로부터의 쥬스 제조에 사용될 수 있다.

본 효소제제는 펙틴 리아제, 펙테이트 리아제, 엔도글루카나제, 아라비나나제, 크실라나제, 글루카나제, 갈락타나제, 만나나제, α-갈락토시다제, 람노갈락투로나제, 펙틴아세틸에스테라제, 폴리갈락투로나제, 프로테아제, 엑소펩티다제 또는 펙틴 메틸에스테라제와 같은 다른 식물세포벽 분해효소를 한가지 이상 더 함유할 수 있다. 본 제제는 상기 엔도-효소와 동일한 기질상에서 엑소-활성을 나타내는 효소를 한가지 이상 더 함유할 수도 있다. 본 발명에 따른 프로테아제는 다른 많은 세포벽 분해효소와 동일한 pH 및 온도조건에서 작용하여, 그러한 용도에 특히 적합하다.

추가 효소(들)는 아스퍼질러스(Aspergillus)속, 바람직하게는 아스퍼질러스 니거 (Aspergillus niger), 아스퍼질러스 아큘레아투스 (Aspergillus aculeatus), 아스퍼질러스 아와모리 (Aspergillus awamori) 또는 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae), 또는 트리코더마 (Trichoderma)속에 속하는 미생물에 의해 제조할 수 있다.

단백질은 종종 바람직하지 않은 엷은 안개 형성에 관여하기 때문에 본 발명에 따른 프로테아제 효소제제는 또한 포도주 산업에서 엷은 안개를 방지하거나 또는 엷은 안개를 해소하는데 사용될 수도 있다. 본 발명에 따른 프로테아제는 포도주의 발효 및 숙성시에 존재하는 조건하에서 활성이며, 따라서 이 용도에 특히 유용하다.

본 발명의 효소 또는 효소제제는 굽기에서 예컨대 밀가루의 글루텐 성분을 박력화시켜 소위 강력분의 연화를 달성하기 위해 사용될 수 있다. 박력분의 사용은 예컨대 운반 및 굽기 동안에 원래 형상을 유지시켜야 하는 압출하여 구운 제품, 비스킷 및 기타 제품의 제조에서, 매우 신장성이어야 하나 탄력성이지 않아야 하는 밀가루 반죽의 제조를 위해 중요하다. 본 발명의 프로테아제는 메타아황산수소나트륨(SMS)과 같은 밀가루의 박력화를 위해 통상 사용되는 작용물의 바람직한 대체물을 구성한다. SMS의 사용은 위생상의 잠재적인 위험 때문에 바람직하지 않다고 생각된다.

본 프로테아제 제제는 또한 식품 및 사료 산업에서 단백질의 소화력을 개선시키는데 사용될 수도 있다. 예컨대 본 효소 또는 효소제제는 동물 사료에 첨가되거나 또는 동물 사료, 특히 돼지새끼 또는 가금용 사료를 가공하는데 사용될 수 있다. 이것에 의해 사료 성분의 소화력이 증대될 수 있어 동물의 성장률 및 사료이용효율이 개선된다(Brenes et al., (1993) 참조).

더욱이 본 발명의 효소 또는 효소제제는 예컨대 콩, 완두, 루핀 또는 평지 단백질과 같은 식물성 단백질, 카제인과 같은 우유, 고기 단백질 또는 생선 단백질로부터 단백질 가수분해물을 제조하는데 유용할 수 있다. 본 프로테아제는 단백질 가수분해물의 가용성, 콘시스턴시, 미각 또는 발효성을 개선시키거나 항원성을 감소시키거나 다른 목적으로 식품, 사료 또는 데디컬 제품을 제조하는데 사용될 수 있다. 본 프로테아제는 단독으로 사용할 수도 있고 다른 프로테아제와 병용하거나 또는 엑소펩티다제와 같은 다른 효소와 병용할 수도 있다. 본 발명 프로테아제와 엑소펩티다제 풍부 효소제제의 병용은 단백질 가수분해물의 미각을 개선시킬 것이다.

본 프로테아제 제제는 또한 단백질로 인한 또는 부분적으로 단백질로 인한 점도를 감소시키는 것과 같이 단백질을 변형시키는데 사용될 수도 있다. 그러한 점도 문제는 콩 및 완두콩과 같은 여러가지 단백질 함유 식물재료의 가공에서 공지되어 있다.

게다가 본 효소 또는 효소제제는 생선 또는 고기의 가공에서, 예컨대 조직 및/또는 점도를 변화시키는데 사용될 수 있다.

본 프로테아제 제제는 또한 예컨대 맥주 제조용 보리, 맥아 및 기타 원료의 효모발효와 같은 발효 공정을 용이하게 하는데 사용될 수도 있다.

게다가 본 발명의 효소 또는 효소제제는 가죽 산업에서, 예컨대 가죽에서 털을 제거하는데 유용할 수 있다. 후속하는 가죽의 무두질은 산성 조건하에 행해지기 때문에 본 프로테아제의 낮은 최적 pH는 이점이 된다. 본 프로테아제 제제는 다른 단백질 분해활성이 본질적으로 없는 클로닝된 효소를 사용하는 것이 유리한 경우에 단백질로부터 펩티드를 제조하는데 유용하다.

더욱이 본 프로테아제 제제는 구아르 검, 크산탄 검과 같은 검의 정제 또는 질향상, 견의 정련, 또는 울의 품질 개선에서와 같이 여러가지 제품의 정제를 용이하게 하거나 질을 높이기 위해 단백질을 분해시키는데 사용될 수 있다.

과산화수소에 대한 안정성으로 인해 본 발명의 프로테아제는 둘 다 콘택트렌즈 세척 및 과산화수소의 사용을 수반하는 다른 용도에 특히 유용한데, 이때 단백질 함유 물질은 제거된다.

상기 사용에 대해서 본 발명 효소제제의 적용량 및 제제가 사용되는 기타 조건은 당업계에 공지된 방법을 기초로 하여 결정될 수 있다.

본 발명을 다음 실시예에서 보다 상세히 설명하나 실시예는 여하튼 특허청구된 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것은 아니다.

재료 및 방법

공여 유기체:mRNA는 충분한 통기를 보장하도록 저으면서 콩함유 발효배지에서 성장된 아스퍼질러스 아큘레아투스 (Aspergillus aculeatus) CBS 101.43으로부터 분리하였다. 균사는 3-5일 성장후 채취하여 즉시 액체질소로 동결시키고 -80℃에서 저장하였다.

효모 균주:사용된 사카로미세스 세레비지아에 (Saccharomyces cerevisiae) 균주는 yNG231(MATα, leu2, ura3-52, his4-539, pep4-δ1, cir+) 또는 JG169(MATα; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-113; prcl::HIS3; prb1::LEU2; cir+)이었다.

플라스미드:효모 TPI 프로모터를 함유하는 발현 플라스미드 pYHD17은 시중에서 입수가능한 플라스미드 pYES II(Invitrogen)로부터 제조하였다. 이 플라스미드 및 그 구성은 WO 93/11249에 더 기재되어 있고, 그 내용은 여기에 참고로 포함되어 있다.

아스퍼질러스 (Aspergillus) 발현벡터 pHD414는 플라스미드 p775(EP 238 023에 기재됨)의 유도체이다.

pHD414의 구성은 WO 93/11249에 더 기재되어 있다. pHD414는 아스퍼질러스 니거 (A. niger) 글루코아밀라제 터미네이터 및 아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae) TAKA 아밀라제 프로모터를 함유하고 있다.

전체 RNA의 추출:전체 RNA는 본질적으로 Chirgwin et al., 1979 및 WO 93/11249에 기재된 바와 같이 티오시안산 구아니딘으로 추출후 5.7M CsCl 쿠션을 통해 초원심분리하여 제조하였다.

폴리(A)+$^{+}$ RNA의 분리:폴리(A)$^{+}$ RNA는 올리고(dT)-셀룰로스 친화성 크로마토그래피로 분리하였다(Aviv & Leder, 1972). 일반적으로 올리고(dT) 셀룰로스(Boehringer Mannheim) 0.2g을 1×컬럼 부하 완충액(20mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.5M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS) 10ml중에서 사전팽창시키고, DEPC 처리하여 꽂은 플라스틱 컬럼(Poly Prep Chromatography Column, Bio Rad)상에 부하하고, 1×부하 완충액 20ml로 평형화시켰다. 전체 RNA를 65℃에서 8분 동안 가열하고 얼음상에서 5분 동안 퀀칭하여 1부피의 2×컬럼 부하 완충액을 RNA에 가한 후 샘플을 컬럼에 부하하였다. 용출물을 모으고 샘플을 각 부하에 앞서 상기와 같이 가열하여 얼음상에서 퀀칭함으로써 2-3회 재부하하였다. 올리고(dT) 컬럼을 10부피의 1×부하 완충액에 이어서 3부피의 배지용 염 완충액(20mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS)으로 세척한 다음 +65℃까지 예열된 3부피의 용출 완충액(10mM Tris-Cl, pH 7.6, 1mM EDTA, 0.05% SDS)으로 폴리(A)$^{+}$ RNA를 용출시켜 500㎕ 분획을 채취하였다. 채취된 각 분획에 대해 OD_{260} 을 판독하고 mRNA 함유 분획을 모아서 -20℃에서 12시간 동안 에탄올 침지시켰다. 폴리(A)$^{+}$ RNA를 원심분리에 의해 모아서 DEPC-DIW 중에 재현탁시키고 5-10㎍ 분취액으로 -80℃에서 저장하였다.

노던 블러트 분석:각종 균사로부터의 폴리(A)$^+$ RNA (5㎍/샘플)를 1.2 아가로스-2.2M 포름알데히드 겔(Sambrook et al., 1989)에서 전기영동하고 전달 완충액으로서 10×SSC (Sambrook et al., 1989)를 사용하여 나일론막(Hybond-N, Amersham)에 블러팅하였다. 3가지의 랜덤 프라이밍된(Feinberg & Vogelstein, 1983) ^{32}P-표지 cDNA 프로브를 각 하이브리드화에 사용하였다: 1) 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus)로부터의 폴리갈락투로나제 I에 대한 1.3kb Not I-Spe I 단편, 2) 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus)로부터의 엔도글루카나제를 암호화하는 1.3kb Not I-Spe I 단편 및 3) 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus)로부터의 갈락타나제 I을 코딩하는 1.2kb Eag I 단편. 노던 하이브리드화는 5×SSC(Sambrook et al., 1989), 5×덴하르트 용액(Sambrook et al., 1989), 0.5% SDS(w/v) 및 100㎍/ml의 변성 연어정자 DNA 중에서 프로브 농도를 약 2ng/ml로 하여 16시간 동안 65℃에서 행한 다음 65℃의 5×SSC(2×15분), 2×SSC, 0.5% SDS(1×30분), 0.2×SSC, 0.5% SDS(1×30분), 및 5×SSC(2×15분)로 세척하였다. -80℃에서 12시간 동안 방사선사진분석후 프로브 #1을 제작자의 지시에 따라 필터에서 제거하여 프로브 #2로 재하이브리드화하고 결국은 프로브 #3으로 재하이브리드화하였다. 베체스다 연구소(Bethesda Research Laboratories)에서 얻은 RNA 래더를 사이즈 마커로서 사용하였다.

cDNA 합성:

제 1가닥 합성:이중가닥 cDNA를 헤어핀 변형을 이용하여 RN아제 H법(Gubler & Hoffman, 1983, Sambrook et al., 1989)으로 아스퍼질러스 아큘레아투스 (A. aculeatus) 폴리(A)$^+$ RNA 5㎍으로부터 합성하였다. 폴리(A)$^+$ RNA (DEPC 처리한 물 5㎕중 5㎍)를 70℃에서 8분 동안 가열하여 얼음상에서 퀀칭하고, 1mM의 각 dNTP (Pharmacia), 40유니트의 사람 태반 리보뉴클레아제 저해제(RN아신, Promega), 10㎍의 올리고(dT)$_{12-18}$ 프라이머(Pharmacia) 및 1000유니트의 수퍼스크립트 II RN아제 H-역전사효소(베체스다 연구소)를 함유하는 역전사효소 완충액(50mM Tris-Cl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 베체스다 연구소)과 최종부피가 50㎕가 되게 조합하였다. 반응 혼합물을 45℃에서 1시간 동안 배양함으로써 제 1가닥 cDNA를 합성하였다.

제 2가닥 합성:합성후 30㎕의 10mM Tris-Cl, pH 7.5, 1mM EDTA를 가하고, 40㎍의 글루코겐 캐리어(Boehringer Mannheim), 0.2부피의 10M NH_4Ac 및 2.5부피의 96% EtOH를 가하여 -20℃에서 12시간 동안 mRNA:cDNA 하이브리드를 에탄올침전시켰다. 하이브리드를 원심분리에 의해 회수하여 70% EtOH로 세척하고 공기건조시켜 100㎛M의 각 dNTP, 44유니트의 대장균 DNA 폴리머라제 I(Amersham), 6.25유니트의 RN아제 H(베체스다 연구소) 및 10.5 유니트의 대장균 DNA 리가제(New England Biolabs)를 함유하는 제 2가닥 완충액(20mM Tirs-Cl, pH 7.4, 90mM KCl, 4.6mM $MgCl_2$, 10mM $(NH_4)_2SO_4$ 16㎛M βNAD$^+$) 250㎕중에 재현탁시켰다. 반응 튜브를 16℃에서 3시간 동안 배양함으로써 제 2가닥 cDNA 합성을 수행하고 EDTA를 최종농도가 20mM이 되게 가하여 반응을 중지시킨 다음에 페놀 추출하였다.

녹두 뉴클레아제 처리:이중가닥(ds) cDNA를 -20℃에서 12시간 동안 2부피의 96% EtOH, 0.1부피의 3M NaAc, pH 5.2를 가하여 에탄올 침전시키고 원심분리에 의해 회수하여 70% EtOH로 세척하고 건조시켜(SpeedVac), 36유니트의 녹두 뉴클레아제(베체스다 연구소)를 함유하는 녹두 뉴클레아제 완충액(30mM NaAc, pH 4.6, 300mM NaCl, 1mM $ZnSO_4$, 0.35mM DTT, 2% 글리세롤) 30㎕중에 재현탁시켰다. 반응물을 30℃에서 30분 동안 배양하여 단일가닥 헤어핀 DNA를 고정시킨 다음 70㎕의 10mM Tris-Cl, pH 7.5, 1mM EDTA를 가하여 페놀 추출하고 2부피의 96% EtOH 및 0.1부피의 3M NaAc, pH 5.2로 -20℃에서 12시간 동안 에탄올 침지시켰다.

T4 DNA 폴리머라제에 의한 블런트 종결(blunt-ending):ds cDNA를 반응혼합물을 +37 ℃에서 15분 동안 배양함으로써 0.5mM 각 dNTP 및 7.5유니트의 T4 DNA 폴리머라제(Invitrogen)를 함유하는 T4 DNA 폴리머라제 완충액(20mM Tris-아세트산염, pH 7.9, 10mM MgAc, 50mM KAc, 1mM DTT) 50㎕중의 T4 DNA 폴리머라제에 의해 블런트 종결시켰다. EDTA를 최종농도가 20mM이 되게 가하여 반응을 중지시킨 다음 페놀 추출하고 에탄올 침지시켰다.

어댑터 연결 및 크기 선택:필-인(fill-in) 반응 후, 반응혼합물을 +16℃에서 12시간 동안 배양함으로써 600pmol BstX I 어댑터 및 5유니트의 T4 리가제(Invitrogen)를 함유하는연결 완충액(50mM Tris-Cl, pH 7.8, 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 1mM ATP, 25μg/ml 소혈청 알부민) 30μl중의 비-팰린드롬 BstX I 어댑터(1μg/μl, Invitrogen)에 cDNA를 연결시켰다. +70℃에서 5분 동안 가열하여 반응을 중지시키고 적응된 cDNA를 아가로스겔 전기영동(0.8% HSB-아가로스, FMC)으로 크기분별하여 미연결 어댑터 및 작은 cDNA를 분리하였다. cDNA를 0.7kb의 컷오프(cut-off)로 절단하여 크기선택하고 cDNA를 10mM Tris-Cl, pH 7.5, 1mM EDTA 중의 아가로스겔로부터 1시간 동안 100볼트에서 전기용출시키고 페놀 추출하여 상기와 같이 -20℃에서 12시간 동안 에탄올 침전시켰다.

cDNA 라이브러리의 구성:적응된 ds cDNA를 원심분리로 회수하여 70% EtOH로 세척하고25ml DIW중에 재현탁시켰다. 대규모 라이브러리 연결에 앞서서, 1μl ds cDNA (반응 튜브 #1-#3), 2유니트의 T4 리가제(Invitrogen) 및 50ng(튜브 #1), 100ng(튜브 #2) 및 200ng(튜브 #3 및 #4) Bst XI 절단 효모발현벡터(pYES 2.0 벡터, Invitrogen 또는 yHD17)를 각각 함유하는 연결 완충액(상기와 동일) 10μl 중에서 네번의 시험 연결을 행하였다. +16 ℃에서 12시간 동안 배양하여 연결반응을 수행하고 70℃에서 5분 동안 가열하고 각 연결체 1μl를 콤피턴트 대장균 1061 세포(OD600=차가운 DIW로 2회, 10% 글리세롤 20ml로 1회 세척하여 10% 글리세롤 2ml중에 재현탁시킨 1리터 LB-육즙중에서 0.9) 40μl에 일렉트로포레이션하였다(200Ω, 2.5kV, 25μF). 각 형질전환 혼합물에 SOC 1ml를 가한 후 세포를 +37℃에서 1시간 동안 성장시키고 50μl를 LB + 암피실린 플레이트상에 깔고(100μg/ml), +37℃에서 12시간 동안 성장시켰다.

최적 조건을 이용하여 9유니트의 T4 리가제를 함유하는 연결 완충액 40μl중에서 대규모 연결을 만들고 반응물을 +16℃에서 12시간 동안 배양하였다. 70℃에서 5분 동안 가열하여 연결반응을 중지시키고 -20℃에서 12시간 동안 에탄올 침지시키고 원심분리로 회수하여 DIW 10μl중에 재현탁시켰다. 1μl 분취액을 상기와 동일한 일렉트로포레이션 조건을 이용하여 일렉트로콤피턴트 대장균 1061 세포로 형질전환시키고 형질전환 세포를 적정하여 라이브러리를 플레이트당 5000-7000c.f.u.로 LB + 암피실린 플레이트상에 깔았다. 각 플레이트에 배지 3ml를 가하였다. 세균을 긁어내고 글리세롤 1ml를 가하여 -80℃에서 풀로서 저장하였다. 남은 2ml를 DNA 분리에 사용하였다. DNA량이 요구된 수의 효모 형질전환체를 제공하는데 불충분하였다면, 하룻밤 증식시킨 -80℃ 세균 원료 50μl를 접종한 500ml 배지(TB)로부터 대규모 DNA를 제조하였다.

효모 라이브러리의 구성:효모에서 모든 세균 클론을 확실히 시험하기 위해 원래 풀중의 박테리아 클론수보다 5배 더 많은 효모 형질전환체의 수를 한계치로서 설정하였다.

각 풀로부터 정제 플라스미드 DNA(100ng/μl)의 1μl 분취액을 콤피턴트 사카로미세스 세레비지아에 (S. cerevisiae) JG 169 세포 (OD_{600} =차가운 DIW로 2회, 차가운 1M 소르비톨로 1회 세척하여 1M 소르비톨0.5ml 중에 재현탁시킨 YPD 500ml 중에서 1.5, Becker & Guarante, 1991) 40μl에 일렉트로포레이션하였다(200Ω, 1.5kV, 25μF). 차가운 1M 소르비톨 1ml를 가한 후 80μl 분취액을 플레이트당 250-400c.f.u.가 되도록 SC + 글루코스-우라실 상에 깔고 30℃에서 3-5일 동안 배양하였다.

아스퍼질러스(Aspergillus) 에서의 발현을 위한 cDNA 유전자 분리:

한개 이상의 프로테아제 생성 콜로니를 50ml 유리 시험관중의 20ml YNB-1 육즙에 접종하였다. 관을 30℃에서 2일 동안 흔들었다. 세포를 3000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 채취하였다.

세포를 1ml 0.9M 소르비톨, 0.1M EDTA, pH 7.5 중에 재현탁시켰다. 펠렛을 에펜도르프관에 옮기고 전속력으로 30초 동안 회전시켰다. 세포를 0.4ml 0.9M 소르비톨, 0.1M EDTA, 14mM β-메르캅토에탄올중에 재현탁시켰다. 100μl 2mg/ml 지몰라제를 가하고 현탁액을 37℃에서 30분 동안 배양하여 30초 동안 회전시켰다. 펠렛(스페로플라스트)을 0.4ml TE에 재현탁시켰다.(1.5ml 0.5M EDTA, pH 8.0, 0.6ml 2M Tris-Cl pH 8.0, 0.6ml 10% SDS) 90μl를 가하고 현탁액을 65℃에서 30분 동안 배양하였다. 5M KOAc 80μl를 가하고 현탁액을 얼음상에서 적어도 60분 동안 배양하고 전속도로 15분 동안 회전시켰다. 상청액을 EtOH(실온)로 채운 새로운 관에 옮긴 다음 완전히 그러나 완만하

게 혼합하여 30초 동안 회전시켰다. 펠렛을 차가운 70% EtOH로 세척하고 30초 동안 회전시켜 실온에서 건조시켰다. 펠렛을 50㎕ TE 중에 재현탁시키고 15분 동안 회전시켰다. 상청액을 새로운 관에 옮겼다. 2.5㎕ 10mg/ml RN아제를 가한 다음에 37℃에서 30분 동안 배양하고 500㎕ 이소프로판올을 완만하게 혼합하면서 가하였다. 혼합물을 30초 동안 회전시키고 상청액을 제거하였다. 펠렛을 차가운 96% EtOH로 세정하여 실온에서 건조시켰다. DNA를 최종농도가 약 100㎕/ml가 되게 50㎕의 물에 용해시켰다.

아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae) 또는 아스퍼질러스 니거 (Aspergillus niger)의 형질전환(일반 방법)

YPD(Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) 100ml에 아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae) 또는 아스퍼질러스 니거 (A. niger)의 종자를 접종하여 흔들면서 37℃에서 약 2일 동안 배양한다. 균사를 미라클로스를 통해 여과하여 채취하고 0.6M $MgSO_4$ 200ml로 세척한다. 균사를 15ml의 1.2M $MgSO_4$, 10mM NaH_2PO_4, pH=5.8에 현탁시킨다. 현탁액을 얼음상에서 냉각시키고 Novozym® 234, 배치 1687 120mg을 함유하는 완충액 1ml를 가한다. 5분후, 12mg/ ml BSA(Sigma type H25) 1ml를 가하고 현미경하에 관찰되는 샘플에서 다수의 원형질체가 보일 때까지 완만히 교반하면서 37℃에서 1.5-2.5시간 동안 배양을 계속한다.

현탁액을 미라클로스를 통해 여과하고 여액을 멸균관에 옮겨 5ml의 0.6M 소르비톨, 100mM Tris-HCl, pH=7.0으로 뒤덮는다. 원심분리를 100g으로 15분 동안 수행하여 $MgSO_4$ 쿠션 상부에서 원형질체를 채취한다. 2부피의 STC(1.2M 소르비톨, 10mM Tris-HCl, pH=7.5, 10mM $CaCl_2$)를 원형질체 현탁액에 가하고 혼합물을 1000g으로 5분 동안 원심분리한다.원형질체 펠렛을 STC 3ml중에 재현탁시켜 재펠렛화한다. 이것을 반복한다. 최종적으로 원형질체를 STC 0.2-1ml중에 재현탁시킨다.

원형질체 현탁액 100㎕를 STC 10㎕중의 적당한 DNA 5-25㎍과 혼합한다. 원형질체를 p3SR2(아스퍼질러스 니둘란스 (A. nidulans) amdS 유전자 포함 플라스미드)와 혼합한다. 혼합물을 실온에서 25분 동안 방치한다. 0.2ml의 60% PEG 4000(BDH 29576), 10mM $CaCl_2$ 및 10mM Tris-HCl, pH=7.5를 가하여 주의해서 혼합하고(2회), 최종적으로 동일 용액 0.85ml를 가하여 주의해서 혼합한다. 혼합물을 실온에서 25분 동안 방치하고 2500g으로 15분 동안 회전시켜 펠렛을 1.2M 소르비톨 2ml중에 재현탁시킨다. 한번 이상의 침강후 원형질체를 적당한 플레이트상에 펼친다. 원형질체는 1.0M 수크로스, pH 7.0, 질소원으로서의 10mM 아세트아미드 및 20mM CsCl을 함유하는 소형 플레이트(Cove Biochem. Biophys. Acta 113(1966) 51-56)상에 펼쳐 백그라운드 성장을 저해한다. 37℃에서 4-7일 배양 후 포자를 집어서 단일 콜로니에 펼친다. 이 과정을 반복하고 2차 재분리후 단일 콜로니중의 포자를 정의된 형질전환체로서 저장한다.

면역학적 교차반응성: 면역학적 교반반응성을 측정하는데 사용될 항체는 정제 프로테아제를 사용하여 제조할 수 있다. 보다 구체적으로 말하면, 본 발명의 프로테아제에 대한 항혈청은 N. Axelsen et al., A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chap. 23, 또는 Johnstone and R. Thorpe, Immunochem-istry in Practice, Blackwell Scientific Publication, 1982(보다 구체적으로는 pp. 27-31)에 기재된 방법에 따라 토끼(또는 다른 설치류)를 면역화시킴으로써 발생시킬 수 있다. 정제된 면역글로불린은 항혈청으로부터 예컨대 염침전($(NH_4)_2SO_4$)에 이어서 투석 및 예컨대 DEAE-Sephadex상의 이온교환 크로마토그래피에 의해 얻을 수 있다. 단백질의 면역화학적 특성화는 아우체를로니 이중확산분석(O. Oucherlony, Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publication, 1967, pp. 655-706), 교차 면역전기영동(N. Axelsen et al., 상기 참조, 3 및 4장) 또는 로켓 면역전기영동(N. Axelsen et al., 2장)으로 행할 수 있다.

배지:

YPD: 효모 추출물 10g, 펩톤 20g, H_2O 810ml까지. 가압멸균하고 20% 글루코스(멸균여과함)를 가함.

10×기초 염: 효모 질소 베이스 66.8g, 숙신산 100g, NaOH 60g, H_2O 1000ml까지. 살균여과함.

SC-URA: 10×기초 염 90ml, 20% 카사미노산 22.5ml, 1% 트립토판 9ml, H_2O 806ml까지. 가압멸균하고, 5% 트레오닌 3.6ml 및 20% 글루코스 또는 20% 갈락토스 90ml를 가함.

SC-H 육즙: 아미노산 없는 효모 질소 베이스 7.5g/ℓ, 숙신산 11.3g/ℓ, NaOH 6.8g/ℓ, 비타민 없는 카사미노산 5.6g/ℓ, 트립토판 0.1g/ℓ. 121℃에서 20분 동안 가압멸균함. 가압멸균후, 배지 100ml당 30% 갈락토스용액 10ml, 30% 글루코스용액 5ml 및 5% 트레오닌용액 0.4ml를 가함.

SC-H 한천: 아미노산 없는 효모 질소 베이스 7.5g/ℓ, 숙신산 11.3g/ℓ, NaOH 6.8g/ℓ,비타민 없는 카사미노산 5.6g/ℓ, 트립토판 0.1g/ℓ 및 한천 20g/ℓ (Bacto). 121℃에서 20분 동안 가압멸균함. 가압멸균후 한천 450ml당 22% 갈락토스용액 55ml 및 5% 트레오닌용액 1.8ml를 가함.

YNB-1 한천: KH_2PO_4 3.3g/ℓ, 한천 16.7g/ℓ. pH 7로 조절함. 121℃에서 20분 동안 가압멸균함. 가압멸균후, 한천 450ml당 아미노산 없는 13.6% 효모 질소 베이스 25ml, 40% 글루코스용액 25ml, 1% L-류신용액 1.5ml 및 1% 히스티딘용액 1.5ml를 가함.

YNB-1: 한천이 없는 것을 제외하고는 YNB-1 한천과 같은 조성.

FG-4-한천: 한천 35g/L, 대두 가루 30g/L, 말토덱스트린(Glucidex 6) 15g/L, 박토 펩톤5g/L, pH 7. 121℃에서 40분 동안 가압멸균함.

FG-4 배지: 대두 가루 30g/L, 말토덱스트린 (Glucidex 6) 15g/L, 박토 펩톤 5g/L. 121 ℃에서 40분 동안 가압멸균함.

MDU-2 배지: 말토스 45g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L, NaCl 1g/L, K_2SO_4 2g/L, KH_2PO_4 12g/L, Pluronic 61L 0.1ml/L, Trace 금속용액 0.5ml/L. pH 5.0. 121℃에서 20분 동안 가압멸균함. 가압멸균후, 50% 멸균여과요소 15ml/L를 가함.

카제인 상층 겔: pH 5.5인 완충액중의 0.5% 카제인, 1% 아가로스. 상층을 한천 플레이트상에 붓기 전에 겔을 비등시킨 다음 55℃까지 냉각시킴.

페드 배치(fed batch) 발효

아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae)에 의한 프로테아제 I 또는 II의 페드-배치 발효에 사용된 배지는 탄소원인 말토덱스트린, 질소원인 요소 및 효모 추출물을 포함하였다.

페드 배치 발효는 탄소원의 3.5% 및 질소원의 0.5%를 포함하는 배지에 당해 아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae) 숙주세포의 진탕 플라스크 배양물을 접종함으로써 수행하였다. pH 5.0 및 34℃에서 24시간 배양 후 추가의 탄소원 및 질소원의 연속적인 공급을 개시하였다. 탄소원을 제한인자로서 유지시켰으며 산소가 과잉으로 존재하도록 하였다. 페드 배치 배양을 4일 동안 계속하였는 바, 그 후 효소를 회수할 수 있었다.

효소의 특성화

단백질분해활성

1 헤모글로빈 프로테아제 단위(hpu)는 하기하는 바와 같은 표준조건하에서 분당 1밀리몰의 1차 아미노기(세린 표준과 비교하여 측정)를 유지시키는 효소의 양으로서 정의한다.

헤모글로빈(소, Sigma사 공급)의 2%(w/v) 용액을 pH 5.5로 조절된 Britton and Robinson, J. Chem. Soc ., 1931, p1451에 기재된 유니버설 완충액(Universal Buffer)을 사용하여 제조한다. 이 기질 용액 2ml를 25℃에서 10분 동안 수욕에서 사전배양한다. 약 0.2-0.3hpu/ml의 유니버설 완충액(pH 5.5)에 상당하는 bg/ml의 효소제제를 함유하는 효소 용액 1ml를 가한다. 25℃에서 30분 배양후, 퀀칭제(탈이온수로 500ml가 되게 만든 트리클로로아세트산 17.9g, 아세트산나트륨 29.9g 및 아세트산 19.8g을 함유하는 용액 5ml)를 가하여 반응을 종결시킨다. 블랭크는 퀀칭제를 효소 용액보다 먼저 첨가하는 것외에는 시험용액과 동일한 방식으로 제조한다. 반응 혼합물은 수욕중에서 20분 동안 유지시킨 후 와트만 42 페이퍼 필터를 통해 여과한다.

1차 아미노기는 다음과 같이 o-프탈디알데히드(OPA)에 의한 색 전개로 측정한다: 사붕산이나트륨 10수화물 7.62g 및 도데실황산나트륨 2.0g을 물 150ml에 용해한다. 다음에 메탄올 4ml에 용해시킨 OPA 160mg을 β-메르캅토에탄올 400㎕와 함께 가한 후 용액을 물로 200ml가 되게 만든다. OPA 시약 3ml에 위에서 얻은 여액 400㎕를 혼합하면서 가한다. 약 5분 후 340nm에서의 광학 밀도(OD)를 측정한다. 유니버설 완충액(pH 5.5) 100ml중에 세린 10mg을 함유하는 세린 표준을 사용하여 OPA 시험도 또한 수행한다. 블랭크로서는 완충액만을 사용한다. 프로테아제 활성은 OD 측정치로부터 다음 식에 의해 산출한다.

$$\text{hpu/ml 효소용액: } \frac{(OD_t - OD_b) \times C_{ser} \times Q}{(OD_{ser} - OD_B) \times MW_{ser} \times t_i}$$

hpu/g 효소제제 = hpu/ml: b

식에서 OD_t, OD_b, OD_{ser} 및 OD_B는 각각 시험용액, 블랭크, 세린 표준 및 완충액의 광학밀도, C_{ser} 은 표준중의 세린농도(mg/ml)(이 경우 0.1mg/ml), MW_{ser} 은 세린의 분자량(105.09)이다. Q는 효소 용액의 희석인자 (이 경우 8), t_i 는 배양시간(분)(이 경우 30분)이다.

저해

다음 저해제를 시험하였다.

펩스타틴(아스파르트산 저해제)(1mM)

PMSF(세린 프로테아제 저해제)(0.1%)

PEFABLOC(세린 프로테아제 저해제)(0.1%)

EDTA(메탈로 프로테아제 저해제)(0.1M)

(스위스 바젤의 Pentapharm사에서 입수가능한 PEFABLOC을 제외하고는 모두 Sigma사에서 입수가능함).

잔류활성은 pH 5.5에서 HPU/ℓ로서 측정하였다.

pH활성프로필은 여러 pH값(4-8)에서 HPU/ℓ로서 측정하였다.

pH-안정성은 효소용액(0.3HPU/ℓ)을 50℃ 및 여러 pH값(4-5-6-7-8)에서 각각 30, 60 및 120분 방치하고 방치 전후의 단백질 분해활성을 측정함으로써 측정한다.

온도활성프로필은 여러 온도(15-70℃)에서 HPU/ℓ로서 측정한다.

온도안정성은 효소용액(0.3HPU/ℓ)을 pH 5 및 여러 온도(25-40-50-60℃)에서 각각 30, 60 및 120분 방치하고 방치 전후의 단백질 분해활성을 측정함으로써 측정한다.

SDS 겔 전기영동및 등전점 전기영동은 제작자의 지시에 따라 각각 Gradient 8-25 및 IEF 3-9를 사용하여 Pharmacia사제 Phast-System 상에서 행하였다.

특이성

본 발명 프로테아제의 특이성은 다음과 같이 측정한다.

유니버설 완충액, pH5.5(상기 참조)중의 1mg/ml 사람 인슐린 또는 소 글루카콘 0.5ml 및 동일 완충액중의 프로테아제 I 및 II 각각 75㎕를 37℃에서 120분 동안 배양하였다. 1N 염산 50㎕를 가하여 반응을 종결시켰다.

인슐린 또는 글루카곤 분자를 다수의 펩티드 단편으로 절단하였다. 이것들을 적당한 C-18 컬럼(Hibar LiChrosorb RP-18, 독일연방공화국 다름슈타트의 Merck사 제공 5㎛ 입자)을 사용하여 역상 HPLC로 분리 및 단리하였다. 단편을 용매 A(0.2M 황산나트륨 및 0.1M 인산, pH 2.5) 및 B(아세토니트릴/물, 50%)에 의해 0-5분 동안 A 90%/B 10% 내지 A 80%/B 20%의 선형구배에 이어서 50 분동안 A 80%/B 20%로 용출시켰다. 단리된 단편을 어플라이이드 바이오시스템스(미국 캘리포니아 포스터시티) 모델 470A 가스상 시퀀서를 사용하여 자동화 에드만 분해에 의해 아미노산 서열화하고, 페닐티오하이단토인(PTH-) 아미노산을 L. Thim et al., 'Secretion of human insulin by a transformed yeast cell', FEBS Letters212 (2), 1987, p.307에 기재된 바와 같이 고성능 액체크로마토그래피로 분석함으로써, 인슐린 또는 글루카곤 분자의 절단부위를 확인하였다.

실시예 1

150 풀내의 각 클론 약 1.5×10^{6}개로 구성된A. aculeatus로부터의 라이브러리를 구성하였다.

이 라이브러리로부터의 각 클론 20개로부터 DNA를 분리하여 cDNA 삽입에 대해 분석하였다. 삽입 빈도는 90%보다 크다는 것을 알았으며 평균삽입체 크기는 약 1400bp이었다.

일부 풀로부터의 DNA를 효모로 형질전환시키고, 효모콜로니 200-500개를 함유하는 플레이트 50-100개를 각 풀로부터 얻었다. 3-5일 성장후, 한천 플레이트를 수세트의 한천 플레이트상에 레플리카 플레이팅한다. 다음에 한 세트의 플레이트를 30℃에서 2-4일 동안 배양하고 프로테아제 활성을 검색하기 위해 카제인 상층겔로 덮었다. 30℃에서 하룻밤 배양후, 프로테아제-양성 콜로니를 백색 후광으로 둘러싸인 콜로니로서 확인하였다.

효모-양성 콜로니로부터의 세포를 한천상에서 단일콜로니를 분리하기 위해 펼치고, 확인된 프로테아제생성 콜로니 각각에 대해 효모생성 단일 콜로니를 선택하였다.

양성 클론을 단일 콜로니로서 얻고, cDNA 삽입체를 바이오틴일화 폴리링커 프라이머를 사용하여 효모콜로니로부터 직접 증폭시켜 자기비드(Dynabead M-280, Dynal) 시스템으로 정제하고 사슬종결법(Sanger et al., 1977) 및 시퀀스 시스템(United States Biochemical)을 사용하여 각 cDNA 클론의 5' 말단을 서열화함으로써 개별적으로 특성화하였다. 두가지 효소 유전자의 DNA 서열을 각각 SEQ ID No.1 및 2에 나타낸다.

계속해서, 프로테아제를 암호화하는 cDNA를 상기한 바와 같이 아스퍼질러스 (Aspergillus)에서의 발현을 위해 분리하고 표준방법을 사용하여 대장균으로 형질전환시켰다. 각각의 형질전환으로부터 대장균 콜로니 두개를 분리하여, DNA 삽입체를 절제하는 제한효소 HindIII 및 XbaI로 분석하였다. 이들 클론중 한개로부터의 DNA를 효모균주 JG169로 형질전환시켰다.

양성 클론중 몇개의 DNA서열을 결정하였다. 프로테아제를 암호화하는 DNA 서열 두개를 각각 SEQ ID No. 1 및 2에 나타낸다.

실시예 2

아스퍼질러스 (Aspergillus)에서 유전자를 발현시키기 위해 각 군의 대표 한개 이상으로부터 상기 방법을 이용하여 HindIII/XbaI 또는 다른 적당한 제한효소에 의한 분해, 겔상의 크기 분별 및 정제로 cDNA를 분리하고 계속해서 pHD414에 연결시켜 플라스미드 pA1P1 및 pA1P2를 얻는다. 대장균에서 증폭후 플라스미드를 상기한 일반방법에 따라 아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae) 또는 아스퍼질러스 니거 (A. niger)로 형질전환시킨다.

아스퍼질러스 오리자에 (A. oryzae) 형질전환체 시험

각 형질전환체에 페트리접시 중앙에서 FG-4 한천을 접종하였다. 30℃에서 5일 배양후, 코르크 마개뽑이에 의해 콜로니 중앙에서 직경 4mm의 플러그를 제거하였다. pH5.5인 완충액중에 0.5% 카제인 및 1% 아가로스를 함유하는 카제인 상층겔에 플러그를 묻고 40℃에서 하룻밤 배양하였다. 프로테아제 활성을 상기와 같이 확인하였다. 형질전환체중 일부는 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae) 백그라운드보다 현저히 더 큰 후광을 가졌다. 이것은 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae)에서의 프로테아제 발현이 효과적임을 입증해준다. 프로테아제 활성이 가장 높은 형질전환체 8개를 선택하여 YPG-한천상에 접종시키고 유지시켰다.

선택한 형질전환체 8개 각각을 FG-4 및 MDU-2 배지가 있는 500ml 진탕 플라스크상에서 YPG-한천 경사면으로부터 접종하였다. 양호한 통기를 보장하도록 충분히 교반하면서 3-5일 발효후, 배양육즙을 2000g으로 10분 동안 원심분리하고 상청액을 분석하였다.

각 상청액 15㎕를 카제인 상층겔(직경 13cm 페트리 접시중 25ml)에 뚫린 직경 4mm의 구멍에 넣었다. 프로테아제 활성을 배양시의 백색 후광 형성으로 확인하였다.

페드 배치 발효

계속해서, 프로테아제 I 및 II를 각각 상기 방법을 이용하여 효모를 발현하는 아스퍼질러스 오리자에(A. oryzae) 의 페드 배치 발효에 의해 제조하였다.

실시예 3

프로테아제 I 및 II의 특성화

상기 페드 배치 발효로 얻은 상청액을 상기 재료 및 방법란에 기재된 바와 같이 수행되는 특성화에 사용하였다. 단백질 분해활성은 상기 방법을 이용하여 pH5.5에서 HPU/ℓ로서 측정하였다.

저해 시험으로 다음 결과를 얻었다.

[표 1]

	% 잔류활성			
	EDTA	펩스타틴	PEFABLOC	PMSF
프로테아제 I프로테아제 II	10497	919	8390	92108

펩스타틴에 의한 프로테아제 II의 저해는 그것이 펩신타입의 아스파르트산 프로테아제 임을 증명해준다. 프로테아제 I은 펩스타틴에 의해 저해되지 않으며 따라서 분명히 아스파르트산 프로테아제라고 확인되지 않는다. 다른 한편 pH 5에서의 최적 활성은 그것이 산성 프로테아제임을 증명해준다.

pH 활성 프로필을 도 1에 나타낸다. 두 효소 모두 pH 5에서 최적 활성을 가지며 프로테아제 I은 프로테아제 II보다 더 좁은 범위에서 활성임을 알 수 있다. 따라서 프로테아제I은 pH 4-6의 범위에서 60%보다 큰 활성을 나타냄에 비하여 프로테아제 II는 pH4-7의 범위에서 60%보다 큰 활성을 나타낸다.

SDS 겔 분석으로 프로테아제 I 및 II의 분자량은 각각 23.000 및 37.000kDa로 추정되었다. IEF 분석으로 양 효소의 pI는 약 4로 추정된다.

도 2는 온도-활성 프로필을 보여준다. 두 효소의 온도-활성 프로필이 다소 유사하긴 하나 최적온도는 약간 다른데, 프로테아제 I이 50℃, 프로테아제 II가 45℃이다.

도 3 및 도 4는 pH-안정성을 보여준다. 각 pH에 대해 제로-시간활성을 100%로 설정하였으며 따라서 얻어진 절대치는 상이하다. 두 프로테아제 모두 pH 4 및 5에서 안정하다. pH 6에서 프로테아제 I은 불안정함에 비하여 프로테아제 II는 일정한 안정성을 갖는다(30분후 잔류활성 40%). 두 효소 모두 pH 7에서는 불안정하다.

도 5 및 도 6은 온도-안정성을 보여준다. 각 온도에 대해 제로-시간 활성을 100%로 설정하였으므로 얻어진 절대치는 상이하다. 두 프로테아제 모두 50℃까지 안정하나 60℃에서는 불안정하다.

프로테아제 I 및 프로테아제 II에 의한 인슐린 및 글루카곤 가수분해시 얻어진 결과에 근거하여, 프로테아제 II는 인슐린과 반응하지 않음에 비하여 두 프로테아제 모두 글루카곤을 가부분해시킴을 알았다. 프로테아제 I은 다소 비특이적인 프로테아제이고 프로테아제 II는 보다 특이적이라고 결론을 내릴 수 있다. 프로테아제 II는 소 글루카곤에서 발견된 Lys-Tyr 및 Phe-Val 결합을 절단할 수 있음을 알았다(그것의 서열은 Bromer, Sinn, and Behrens, J. Amer. Chem. Soc., Vol. 79, p. 2807, 1958에 나타나 있다).

실시예 4

점도 감소를 위한 본 발명 프로테아제의 사용

콩가루(탈지하고 껍질을 벗긴 대두로부터 제조)를 95℃에서 펠렛화한 후 분쇄하였다. 콩가루는 건조물질이 15%가 되도록 탈이온수에 현탁시킨다. 건조물질 g당 프로테아제 I 효소단백질 5mg 및 건조물질 g당 프로테아제 II 효소단백질 5mg을 각각 콩 슬러리에 가하였다. 슬러리를 40℃및 pH 5-6에서 배양하였다. 슬러리의 점도를 배양 1, 2 및 24시간 후 250rpm의 스핀들 #31이 있는 작은 샘플 어댑터를 사용하여 브룩필드 LV DV III 점도계상에서 측정하였다. 잔류 점도는 다음과 같았다.

[표 2]

	프로테아제 I	프로테아제 II
1시간2시간	73%59%	49%38%

실시예 5

콘택트렌즈 세척을 위한 본 발명 프로테아제의 사용

콘택트렌즈세척 분야에서는 콘택트렌즈의 효과적인 소독과 세척 둘 다를 정규적으로 하는 것이 필수적이다. 가장 효과적인 콘택트렌즈 소독방법중 하나는 그것들을 pH 3.5의 3% H_2O_2를 함유하는 용액에 적어도 20분 동안 담그는 것이다. H_2O_2는 렌즈를 눈에 끼우기 전에 예컨대 카탈라제 또는 백금 디스크로 중화시킨다. 공교롭게도 시중에서 관심을 끄는 어떤 프로테아제도 지금까지는 이러한 엄한 조건하에서 양호한 효과를 가지는 것으로 밝혀지지 않았으며, 그래서 H_2O_2 중화후 프로테아제를 첨가하는 번거러운 제 2단계가 콘택트렌즈상의 단백질 침착물을 제거하는데 요구되고 있다. 돼지 펩신은 현재 사용되고 있는 세린 프로테아제(서브틸리신 carlsberg)보다는 우수하나 포유동물 제품과 종종 관련되는 바이러스 때문에 문제가 있다.

본 발명의 프로테아제 I 및 II를 각각 콘택트렌즈에서 변성 단백질을 제거하는 능력에 관해 시험하였다. 그것들을 현재 사용되고 있는 세린 프로테아제와 비교하였으며 또한 상업적 전망보다는 기술적 전망에서 관심을 끌고 있긴 하지만 돼지 펩신과도 비교하였다.

실험 프로토콜은 다음과 같았다.

재료: 헨 리소짐, Sigma사제 L-6878

Essilor사제 'Rythmic' 콘택트렌즈(II형 렌즈, 최고수준, 비이온성)

상기와 같이 제조한 프로테아제 I

상기와 같이 제조한 프로테아제 II

돼지펩신, Sigma사제 P-6887

서브틸리신 carlsberg, Clear-Lens Pro ® (노보 노르디스크 아크티에 셀스카브).

표준완충액: 0.05M Na_2HPO_4, 0.9% NaCl pH 7.5

시약완충액: 0.05M Na_2HPO_4, 0.9% NaCl, 3% H_2O_2, pH 3.5

신틸레이션액: Optiphase 'HiSafe III'

시그마사제 헨 리소짐은 환원 메틸화를 통해 ^{14}C로 표지하여 정제하였다.

0.05M Na_2HPO_4, 0.9% NaCl및 0.2mg/ml 리소짐 pH7.5를 함유하는 용액을 만들었다. 일정량의 ^{14}C-표지 리소짐을 CPM(Counts Per Minute)이 약 200.000이도록 가하였다. 용액 1.0ml를 신틸레이션 글라스에 옮겼다. 콘택트렌즈를 가하고 글라스를 85 ℃의 수욕에 30분 동안 두었다.

다음에, 콘택트렌즈를 3×3ml 시약 완충액으로 세척하였다. 그것을 외과용 메스로 4등분 하였다. 각각의 4분의 1쪽을 시약 완충액 3ml를 함유하는 새로운 신틸레이션 글라스에 옮겼다.

시험할 다른 양의 프로테아제를 최종 농도가 시약 완충액 ml당 효소단백질 0.1, 0.5, 2.5, 5, 12.5, 50 및 200㎍이 되도록 가하였다.

반응은 25℃에서 4시간에 걸쳐 일어났다. 4분의 1쪽 렌즈를 2×3ml 표준완충액으로 세정하였다. 신틸레이션액 12ml를 가하고 Packard 2500 TR 액체 신틸레이션 카운터로 CPM을 측정하였다.

각 프로테아제를 평가하는데 렌즈 네개가 필요하였다. 즉 2일에 걸쳐 이중 측정을 하였으며 각 렌즈에 블라인드(blind) 대조표준이 필요하였다.

병행된 소독/세척동안 렌즈에서 제거된 리소짐의 상대량을 각 4분의 1쪽 렌즈의 질량차로부터 산출하였다. 도 7은 여러 프로테아제의 성능에 관한 그래프도이다.

두 프로테아제 모두 콘택트렌즈세척 용도에 아주 적합하다. 프로테아제 I은 다른 프로테아제보다 매우 우수함을 알았다. 프로테아제 II는 돼지 펩신과 성능이 매우 밀접함에 비하여 현재 사용되고 있는 세린프로테아제는 불량한 성능을 나타낸다. 본 발명의 산성 프로테아제의 추가의 이점은 눈물액에서 발견되는 중성 pH에서 활성이 낮다는 것이다. 이것에 의해 렌즈를 소독/세척후 철저히 헹구지 않아도 자극의 위험이 저하된다.

실시예 6

굽기를 위한 본 발명 프로테의 사용

방법:

케이크가루 10g에 물 5.9g을 가한다. 물은 다른 농도의 프로테아제 I, 프로테아제 II 및 Neutrase ® (노보 노르디스크 아크티에 셀스카브에서 입수가능)를 함유하고 있다. 반죽을 Glutamic 2200 혼합기로 1분 동안 혼합한다. 다음에 그것을 플라스틱백에 넣어서 32℃에서 25분 동안 배양한다.

그 후, 전분을 제거하고 반죽에 글루텐을 남기기 위해 반죽을 Glutamic 혼합기를 사용하여 2% NaCl(수용액)로 세척한다.

다음에, 글루텐 덩어리를 균질성이 될 때까지 손으로 말고 높이 약 0.5cm, 직경 2.5cm인, 중심부에 구멍이 있는 원통형상으로 누른다. 계속해서 글루텐 원통을 훅에 매달고 중량 2g을 구멍에 넣는다. 모두 25℃의 물속에 넣는다.

그 후 글루텐 원통의 스트레칭을 깨질 때까지 15분마다 측정한다.

효소는 초기에 7.5mAU/kg 가루로 시험하여 Anson Unit 베이시스(AU)상에서 나누는데, 이것은 Neutrase ® 의 최적 분량이다(단백질분해활성 측정을 위한 앤슨-헤모글로빈(Anson- Hemoglobin)법에서는 변성 헤모글로빈을 온도 25℃, pH 7.5 및 반응시간 10분에서 분해시킨다. 미분해 헤모글로빈을 트리클로로아세트산(TCA)으로 침전시키고 TCA 가용성 생성물의 양을 페놀 시약으로 측정하는데 이것은 티로신 및 트립토판에 의해 청색을 나타낸다. 1AU는 페놀시약으로 1밀리당량의 티로신과 동일한 색을 나타내는 양의 TCA 가용성 생성물을 분당 유리시킬 정도로 초기속도에서 헤모글로빈을 분해하는 효소량이다).

도 8은 효소가 없고 Neutrase ® , 프로테아제 I 및 프로테아제 II가 있는 글루텐의 스트레칭 곡선을 나타낸다. 이 곡선은 동일한 분량의 효소를 사용한 측정치 6-7개의 평균이다. 알 수 있는 바와 같이 3가지 프로테아제를 전부 가하면 글루텐의 스트레칭이 보다 빨라졌다.

7.5mAU/kg 가루 분량의 프로테아제 I은 동일 분량의 Neutrase ® 만큼 글루텐을 박력화시키지 않는다. 글루텐 원통은 깨지기 전에 길어지며, 신장률은 보다 낮다.

이 시스템에서 가능한 최대량이었던 2.3mAU/kg 가루의 프로테아제 II를 첨가하면 7.5mAU /kg의 Neutrase ® 만큼 글루텐을 거의 박력화시킨다. 글루텐은 후에 약간 절단되며 곡선의 형상은 동일하지 않다. 이것은 프로테아제 II가 글루텐 박력화에 있어서 Neutrase ® 의 약 3배 만큼 AU 베이시스에 유효함을 증명해준다.

결론적으로, 본 발명의 프로테아제는 글루텐 박력화에 통상 사용되는 화학약품(광범위하게 사용되는 것의 예는 SMS(메타아화산수소나트륨)이다)에 대한 바람직한 대체물을 구성한다.

실시예 7

동물사료에의 본 발명 프로테아제의 사용

분쇄하고 탈지한 사료용 콩을 하기 조건하에 탈이온수와 혼합하였다. 가수분해는 위 및 소장의 pH 조건을 모사하기 위해 두 단계로 행하였다. 본 발명 프로테아제 II의 성능을 바이오-피드 프로(Bio-Feed Pro)의 것과 비교하였는데, 이것은 브레니스 등(1993)에 의해 브로일러 다이어트에 사용될 때 체중증가 및 사료 효율을 개선시키게 되는 것으로 증명되었다.

가수분해조건:

가수분해 혼합물: 분쇄하고 탈지한 콩 70g

탈이온수 330g

온도 : 40℃

pH : 1단계 4.0

2단계 6.5

시간 : 1단계 180분

2단계 180분

효소 : 1단계 I) 펩신 1.92g (Merck art. 7190)

II) I + 바이오-피드 프로 3.0L 5.5AU/kg 콩

III) I + 프로테아제 II 0.19AU/kg 콩

2단계 I) 판크레아틴 6g (Sigma P 1750)

II) I + 바이오-피드 프로 3.0L 5.5AU/kg 콩

III) I + 프로테아제 II 0.19AU/kg 콩

바이오-피드 프로® 는 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브에서 입수가능하다. 프로테아제 II는 상기와 같이 얻었다.

효소를 처음 0분에서 가하였다. 가수분해 동안에 °Brix 및 오스몰농도를 측정하여 반응과정을 추적하였다. 알더-니센(1986)에 따라 오스몰농도치를 사용하여 다음 방정식에 의해 가수분해도(DH)를 산출할 수 있다.

$$DH = \frac{\Delta C}{S\% \times f_{osm}} \times \frac{1}{\omega} - \frac{1}{h_{tot}} \times 100\%$$

식에서 △는 오스몰농도(mOSM) 증가량, S%는 단백질농도, ω는 삼투압계의 보정 인자, h_{tot} 는 단백질 기질중의 총 펩티드 결합수(meqv/g 단백질), f_{osm} 은 %를 g/kg H_2O_2로 환산하는 인자이다.

$$f_{osm} = \frac{1000}{100 - DM\%} =$$

더욱이 90분(1단계) 후와 0.15 및 180분(2단계) 후에 가수분해 혼합물의 N-성분중의 술포살리실산 가용상의 평균 분자량을 분석하였다. 분자량 분석은 다음 방법으로 수행하였다.

1.원리

시료는 겔투과 크로마토그래피(GPC) 모드로 조작하여, 희석, 여과해서 액체 크로마토그래피 시스템에 주입한다. 이 분리법은 명확한 공극 직경의 공극을 갖는 다공성 입자로 채운 컬럼을 통한 액체 유동을 이용한다.

분자크기가 상이한 펩티드들의 용액이 컬럼을 통과할 때 작은 펩티드는 공극속으로 유입될 수 있을 것이고 보다 큰 펩티드는 공극으로부터 배제될 것이다. 따라서 큰 펩티드가 작은 펩티드보다 더 빨리 컬럼에서 용출됨에 따라 용액중의 펩티드는 분자크기(및 중량)에 따라 분리될 것이다. 컬럼출구에 있는 검출기는 유출물을 계속해서 측정한다. 크로마토그래피 시스템을 공지된 분자량의 펩티드로 보정한다.

2.크로마토그래피 장치

2.1 고압펌프,WATERS M 510, 유량 0.7ml/분

주입기,Waters WISP M 710

검출기, 214nm까지 파장 확장하는Waters M 440

으로 구성되는 HPLC 시스템,

2.2 GPC 컬럼, 직렬로 연결되고 주위온도에서 조작되는 3×TSK G 2000 SWXL,

7.8 mm×300mm.

2.3 집적화/데이타 프로세싱, 810/820 GPC 옵션을 갖는Waters 820 MXXIMA SIM

크로마토그래피 데이타 시스템.

3.시약

3.1 인산완충액, $NaH_2PO_4 2H_2O$

3.2 암모늄클로라이드, NH_4Cl

3.3 트리플루오로아세트산(TFA), CF_3COOH

3.4 아세토니트릴, CF_3CN

3.5 이동상:

0.05M 인산완충액/0.1% TFA 및 25% 아세토니트릴을 함유하는 0.5M 암모늄클로라이드 용액

4.설명

4.1 보정

크로마토그래피 시스템은 기지의 분자량을 갖는 다수의 펩티드 표준을 주입하여 보정한다. 각 표준의 분자량은 컬럼으로부터 펩티드를 용출시키는데 필요한 이동상의 실측치에 대비하여 반로그 플로팅한다. 적어도 제곱 산출에 의해 가장 적합한 3차 다항식을 산출한다. 이 곡선이 보정 곡선을 나타낸다.

4.2 분석

샘플을 이동상에 약 5mg/ml로 희석/용해시킨다. 용액을 22μm 필터를 통해 여과하고 20μl를 크로마토그래피로의 주입에 사용한다. 검출기 응답 대 용출부피를 기록한다. 기록된 곡선 - 크로마토그램 - 은 샘플의 실제 분자량 분포를 보여준다. 누적된 중량분포에 관한 산출 및 평균분자량 산출을 가능하게 하기 위해 크로마토그램을 작은 시간(및 용출부피)세그먼트 - 각 세그먼트는 시간 간격에 걸친 크로마토그램 면적 및 용출부피에 의해 특징지어진다 - 로 분할한다.

5.산출

결과를 중량 및 수평균 분자량으로 환산하여 나타낸다.

$$\bar{M}_w = \frac{\Sigma_i \ (A_i * M_{w,i})}{\Sigma_i A_i} \quad , \quad \bar{M}_n = \frac{\Sigma_i \ A_i}{\Sigma_i \ (A_i / M_{w,i})}$$

여기서,

$\bar{M}_w$: 중량평균분자량

$\bar{M}_n$: 수평균분자량

A_i: 각 시간 간격에 걸쳐 누적된 검출기 응답으로서 측정한 각 세그먼트의

크로마토그램 면적

$M_{w,i}$: 각 세그먼트의 대응 분자량. 이 값은 시간 간격에 걸친 평균 용출

부피를 이용하여 보정 곡선에 의해 산출한다.

결과

° Brix, mOSM 및 %DH의 값을 이하의 표에 나타낸다.

펩신, 바이오-피드 프로, 프로테아제 II 및 판크레아틴에 의한 사료용 콩의 가수분해

파라미터: °BRIX	단계 I, 분										
효소	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180
펩신	5.09	6.135	6.505	6.625	6.9275	7.345	7.745	8.175	8.695	9.195
바이오-피드 프로	5.09	6.125	6.325	6.545	7.245	7.465	7.565	8.185	8.545	9.105
프로테아제 II	5.09	6.505	6.845	7.105	7.825	8.405	8.605	9.305	9.705	10.205

파라미터: °BRIX	단계 II, 분										
효소	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360
펩신	12.965	15.135	15.4025	15.637	16.135	16.415	16.705	17.075	17.437	18.075
바이오-피드 프로	12.965	15.165	15.165	15.725	16.105	16.4	16.525	16.885	17.285	17.805
프로테아제 II	13.605	15.605	15.925	16.025	16.365	16.685	16.885	17.105	17.505	18.145

파라미터: mOSM	단계 I, 분											
효소	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180		
펩신	347	362	362	360.5	363.5	366	368	370.5	373	381.5		
바이오-피드 프로	347	365	364	366	367	371	373	379	380	385		
프로테아제 II	347	371	382	391	411	421	427	439	447	463		

파라미터: mOSM	단계 II, 분											
효소	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360		
펩신	468	996	1009	1015.5	1037.5	1054.5	1068.5	1087.5	1111	1148		
바이오-피드 프로	468	1013	1017	1033	1048	1058	1069	1094	1113	1145		
프로테아제 II	548	1118	1127	1135	1152	1161	1176	1201	1227	1284		

파라미터: mOSM 증가량 단계 I, 분												
효소	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180		
펩신	0	15	15	13.5	16.5	19	21	23.5	26	34.5		
바이오-피드 프로	0	18	17	19	20	24	26	32	33	38		
프로테아제 II	0	24	35	44	64	74	80	92	100	116		

파라미터: mOSM 증가량 단계 II, 분												
효소	180	185	190	195	210	225	240	270	300	360		
펩신	0	528	541	547.5	569.5	586.5	600.5	619.5	643	680		
바이오-피드 프로	0	545	549	565	578	590	601	626	645	677		
프로테아제 II	0	570	579	587	604	613	628	653	679	736		

파라미터: % DH 단계 I, 분											
효소	0	5	10	15	30	45	60	90	120	180
펩신	0	2.86	2.86	2.57	3.14	3.62	4.00	4.47	4.95	6.57
바이오-피드 프로	0	3.43	3.24	3.62	3.81	4.57	4.95	6.09	6.28	7.24
프로테아제 II	0	4.57	6.66	8.38	12.19	14.09	15.23	17.52	19.04	22.09

분자량 분석결과를 이하에 나타낸다.

[표 3]

	단계 I	단계 II		
	90분	0분	15분	180분
펩신	960	1070	680	520
바이오-피드 프로	880	1020	690	510
프로테아제 II	650	630	530	480

탈지하지 않은 콩 단백질은 pH 4.0 보다 pH 6.5에서 더 가용성이기 때문에 pH를 6.5로 조절할 때 겉보기 분자량이 증가한다.

프로테아제 II는 보다 많은 단백질 및 펩티드를 방출하며 바이오-피드 프로 이상으로 단백질을 분해함을 알 수 있고, 따라서 프로테아제 II는 바이오-피드 프로보다 우수하다고 결론이 내려진다.

본 발명의 프로테아제 II는 산성 pH 범위에서 최적 활성을 가지므로 이 효소는 동물의 위에서 이미 작용하며, 따라서 동물용 사료에 적용할 때 바이오-피드 프로에 비하여 사료효율의 전반적인 개선이 달성될 것이다. 상기 결과들은 이러한 결론을 뒷받침한다.

참조문헌

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

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

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

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

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

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

Brenes, A. *et al.*, Poultry Science, 72, 2281-2293, 1993.

Adler-Nissen, J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, Elsevier Applied Science Publishers London and New York, 1986.

Takahashi, K. *et al.*, 1991, The Primary Structure of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A*, The Journal of Biol. Chemistry, Vol. 266, No. 29, pp. 19480-19483.

Choi, G.H. *et al.*, Molecular analysis and overexpression of the gnee encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*, 1993, Gene **125**:135-131.

Gomi, K. *et al.*, 1993, Cloning and Nucleotide Sequence of the

Acid Protease-encoding Gene (*pepA*) from *Aspergillus oryzae*, Biosci. Biotech. Biochem., 57(7):1095-1100.

Inoue, H. *et al.*, 1991, The Gene and Deduced Protein Sequences of the Zymogen of *Aspergillus niger* Acid Proteinase A*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 29, pp. 19484-19489.

Berka, R.M. *et al.*, 1993, Isolation and characterization of the *Aspergillus oryzae* gene encoding aspergillopepsin O, Gene, **125**:195-198.

Berka, R.M. *et al.*, 1990, Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, Gene **86**:153-162.

Berka, R.M. *et al.*, 1990, Corrigendum, Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*, Gene **96**:313.

발명의 효과

본 발명은 프로테아제 활성이 있는 효소로서, 7.0 미만의 pH에서 활성이고 Phe - Val 또는 Lys - Tyr 연결에 특이적인 효소를 제공한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

프로테아제 활성을 나타내는 효소를 암호화하는 DNA 서열로 이루어지는 DNA 구조체로서, 상기 DNA 서열이 SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열, 또는 프로테아제의 아미노산 서열에 변화를 일으키지 않는 코돈용례에 따른 뉴클레오티드 치환의 도입 또는 보존적 아미노산 치환이 결과되는 뉴클레오티드 치환의 도입에 의해 제조된 SEQ ID No. 2에 나타낸 DNA 서열과 적어도 90% 상동인 그것의 유사서열로 이루어지는 DNA 구조체.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 단백질분해활성을 나타내는 효소를 암호화하는 DNA 서열은 미생물로부터 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, DNA 서열은 사상균 또는 효모로부터 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, DNA 서열은 아스퍼질러스 (Aspergillus), 리조퍼스 (Rhizopus), 트리코더마 (Trichoderma), 페니실리움 (Penicillium), 푸자리움 (Fusarium), 스키탈리디움 (Schytalidium) 또는 후미콜라 (Humicola)의 균주로부터 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, DNA 서열은 아스퍼질러스 아큘리아투스 (Aspergillus aculeatus), 아스퍼질러스 니거 (Aspergillus niger) 또는 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae)의 균주로부터 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, DNA 서열은 아스퍼질러스 아큘리아투스 (Aspergillus aculeatus) CBS 101.43의 DNA 라이브러리로부터 분리하거나 또는 그것을 기초로 하여 제조하는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

청구항 7.

제 1 항에 따른 DNA 구조체를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 8.

제 1 항에 따른 DNA 구조체 또는 제 7 항에 따른 재조합 발현벡터를 포함하는 아스퍼질러스 니거 (Aspergillus niger) 또는 아스퍼질러스 오리자에 (Aspergillus oryzae)의 균주에 속하는 세포.

청구항 9.

단백질분해활성을 나타내는 효소의 제조방법으로서, 제 8항에 따른 세포를 효소의 제조를 허용하는 조건하에 배양하고 배양물로부터 효소를 회수하는 것으로 이루어지는 제조방법.

청구항 10.

5%까지의 과산화수소의 존재와 4 내지 7 범위의 pH에서 활성화되는 단백질분해활성을 나타내는 효소로서, 상기 효소는 제 1항에 따른 DNA 구조체에 의해 암호화되거나 또는 제 9항에 따른 방법에 의해 제조되는 효소.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 아스퍼질러스 (Aspergillus), 리조퍼스 (Rhizopus), 트리코더마 (Trichoderma), 페니실리움 (Penicillium), 푸자리움 (Fusarium), 스키탈리디움 (Schytalidium) 또는 후미콜라 (Humicola)의 균주로부터 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 12.

제 11 항에 있어서, 아스퍼질러스 아큘리아투스 (Aspergillus aculeatus)의 균주로부터 얻을 수 있는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 13.

제 10 항에 따른 프로테아제 활성을 나타내는 효소가 보강되어 있는 효소제제.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 펙틴 리아제, 펙테이트 리아제, 엔도글루카나제, 아라비나나제, 크실라나제, 글루카나제, 갈락타나제, 만나나제, α-갈락토시다제, 람노갈락투로나제, 펙틴 아세틸에스테라제, 폴리갈락투로나제, 프로테아제, 엑소펩티다제 또는 펙틴 메틸에스테라제와 같은 다른 식물세포벽 분해효소를 한가지 이상 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 15.

제 10 항에 있어서, 단백질 함유 물질의 분해 또는 변형에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 16.

제 13 항에 있어서, 단백질 함유 물질의 분해 또는 변형에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소제제.

청구항 17.

제 10 항에 있어서, 콘택트렌즈의 세척에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 18.

제 13 항에 있어서, 콘택트렌즈의 세척에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소제제.

청구항 19.

제 10 항에 있어서, 3% H_2O_2의 존재하에서 사용되는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 20.

제 13 항에 있어서, 3% H_2O_2의 존재하에서 사용되는 것을 특징으로 하는 효소제제.

청구항 21.

제 10 항에 있어서, H_2O_2를 중화시키기 위한 카탈라제와 조합하여 사용되는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 22.

제 13 항에 있어서, H_2O_2를 중화시키기 위한 카탈라제와 조합하여 사용되는 것을 특징으로 하는 효소제제.

청구항 23.

제 10 항에 있어서, 구운 제품의 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 24.

제 13 항에 있어서, 구운 제품의 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소제제.

청구항 25.

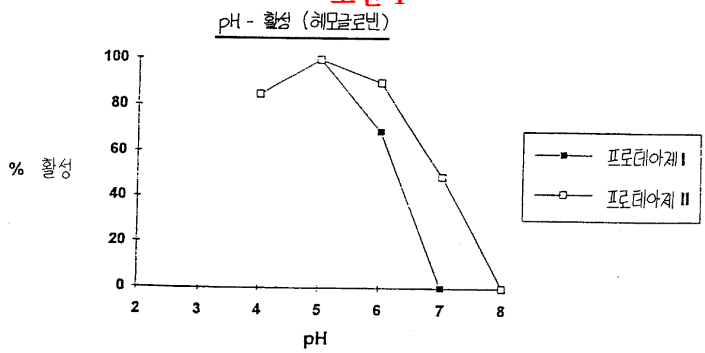
제 10 항에 있어서, 동물 사료의 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 26.

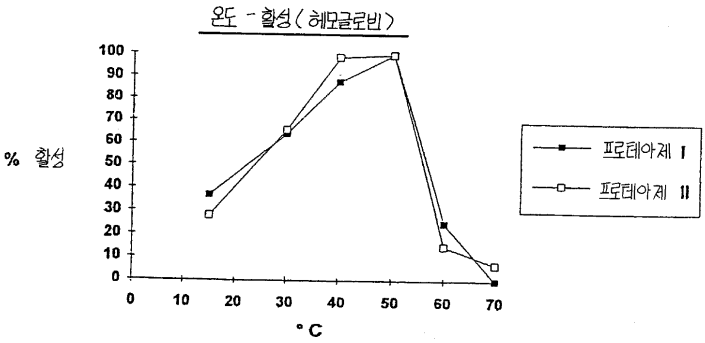
제 13 항에 있어서, 동물 사료의 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 효소제제.

도면

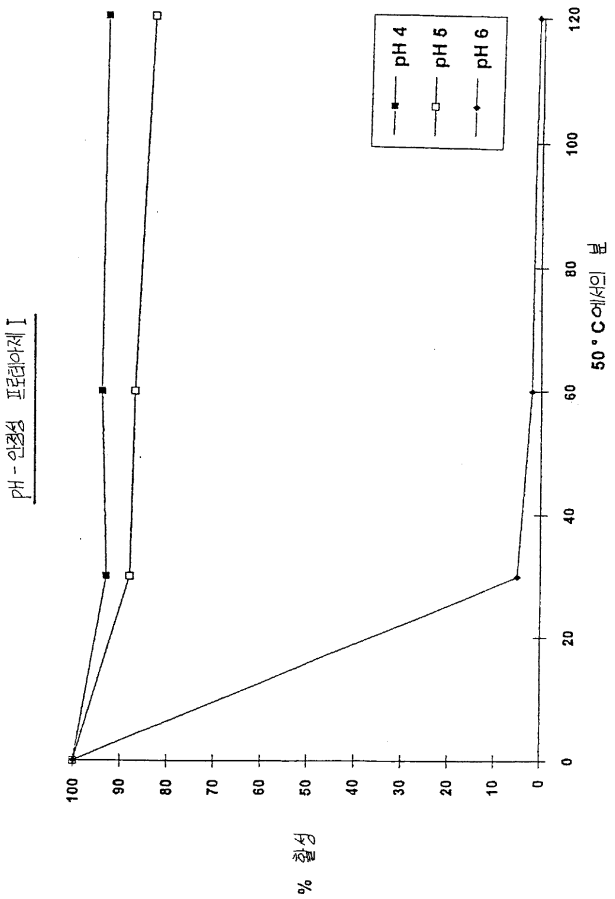
도면 1



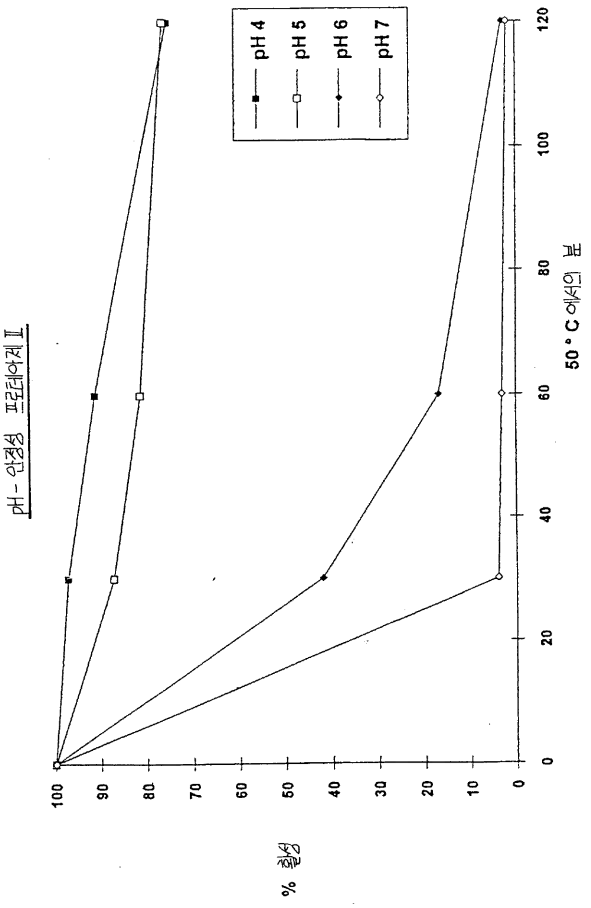
도면 2



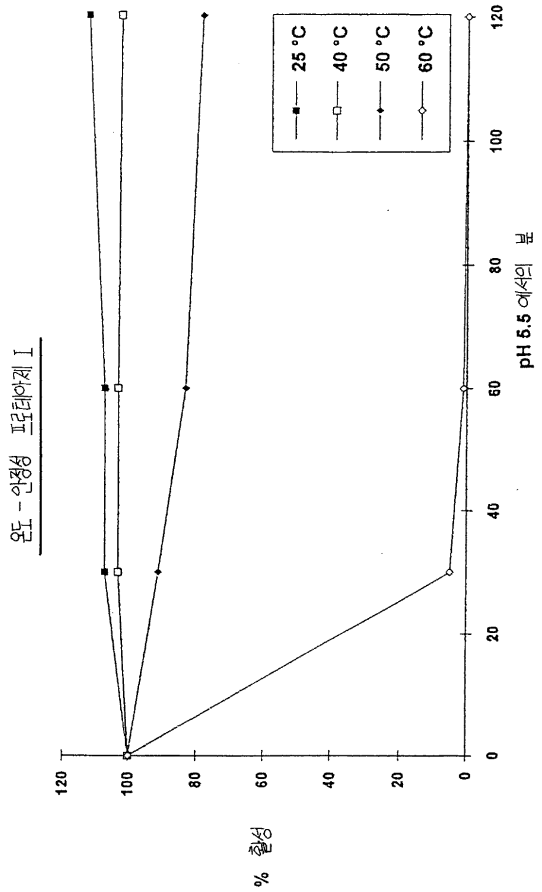
도면 3


pH - 안정성 프로파일제 I
% 활성
50 °C에서의 날
pH 4
pH 5
pH 6
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120

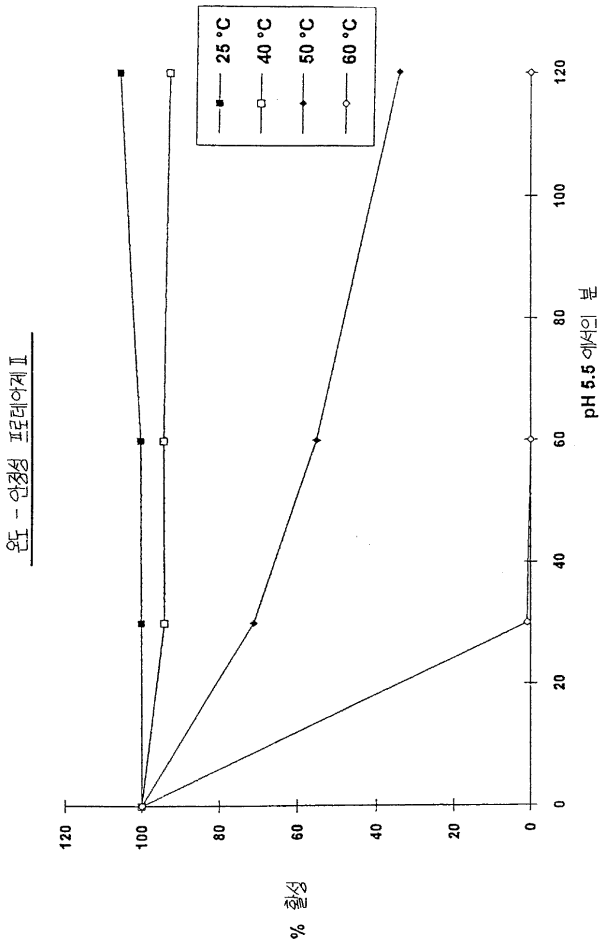
도면 4



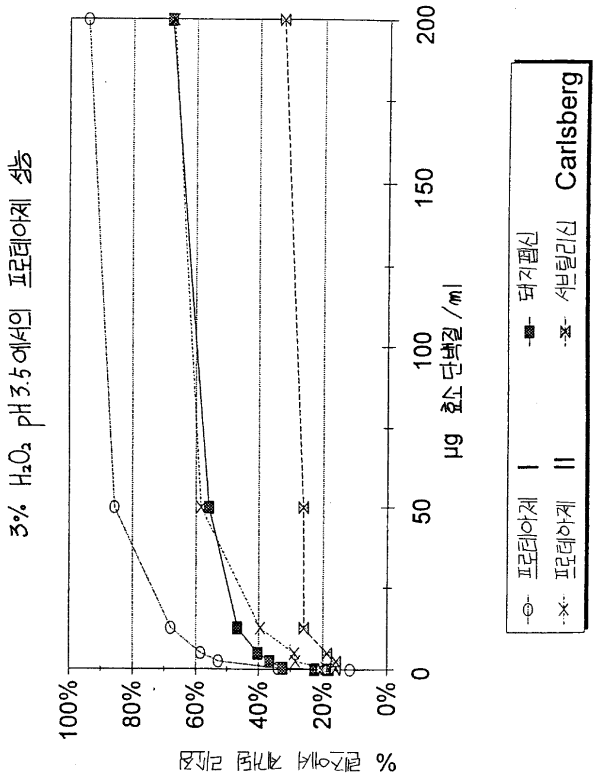
도면 5



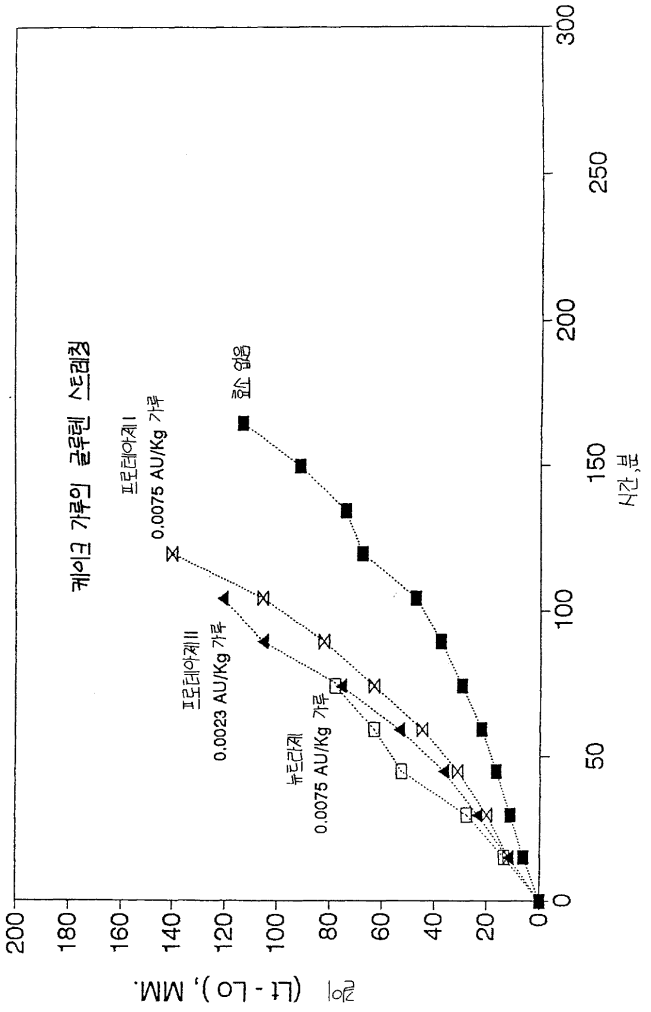
도면 6


온도 - 안정성 프로테아제 II
25 °C
40 °C
50 °C
60 °C
% 활성
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
pH 5.5 에서의 분

도면 7


3% H_2O_2 pH 3.5에서의 프로테아제 성능
% 현장에서 제거된 리소정
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
μg 효소 단백질 /ml
프로테아제 I
프로테아제 II
돼지펩신
서브틸리신 Carlsberg

도면 8



<110> NOVO NORDISK A/S <120> AN ENZYME WITH PROTEASE ACTIVITY <130&gt
; 1 <150> 0811/93 <151> 1993-07-06 <160> 2 <170> KopatentIn 1.7
1 <210> 1 <211> 1124 <212> DNA <213> Aspergillus aculeatus <400
> 1 aattaagcat cctccatctt caaagctcaa tctcgctaac tcccgctctt ctctcgatct 60
catcatccca ataactcgga
cacaatgaag acctctgctc tcttgaccgc tggcctgttg 120 gccaccgctg ctattgctgc tcctctcacc
gagaagcgcg cagctg
ctcg cgctgccaag 180 cgtggcacca gccgcaagag caacccccct ctcaagcccg gcaccagcga
ggccatcaac 240
ctgaccggct ccaagaacac cgagtactcg tccaactggg ccggcgccgt gctcatcggc 300 accggctaca
ctgccgtcac cgccg

agttc accattccca ccccctctct cccctccggt 360 gcctccagcc gcgagcagta ctgtgcctcc gcctgggtcg gtatcgacgg
tgacacctgc 420 gacaccgcca tcctgcagac cggtctcgac ttctgtatcg agggcagcac cgttagctac 480 gacgcct
ggt acgagtggta ccccgactat gcctacgact tcagcggcat cagcttctcc 540 gccggcgacg ttgtcaaggt caccgtcgac gc
caccagca agaccgccgg taccgccacc 600 gtcgagaacg tcaccaaggg caccaccgtc acccacacct tcagcggtgg tgttga
tggt 660 gatctctgcg agtacaacgc cgagtggatc gtcgaggact tcgaggagaa ctcctccctc 720 gtccccttcg ccg
acttcgg caccgtcacc ttctccagcg cctacgccac caagagcggc 780 tccaccgttg gtccctccgg cgccaccatc atcgacatc
g agcagaacaa caaggttctc 840 acctccgtct cgacctccag cagctccgtc accgtcgagt atgtttgaag gggactcctg
900 gggatgtgaa gcgagaatgc ggcttgggtg gttggaggtc ctttgggacg tcgaacgcct 960 aggattcaac gggatgagat c
attggaaat gaagacgaga atgagcgaat actgtcactg 1020 attgagattg tgctttgttg attgtgttag gggcttgcct ctgaaaat
tg agcttagtgt 1080 tgctgcaata tgattgctgt ggttgagaaa aaaaaaaaaa aaaa 1124 <210&
gt; 2 <211> 1425 <212> DNA <213> Aspergillus aculeatus <400> 2 ct
gcttctcc ttctcttcct cctcgtgata tctgcttgaa catctcctca tcatggtcgt 60 cctcaacaag gctgcagccc ttcttctggg
tctgaccacc gccgccactg cggctcccct 120 ggccgagaag caggcttctg tcccggtcaa gaacttctcc gtcaagcagg tcgag
aagga 180 gggcagcaag ggacgtaccg ttaacctgcc gggtctgtat gcgaatgcgc tggccaagta 240 tggcgcccag
gtgccggcca gcgtcaaggc cgccgccgtc agtggcagcg tcgtgaccac 300 cccgcaggcc aacgacgtct cctacctgac cccc
gtcacc gtgggcagct cgaccttgaa 360 cctggacttc gacaccggat ccgccgatct ctgggtcttc tcctcggagc tggccgcctc
420 ctcgcgcacc ggccacagca tctacacccc cggcagcacc gcccagaagc tgtccggcta 480 cagctggagc atctcctacg
gcgacggcag ctccgccagc ggcgacgtct acaaggacaa 540 ggtcaccgtc ggcacggtga cggccagcag ccaggccgtc gag
gccgcca gccgcatcag 600 ctccgagttc gtccaggaca ccgacaccga cggtctgttg ggtctggcct tcagctcgat 660
caacacggtc tccccccggg cccagaccac cttcttcgac accgtcaagt ccagcctgga 720 cagccccctc ttcgccgtcg acctg
aagta ccacgccgcc ggtacctacg atttcgggtt 780 catcgactcc tccaagtaca ccggctccct gacctacgcc aacgtcgacg
actcccaggg 840 cttctggcaa ttcaccgcca gcggctacag cgtgggctcg gcctcccact cctcctcttt 900 ctccgcca
tt gatgacaccg gcaccaccct catcctcctc gacgactcca tcgtctccac 960 ctactacaag agcgtcagcg gcgcctccta cag
ctacaac tacggcggct acgtcttctc 1020 ctgctccgcc agcctgtcca acttcagcgt caagatcggc tcctacaccg ccgtcgtcc
c 1080 cggcaagtac atcaactacg cccccatctc caccggcagc tccacctgct acggcggcat 1140 ccagtccaac gagg
gcctcg gtctgtccat cctgggtgat gtcttcctca agagccagca 1200 cgtggtcttt gactcgcagg gtccgagaat cgggttcgcc

gcgcaggcct agatcgtttg 1260 attggggttg tggatgtggg tgatgcttgg tggtggtctg agtcgtggtc tatgtgggcg 13
20 tgaatatagt actgtatata gtactgtaca taggggggtg gtgaacatat ggtctggtcg 1380
atgaatatat gtctttgatg ttatg
cttct gtggaaaaaa aaaaa 1425