

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(21) 출원번호	10-1999-7003986	(65) 공개번호	10-2000-0053071
(22) 출원일자	1999년05월04일	(43) 공개일자	2000년08월25일
번역문 제출일자	1999년05월04일		
(86) 국제출원번호	PCT/DK1997/000500	(87) 국제공개번호	WO 1998/20116
국제출원일자	1997년11월04일	국제공개일자	1998년05월14일

AP ARIPO특허 : 가나, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

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

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 1235/96 1996년11월04일 덴마크(DK)  
1240/96 1996년11월05일 덴마크(DK)  
0284/97 1997년03월14일 덴마크(DK)

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

(72) 발명자 폰데어오스텐클라우스  
덴마크디케이-2880박스바에르트노보알레노보노르디스크에이/에스

할키에르토르벤  
덴마크디케이-3460비어케뢰트헤스트코브베이110

안데르센카르스텐  
덴마크디케이-2880박스바에르트노보알레노보노르디스크에이/에스

바우딩츠페테르

덴마크디케이-2880박스바에르트노보알레노보노르디스크에이/에스

한젠페테르캄프

덴마크디케이-2880박스바에르트노보알레노보노르디스크에이/에스

(74) 대리인

장용식  
박종혁  
정진상

심사관 : 조영균

## (54) 섭틸라제 변종과 조성물

### 요약

다수의 섭틸라제의 유전자를 돌연변이시키고 적당한 숙주에서 돌연변이된 유전자를 발현시킴으로써 생산된 효소를 제공한다. 이 효소는 이들의 야생형 부모 효소와 비교하여 향상된 자가단백분해적 안정성을 보인다.

### 색인어

섭틸라제, BLS309, 자가단백분해, 세제, 자가분해, BASBPN, 효소변종, 세제성능

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 세제에서 향상된 세정 성능을 보이며 세제조성물로 제형화되기에 유용한 새로운 돌연변이 프로테아제 효소 또는 효소 변종; 상기 효소를 포함하는 세정 및 세제조성물; 적당한 숙주세포 또는 생물에 삽입되었을 때, 상기 효소의 발현을 위한 돌연변이된 유전자 암호화; 그리고 함께 형질전환되고 상기 효소 변종의 발현이 가능한 숙주세포에 관련된다.

#### 배경기술

세제 공업에서, 효소는 30년 이상 세척 제형에 있어서의 도구가 되어 오고 있다. 그러한 제형에 사용되는 효소는 다른 효소는 물론이고 프로테아제, 리파아제, 아밀라아제, 셀룰라아제, 또는 이들의 혼합물로 이루어진다. 상업적으로 가장 중요한 효소는 프로테아제이다.

프로테아제가 세제공업에서 30년이상 사용되어 오고 있지만, 이들 효소가 기질 및/또는 예를 들어 세제 조성물에 존재하는 다른 물질과 어떻게 작용하는지에 관한 상세한 사실은 많이 알려져 있지 않다. 프로테아제의 특정 잔기와 일반적으로 산화 및 열안정성과 같은 프로테아제의 어떤 성질에 영향을 미치는 특정 잔기에 관련된 몇몇 요인이 밝혀졌지만, 알아내지 못한 것이 많이 남아 있다. 또한, 특정 세제 조성물에서 프로테아제의 안정성 또는 양호한 세정 성능에 영향을 미치는 물리적 또는 화학적 특성은 여전히 정확하게 알려져 있지 않다.

요즘 사용되는 프로테아제는 대부분 천연에서 프로테아제를 분리하여, 이들을 세제 제형에 시험함으로써 찾아낸 것이다.

현재, 적어도 다음의 프로테아제가 상업적으로 유용한 것으로 알려져 있고, 이들의 다수가 세계 많은 나라에서 다양으로 시판되고 있다.

섭틸리신 BPN' 또는 Novo(예를 들면, 미국 세인트 루이스, SIGMA로부터 사용가능함), 그리고 섭틸리신 Carlsberg, ALCALASE<sup>R</sup> (NOVO NORDISK A/S) 및 MAXATASE<sup>R</sup> (Genencor).

SAVINASE<sup>R</sup>로 NOVO NORDISK A/S에 의해 시판되는 *Bacillus lenthutus* 섭틸리신, 섭틸리신 309. 이 효소의 단백질 공학적 변종은 DURAZYM<sup>R</sup>으로 시판된다.

섭틸리신 PB92와 같이 SAVINASE<sup>R</sup>와 밀접하게 유사한 효소, Genencor Inc.에 의해 시판되는 MAXACAL<sup>R</sup>(이 효소의 단백질 공학적 변종은 MAXAPEM<sup>R</sup>으로 시판된다), SOLVAY et Cie에 의해 시판되는 OPTICLEAN<sup>R</sup> 그리고 GENENCOR International에 의해 시판되는 PURAFECT<sup>R</sup>.

ESPERASE<sup>R</sup>로서 NOVO NORDISK A/S에 의해 시판되는 *Bacillus lenthutus* 섭틸리신, 섭틸리신 147;

증대되는 상업적으로 사용되는 프로테아제는 자연적으로 발생되는 야생형 프로테아제의 단백질 공학적 변종, 예를 들어, DURAZYM<sup>R</sup> (NOVO NORDISK A/S), RELEASE<sup>R</sup> (NOVO NORDISK A/S), MAXAPEM<sup>R</sup>(Gist-Brocades N.V.), PURAFECT<sup>R</sup>(Genencor International, Inc.)이다.

그러므로, 본 발명의 목적은 특히, 세제 공업에 사용되는 향상된 단백질 공학적 프로테아제 변종을 제공하는 것이다.

#### 프로테아제

단백질 기질에서 아미드 결합을 끊는 효소가 프로테아제 또는 (상호 교환적으로) 펩티다제로 분류된다(Walsh, 1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, Chapter 3). *Bacillus* 균주의 박테리아는 프로테아제의 두가지 세포의 형태, 중성 프로테아제(또는 메탈로프로테아제), 그리고 알카리성 프로테아제를 분비하고, 이중 기능적으로 가장 중요한 것은 세린 엔도펩티다제이고 일반적으로 섭틸리신으로 언급되었다.

#### 세린 프로테아제

세린 프로테아제는 펩티드 결합의 가수분해를 촉매하는 효소인데, 그것의 활성부위에 필수적인 세린잔기가 있다(White, Handler and Smith, 1973 "Principles of Biochemistry", Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271-272).

박테리아의 세린 프로테아제는 20,000 내지 45,000 Daltons의 범위의 분자량을 가진다. 이들은 디이소프로필플루오로포스페이트에 의해 저해된다. 이들은 간단한 말단 에스테르를 가수분해하고, 진핵생물의 키모트립신, 또한 세린 프로테아제와 활성면에서 유사하다. 더 협의의 용어로 하위군을 포함하는, 알카리성 프로테아제가 몇몇 세린 프로테아제의 높은 최적 pH, pH 9.0에서부터 pH 11.0까지를 반영한다(회고을 위해서 Priest (1977) *Bacteriological Rev.* **41** 711-753를 보라).

#### 섭틸라제

섭틸라제로 임시로 불리는 세린프로테아제의 하위군은 Siezen *et al.*, *Protein Engng.* **4** (1991) 719-737에 의해 제안되어졌다. 이들은 이전에 섭틸리신-유사 프로테아제로 불린 세린 프로테아제의 40개 이상의 아미노산 서열의 상동분석에 의해 규정된다. 섭틸리신은 앞서 그림 양성 박테리아 또는 진균에 의해 생산된 세린프로테아제로서 정의되었고, Siezen *et al.*에 따라서 현재는 섭틸라제의 하위군이다. 광범위하게 다양한 종류의 섭틸라제가 발견되었고 많은 섭틸라제의 아미노산 배열이 결정되었다. 이들은 *Bacillus* 균주로부터의 여섯 이상의 섭틸리신, 즉, 섭틸리신 168, 섭틸리신 BPN', 섭틸리신 Carlsberg, 섭틸리신 Y, 섭틸리신 amylosacchariticus 그리고 mesenteropeptidase (Kurihara *et al.* (1972) *J. Biol. Chem.* **247** 5629-5631; Wells *et al.* (1983) *Nucleic Acids Res.* **11** 7911-7925; Stahl and Ferrari (1984) *J. Bacteriol.* **159** 811-819, Jacobs *et al.* (1985) *Nucl. Acids Res.* **13** 8913-8926; Nedkov *et al.* (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366** 421-430, Svendsen *et al.* (1986) *FEBS Lett.* **196** 228-232), actinomycetales로부터의 하나의 섭틸리신, *Thermoactinomyces vulgaris*로부터의 thermitase(Meloun *et al.* (1985) *FEBS Lett.* **198** 195-200), 그리고 하나의 진균 섭틸리신, *Tritirachium album*으로부터의 프로테이나제 K (Jany and Mayer (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366** 584-492)를 포함한다. 더 이상의 참고자료는 Siezen 등으로부터 아래의 표 1에 제시된다.

펩틸리신은 물리적으로 그리고 화학적으로 잘 특성화되었다. 이들 효소의 일차 구조(아미노산 배열)의 정보에 더하여, 펩틸리신의 50 이상의 고해상도 엑스선구조가 결정되어졌는데, 이것은 기질의 결합, 전이 상태, 생성물, 적어도 세가지의 다른 프로테아제 저해제를 설명하고, 자연 변종의 구조적 결과를 정의한다(Kraut (1977) *Ann. Rev. Biochem.* **46** 331-358).

펩틸라제의 한 하위군, I-S1은 펩틸리신 168, 펩틸리신 BPN', 펩틸리신 Carlsberg(ALCALASE<sup>R</sup>, NOVO NORDISK A/S) 및 펩틸리신 DY와 같은 "고전적인" 펩틸리신으로 이루어진다.

펩틸라제 I-S2의 더 하위군은 Siezen *et al.*(상기)로 확인된다. 하위군 I-S2 프로테아제는 매우 알카리성인 펩틸리신으로 설명되고 펩틸리신 PB92 (MAXACAL<sup>R</sup>, Gist-Brocades NV), 펩틸리신 309 (SAVINASE<sup>R</sup>, NOVO NORDISK A/S), 펩틸리신 147(ESPERASE<sup>R</sup>, NOVO NORDISK A/S) 및 알카리성 엘라스타제 YaB와 같은 효소로 이루어진다.

펩틸라제 유전자의 임의의 및 부위 지향적 돌연변이는 효소의 물리적 그리고 화학적 성질의 정보에서 기인하고, 펩틸라제의 촉매 활성, 기질 특이성, 3차 구조 등에 관계된 정보를 준다(Wells *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 1219-1223; Wells *et al.* (1986) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* **317** 415-423; Hwang and Warshel (1987) *Biochem.* **26** 2669-2673; Rao *et al.*, (1987) *Nature* **328** 551-554).

이 분야를 포괄하는 더 최근의 출판물은 기질에서 특정 목적 부위(위치 24 및 64)를 끊는 변종의 설계에 관련된 Carter *et al.* (1989) *Proteins* **6** 240-248; 수많은 앞서 발표된 결과를 논의하는 Graycar *et al.* (1992) *Annals of the New York Academy of Sciences* **672** 71-79; 그리고 또한 앞서의 결과를 개관하는 Takagi (1993) *Int. J. Biochem.* **25** 307-312가 있다.

펩틸리신 유전자의 특히 부위-지향적 돌연변이 유발이 많은 관심을 끄는데, 다양한 돌연변이가 다음의 특허 출원 및 특허에 설명되어 있다.

#### 앞서 특성화된 프로테아제 변종

수많은 참고자료가 프로테아제 변종의 구성을 설명한다. 전체적인 이전의 배경기술을 더 쉽게 개관하기 위해, 참고자료는 두 절에서 정리된다.

제 1 절은 현재 본 발명에 개시된 변종과 관련되지 않는 것으로 생각되는 기술적인 배경과 프로테아제 변종의 확인을 설명하는 참고자료를 다룬다. 이들 참고자료는 주로 다른 목적의 프로테아제 변종을 구성하는 영역 내에서 최신기술을 요약하기 위해 포함된다.

제 2 절은 본 발명의 변종과 약간의 관련을 가진다고 생각되는 프로테아제 변종의 확인을 설명하는 참고자료를 다룬다.

#### 최신기술을 요약하는 참고자료 (제 1절)

"카르보닐 히드로라제"에서 부위 지향적 또는 임의로 생성된 돌연변이와 이어서 돌연변이된 효소의 여러가지 성질, 예를 들면, kcat/km비율, pH-활성도 프로파일, 산화안정성의 스크리닝과 관련된 EP 130756 (GENENTECH)(미국 재발행 특허 번호 34,606 (GENENCOR)). 이 공보는 변화된 성질을 보이는 효소를 제공하기 위하여, 어떤 특정 위치, 즉, <sup>-1</sup>Tyr, <sup>32</sup>Asp, <sup>155</sup>Asn, <sup>104</sup>Tyr, <sup>222</sup>Met, <sup>166</sup>Gly, <sup>64</sup>His, <sup>169</sup>Gly, <sup>189</sup>Phe, <sup>33</sup>Ser, <sup>221</sup>Ser, <sup>217</sup>Tyr, <sup>156</sup>Glu 또는 <sup>152</sup>Ala에서 펩틸리신 BPN'의 부위 특이적 돌연변이를 청구한다. 위치 -1을 제외하고 이들 위치 모두는 그 출원의 신청 전에 효소의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있었기 때문에, 이 출원은 특정한 원하는 성질을 가진 효소를 얻기 위해 돌연변이를 어디에 도입하는지를 결정하는 문제를 푸는 데 공헌하지 않는다.

펩틸리신 Carlsberg와 이들의 두 돌연변이의 클로닝과 발현에 관련된 EP 214435 (HENKEL). 이 출원에서는 <sup>158</sup>Asp을 <sup>158</sup>Ser로, 그리고 <sup>161</sup>Ser을 <sup>161</sup>Asp로 돌연변이시키는 이유가 제시되어 있지 않다.

WO 87/04461 (AMGEN)에서, 향상된 pH 및 열 안정성을 보이는 돌연변이된 효소를 얻기 위해서, 본 효소에 있는 Asn-Gly 서열의 수를 감소시키는 것을 제안한다. 이 출원에서는 섭틸리신 BPN'에서의 <sup>109</sup>Asn과 <sup>218</sup>Asn 잔기를 제거하고, 돌연변이시키고, 변형시키는 것을 강조한다. Gly-잔기를 제거하거나 변형시키는 어떤 예시도 제시하지 않는다.

WO 87/05050 (GENEX)는 향상된 성질을 위한 수많은 섭틸리신 BPN'의 변종의 임의 돌연변이와 그 다음의 스크리닝을 개시한다. 이 출원에서 위치 <sup>218</sup>Asn, <sup>131</sup>Gly, <sup>254</sup>Thr, <sup>166</sup>Gly, <sup>116</sup>Ala, <sup>188</sup>Ser, <sup>126</sup>Leu, 및 <sup>53</sup>Ser에서의 돌연변이를 설명한다.

EP 260105 (GENENCOR)는 촉매적 트리아드에서 약 15 Å 내의 아미노산 잔기를 선택하고 선택된 아미노산 잔기를 다른 잔기로 대체함으로써 촉매 트리아드를 포함하는 효소에서의 어떤 성질의 변화를 설명한다. 본 명세서에 설명된 섭틸라제 형태의 효소는 촉매적 트리아드를 포함하는 효소의 종류에 속하는 것으로 특별히 상기다. 섭틸라제에서 위치 222와 217이 대체에 바람직한 것으로 나타낸다.

또한, 섭틸리신 BPN'에서 <sup>99</sup>Asp를 <sup>99</sup>Ser으로의 교체가 효소의 pH 의존성을 변화시킨다는 것이 Thomas, Russell, and Fersht (1985) *Nature* **318** 375-376에 나와 있다.

그 후의 문헌 (1987) *J. Mol. Biol.* **193** 803-813에서, 같은 저자는 또한 <sup>156</sup>Glu 대신 <sup>156</sup>Ser의 치환을 논의한다.

이들 두 돌연변이는 활성의 <sup>64</sup>His로부터 약 15 Å의 거리 내에 있다.

*Nature* **328** 496-500 (1987)에서 Russel and Fersht는 표면 전위를 변화시키기 위해, 효소를 돌연변이시킴으로써 pH-활성도 프로파일을 변화시키는 현재의 규칙과 그들의 실험의 결과를 논의한다.

WO 88/08028 (Genex)와 WO 88/08033 (Amgen) 둘다는 섭틸리신 BPN'의 칼슘 결합 위치에서 아미노산 잔기의 변형과 관련된다. 이 효소의 원래 잔기를 더 음으로 하전된 잔기로 치환하여 안정화되는 것을 상기다.

WO 95/27049 (SOLVAY S.A.)는 다음의 돌연변이를 가지는 섭틸리신 309 형태 프로테아제를 설명한다: N43R+ N116R+ N117R (BPN'번호매기기). 데이터는 상응하는 변종이 야생형과 비교하여 향상된 안정성을 가지는 것으로 나타낸다.

WO 95/30011, WO 95/30010, 및 WO 95/29979 (PROCTER & GAMBLE COMPANY)는 섭틸리신 BPN'와 섭틸리신 309 둘다에서 6개의 부위, 특히 199-220 (BPN'번호매기기)를 나타내는데, 이것은 효소의 표면-부착 오물에의 흡착을 변화시키는 것으로 계획된다. 이것은 효소의 기질에 대한 감소된 흡착이 더 나은 세제 세척 성능을 초래하는 것을 제안한다. 어떤 변종 또는 특정 세제 세정 성능에 관한 어떤 자료도 제공되지 않는다.

#### 본 발명과 약간의 관련을 가지는 앞서의 특성화된 프로테아제 변종 (제 2 절)

EP 251 446 (GENENCOR)에서는 보존적이든 그렇지 않든, 동등한 아미노산 잔기를 확인하는 데 1차와 3차 구조 둘다의 수준에서 어떻게 동일성 고려를 적용할 수 있는가를 설명한다. 섭틸리신 BPN'의 3차 구조에 대한 발명자의 지식과 함께 이 정보가, 발명자가 변화된 성질을 가진 변종을 얻기 위한 기대로 돌연변이되기 쉬운 수많은 위치를 선택하도록 한다는 것을 청구한다. 그래서 이 위치가 확인된다: <sup>124</sup>Met, <sup>222</sup>Met, <sup>104</sup>Tyr, <sup>152</sup>Ala, <sup>156</sup>Glu, <sup>166</sup>Gly, <sup>169</sup>Gly, <sup>189</sup>Phe, <sup>217</sup>Tyr. 또한 <sup>155</sup>Asn, <sup>21</sup>Tyr, <sup>22</sup>Thr, <sup>24</sup>Ser, <sup>32</sup>Asp, <sup>33</sup>Ser, <sup>36</sup>Asp, <sup>46</sup>Gly, <sup>48</sup>Ala, <sup>49</sup>Ser, <sup>50</sup>Met, <sup>77</sup>Asn, <sup>87</sup>Ser, <sup>94</sup>Lys, <sup>95</sup>Val, <sup>96</sup>Leu, <sup>107</sup>Ile, <sup>110</sup>Gly, <sup>170</sup>Lys, <sup>171</sup>Tyr, <sup>172</sup>Pro, <sup>197</sup>Asp, <sup>199</sup>Met, <sup>204</sup>Ser, <sup>213</sup>Lys, 및 <sup>221</sup>Ser, 이들 위치는 효소의 다양한 성질에 영향을 미칠 것으로 확인된다. 또한 수많은 돌연변이가 이들 제안을 지지하기 위하여 예시된다. 이들 위치에서의 단일 돌연변이와 함께, 이 발명자들은 또한 다양한 복수의 돌연변이를 수행하였다. 게다가 발명자들은 <sup>215</sup>Gly, <sup>67</sup>His, <sup>126</sup>Leu, <sup>135</sup>Leu과 관심이 있는 것으로 절편 97-103, 126-129, 213-215, 및 152-172 내의 아미노산을 확인한다. 그러나 이들 위치의 어느 것에서의 돌연변이도 예시하지 않는다.

본 발명의 목적에서 특히 관심이 있는 것으로 EP 251 446의 발명자들은 <sup>170</sup>Lys(설탕리신 BPN'에서, I-S1 형태)를 치환하는 것을 제안하는 데, 특히 이들은 원래의 Lys에 Glu 또는 Arg를 도입하는 것을 제안한다. 이 출원은 Glu 변종을 생산하였고 Glu 변종이 자기 분해성 분해에 매우 감수성이 있는 것을 밝혀낸 사실을 나타낸다(cf. 48, 121, 123 페이지(표 XXI는 명백한 오류를 포함하지만, 자기 분해 반감기가 86분에서 13분으로 감소한 것을 제시한다) 및 도 32).

WO 89/06279 (NOVO NORDISK A/S)에서는 위치 170이 흥미있는 것으로 제시하고 그 위치에 존재하는 잔기를 Tyr으로 대체하는 것을 제안한다. 그러나, 그러한 변종에 관해서는 어떤 데이터도 주어지지는 않는다. WO 91/00345(NONO NORDISK A/S)에서도, 같은 제안이 있는데, 이 출원은 설탕리신 309 (I-S2 형태)의 위치 170의 Tyr 변종이 약 pH 8에서 세제에서의 향상된 세정 성능을 보인다는 사실을 나타낸다(표 III, IV, V, VI, VIII, X에서 변종 S003). 다른 위치에서의 다른 치환과 조합하여 동일한 치환이 또한 상기 출원의 일반적인 개념에 따라 모두 향상된 세정 성능은 나타낸다(동일한 표와 표 VII에서 S004, S011-S014, S022-S024, S019, S020, S203, S225, S227).

EP 525 610 A1 (SOLVAY)에서는, 효소의 어떤 표면 부위에 소수성을 감소시킴으로써 이온 텐시드에 대한 효소(설탕리신 PB92와 밀접하게 관련된 설탕라제 I-S2 형태)의 안정성이 향상된 것을 제안한다. 이것은 위치 164(BPN' 번호매기기)를 사용하면 170)에서 Arg를 Glu로 치환하는 것을 제시한다. 이 치환으로 이루어지는 어떤 변종도 그 출원에 개시되어 있지 않다.

WO 94/02618 (GIST-BROCADES N.V.)에서는 설탕리신 PB92의 I-S2 형태의 위치 164(BPN' 번호매기기를 사용하면 170)에서 수많은 변종이 설명된다. 원래의 Arg를 Met, Val, Tyr 그리고 Ile로 치환한 것을 보여주는 예시가 제공된다. 변종의 분말세제에서 세정 성능시험은 약간의 향상을 나타낸다. 특히 카카오 상에서 Ile 변종의 세정 성능 시험은 약 20-30%의 향상을 나타낸다. 어떤 안정성 데이터도 제공되지 않는다.

PCT/DK96/00207 (아직 공보되지 않았음)에서, 향상된 세정 성능 및/또는 저장 안정성을 가지는 수많은 프로테아제 변종이 설명된다.

이것은 향상된 세정 성능을 가지는 설탕라제 변종을 부모 설탕라제의 소수성 부위의 근처 또는 그곳에 위치한 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 원래의 잔기보다 더 소수성인 아미노산 잔기로 치환함으로써 얻을 수 있다는 사실을 밝히는데, 상기 소수성 부위는 BLS309의 잔기 I165, Y167, Y171(BASBPN 번호매기기에서)에 상응하는 잔기로 이루어지고, 이들의 부위에 있는 상기 잔기는 BLS309의 잔기 E136, G159, S164, R170, A194 및 G195(BASBPN 번호매기기로)에 상응하는 잔기로 이루어진다(PCT/DK96/00207).

US 5.543.302는 다른 야생형 프로테아제에서 중요한 자가단백분해적 절단 부위의 확인을 설명한다(MILEZYME<sup>R</sup>, SAVINASE<sup>R</sup> 및 ESPERASE<sup>R</sup>).

본 발명은 우리의 미결정의 특허 출원 PCT/DK96/00207에서 설명된 일군의 프로테아제 변종에서 자가단백분해적 절단 부위의 위치에 영향을 미치는 특정 프로테아제 변종에 초점을 맞춘다. 본 발명의 변종은 US 5.543.302에서의 상응하는 야생형 프로테아제에서 나타난 자가단백분해적 분해 패턴에 비하여 변화된 자가단백분해적 분해 패턴을 나타내는 것이 의외로 밝혀졌다.

### 본 발명의 요약

BLS309의 잔기 P129, P131, E136, G159, S164, I165, Y167, R170, Y171(BASBPN 번호매기기에서)에 상응하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기에서의 변형을 가지는 설탕라제 변종이 상응하는 야생형과 비교하여 변화된 자가단백분해적 분해 패턴을 가지는 것이 현재 놀랍게도 밝혀졌다. 첫번째 변화는 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기에서) 사이에 명백하게 위치한 자가분해성 절단 부위이다.

SAVINASE<sup>R</sup>는 폭넓은 기질 특이성을 가지는 것으로 알려져 있고, 광범위한 배양에서, 수많은 부위에서 그 자신을 자기 분해할 것이다. 그러나 초기 1-5 절단 위치(초기 위치)가 설탕라제 프로테아제의 공업적 응용에 가장 높은 상관성이 있다.

잔기 132-133 사이에 위치한 상기 자가분해성 절단 위치는 현재 새로운 초기 자가단백분해적 절단 위치인 것으로 믿어진다. 이것은 현재, 처음으로 섭틸라제 프로테아제 효소에서 초기 자가단백분해적 절단 위치로 이 자가단백분해적 절단 위치가 확인된 것으로 믿어진다. 더 자세한 내용을 위해, 참고자료가 여기의 작업실시예로 제시된다(아래를 보라).

결과적으로 본 발명의 첫번째 측면에서, 본 발명은 잔기 132와 133(BASBPN 번호매기기에서) 사이에 자가단백분해적 분열 위치를 가지는 전구체 섭틸라제 효소로부터 유도됨으로써 특징되는 섭틸라제 효소 변종에 관련된다. 이것은 나아가, BLS309의 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136에 해당하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 잔기에서/내 치환, 삽입, 결실에 의해 변형되어진다; 그것에 의하여 상기 변종은 상기 전구체 섭틸라제 효소에 비하여 향상된 자가단백분해적 안정성을 보인다.

두 번째 측면에서, 본 발명은 BLS309의 잔기 G159, S164, I165, Y167, R170, Y171(BASBPN 번호매기기에서)에 해당하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기에서 변형을 가지는 전구체 섭틸라제 효소 변종으로부터 유도됨으로써 특징되는 섭틸라제 효소 변종에 관련된다. 이것은 나아가, 잔기 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136(BASBPN 번호매기기에서)에 해당하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 잔기에서/내 치환, 삽입, 결실에 의해 변형되어진다; 그것에 의하여 상기 변종은 상기 위치 129-136의 어느 곳에서도 변형이 일어나지 않은 전구체 섭틸라제 효소에 비하여 향상된 자가단백분해적 안정성을 보인다.

US 5.543.302는 SAVINASE<sup>R</sup>가 잔기 192-193(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 자가단백분해적 절단 위치를 가지는 것을 교시하고 증가된 자가단백분해적 안정성을 가지는 변종을 얻기 위하여 이 위치(잔기 180-210 사이) 주위의 광범위한 부위에서 변형시키는 것을 제안한다.

본 발명자들은 BLS309의 잔기 P129, P131, E136, G159, S164, I165, Y167, R170, Y171(BASBPN 번호매기기로)에 상응하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기에서의 변형을 가지는 SAVINASE<sup>R</sup>와 SAVINASE<sup>R</sup> 변종 둘다에서 잔기 192-193(BASBPN 번호매기기로) 사이의 이 자가단백분해적 위치를 확신하였다. 본 발명자들은 S190P 및 G193A(BASBPN 번호매기기로)와 같이 잔기 192-193(BASBPN 번호매기기로) 사이의 자가단백분해적 위치의 근처에서, 특이적 변형(돌연변이)를 제안한다.

이러한 특이적 돌연변이는 US 5.543.302에서 논의되거나 제시되지 않는다. 거기서는 단지 더 광범위한 부위(잔기 180-210 사이)를 설명하고 증가된 자가단백분해 안정성을 초래하는 어떤 특이적 돌연변이를 US 5.5453.302에서는 개시하지 않는다.

더 자세한 내용을 위해 참고자료가 여기 작업 실시예로 제공된다(아래를 보라).

따라서. 세번째 측면에서 본 발명은 잔기 192와 193(BASBPN 번호매기기로) 사이에 자가단백분해적 분열 위치를 가지는 전구체 섭틸라제 효소로부터 유도됨으로써 특징되는 섭틸라제 효소 변종에 관련된다. 이것은 나아가, 잔기 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196(BASBPN 번호매기기로)에 해당하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 잔기에서/내 치환, 삽입, 결실에 의해 변형되어진다; 그것에 의하여 상기 변종은 상기 섭틸라제 효소 전구체에 비하여 증가된 자가단백분해 안정성을 보인다.

네 번째 측면에서, 본 발명은 BLS309의 잔기 P129, P131, E136, G159, S164, I165, Y167, R170, Y171(BASBPN 번호매기기로)에 해당하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 아미노산에서 변형을 가지는 전구체 섭틸라제 효소로부터 유도됨으로써 특징되는 섭틸라제 효소 변종에 관련된다. 이것은 나아가, BLS309의 잔기 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196(BASBPN 번호매기기로)에 해당하는 위치에 있는 하나 또는 그 이상의 잔기에서/내 치환, 삽입, 결실에 의해 변형되어진다; 그것에 의하여 상기 변종은 상기 위치 189-196의 어느 곳에서도 변형되지 않는 전구체 섭틸라제 효소에 비하여 증가된 자가단백분해 안정성을 보인다.

더 나아간 측면에서, 본 발명은 결과적으로 첫번째 측면의 섭틸리신 효소가 발현될 숙주 세포에 적당한 방법으로 삽입되었을 때, 본 발명의 효소를 발현할 수있는 DNA 구조물에 관련된다.

더 나아간 측면에서, 본 발명은 두 번째 측면에 따른 DNA 구조물을 적당한 숙주에 삽입하여, 원하는 섭틸라제 효소를 발현하기 위해 숙주를 배양하고, 효소 생성물을 회수함으로써 본 발명의 섭틸리신 효소를 생산하는 것과 관련된다.

본 발명은 부분적으로, 그러나 제한되지는 않고, 상기 제시한 대로, 섭틸라제 하위군 I-S2 효소와 그에 상응하는 효소 변종을 발현하는 유전자의 돌연변이에 관련된다.

본 발명에 포함되는 다른 섭틸라제 유전자 변종은 섭틸라제 하위군 I-S1, 예를 들면, 섭틸리신 BPN', 섭틸리신 Carlsberg 유전자와 같은 것이고, 결과로 따르는 변종 섭틸리신 BPN', 프로테이나제 K, 그리고 섭틸리신 Carlsberg 효소는 농축된 액체 세제에서 향상된 안정성을 보인다.

한층 더, 본 발명에 포함되는 섭틸라제 유전자 변종은 프로테이나제 K와 다른 유전자 같은 것이고, 결과로 따르는 변종 프로테이나제 K, 그리고 다른 섭틸라제 효소는 농축된 액체 세제에서 향상된 안정성을 보인다.

본 발명에 따라 변형될 수 있는 부모 섭틸라제 효소의 다른 예는 표 1에 목록된다.

게다가, 본 발명은 세정 조성물에서 돌연변이 효소의 사용과 돌연변이 효소를 포함하는 세정 조성물, 특히 돌연변이 섭틸리신 효소로 이루어지는 세제 조성물에 관련된다.

본 발명에 따라서, 이러한 세제 조성물은 리파아제, 셀룰라아제, 아밀라아제 등과 같은 다른 효소의 하나 또는 그 이상으로 더 이루어질 수 있다.

### 약어

#### 아미노산

A = Ala = 알라닌

V = Val = 밸린

L = Leu = 류신

I = Ile = 이소류신

P = Pro = 프롤린

F = Phe = 페닐알라닌

W = Trp = 트립토판

M = Met = 메티오닌

G = Gly = 글리신

S = Ser = 세린

T = Thr = 트레오닌

C = Cys = 시스테인

T = Tyr = 티로신

N = Asn = 아스파라진

Q = Gln = 글루타민

D = Asp = 아스파트산

E = Glu = 글루탐산

K = Lys = 리신

R = Arg = 아르기닌

H = His = 히스티딘

X = Xaa = 어떤 아미노산

### 핵산 염기

A = 아데닌

G = 구아닌

C = 시토신

T = 티민 (DNA에만 존재)

U = 우라실 (RNA에만 존재)

### 변종

본 발명에 따라서 생산된 또는 예상된 다양한 효소 변종을 설명하는데에, 다음의 명명법이 참고의 용이함으로 적용되어졌다.

원래 아미노산 위치 치환된 아미노산

이에 따라 위치 195에서 글리신을 글루탐산으로 치환한 것은

Gly 195 Glu 또는 G195E

로 표현되고, 같은 위치에서 글리신의 결실은

Gly195\* 또는 G195\*

이고, 리신과 같은 추가의 아미노산의 삽입은

Gly195GlyLys 또는 G195GK

이다. 여기서 번호매기기로 사용된 서열과 비교하여 결실은 표시되고, 그러한 위치에 삽입은

\*36Asp 또는 \*36D

로서 36번 위치에서 아스파트산의 삽입을 나타낸다.

복수의 돌연변이는 플러스 기호에 의해 분리된다. 즉:

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu 또는 R170Y+ G195E

는 아르기닌과 글리신이 각각 티로신과 글루탐산으로 치환되는 위치 170과 195에서의 돌연변이를 나타낸다.

위치

본 출원에서 그리고 첨가된 청구항에서, 변종을 설명함에 있어서, 사용은 Siezen et al., 상기에서의 다양한 섭틸라제의 정렬로 만들어진다. 섭틸라제와 관련된 다른 간행물에서의 다른 정열과 특정 효소의 번호매기기가 사용되었다. 여기에 사용된 번호매기기로 특정 잔기의 위치를 확인하는 것은 당업자에게는 일상적인 일이다. 참고자료는 또한 다수의 섭틸라제로부터 본 발명에 관련된 잔기의 정렬을 보여주는 도.1로 제시된다. 참고자료는 또한 다수의 섭틸라제로부터 본 발명에 관련된 잔기의 정렬을 보여주는 WO 91/00345의 표 1에 제시된다.

## [표 1]

현재 확립된 섭틸라제(상기 Siezen 등에서)

생물	cDNA,	효소	두문자
유전자			
<u>원핵생물</u>			
박테리아: 그람-양성			
<i>Bacillus subtilis</i> 168	apr A	subtilisin I168, apr ABSS168	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	apr	subtilisinBPN' (NOVO) BASBPN	
<i>Bacillus subtilis</i> DY	-	subtilisin DY BSSDY	
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	subtilisin Carlsberg BLSCAR	
<i>Bacillus lenthus</i>	+	subtilisin 147 BLS147	
<i>Bacillus alcalophilus</i> PB92	+	subtilisin PB92 BAPB92	
<i>Bacillus</i> sp. DSM 4828	-	alkaline protease BDSM48	
<i>Bacillus</i> YaB	ale	alkaline elastase YaB BYSYAB	
<i>Bacillus subtilis</i> 168	epr	min. extracell. prot. BSEPR	
<i>Bacillus subtilis</i>	bpf	bacillopeptidase F BSBPF	
<i>Bacillus subtilis</i> IFO3013	ispl	intracell.ser. prot.1 BSISP1	
<i>Bacillus subtilis</i> A50	-	intracell.ser. prot. BSIA50	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	extracell. ser. prot. BTFINI	
<i>Bacillus cereus</i>	-	extracell. ser. prot. BCESPR	
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	-	alkaline ser. prot. NDAPII	
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	-	thermitase TVTHER	
<i>Enterococcus faecalis</i>	cyla	cytolysin component A EFCYLA	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	epiP	epidermin lead. prot. SEEPPIP	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	scpa	C5a peptidase SPSCPA	
<i>Lactococcus lactis</i> SK11	prtP	SK11 cell wall prot. LLSK11	
박테리아: 그람-음성			
<i>Dichelobacter nodosus</i>	+	basic protease DNEBPR	
<i>Xanthomonas campestris</i>	+	extracellular prot. XCEXPR	
<i>Serratia marcescens</i>	+	extracell. ser. prot. SMEXSP	
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	pstI	aqualysin I TAAQUA	
<i>Thermus</i> rT41A	+	T41A protease TRT41A	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	proA	protease A VAPROA	
<i>Streptomyces rutgersensis</i>	-	proteinase D SRESPD	
고세균			
<i>halophilic</i> strain 172P1	-	halophil extra. prot. ARB172	
시아노박테리아			

## [표 1a]

<i>Anabaena variabilis</i>	prcA	Ca-dependent protease	AVPRCA
<u>하등 진핵생물</u>			
<u>진균</u>			
<i>Tritirachium album Limber</i>	+	proteinase K	TAPROK
<i>Tritirachium album</i>	+	proteinase R	TAPROR
<i>Tritirachium album</i>	prot	proteinase T	TAPROT
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	alkaline protease	AOALPR
<i>Malbranchea pulchella</i>	-	thermomycolin	MPTHMY
<i>Acremonium chrysogenum</i>	alp	alkaline protease	ACALPR
<u>효모</u>			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	kex1	Kex1 ser. proteinase	KLKEX1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kex2	Kex2 ser. proteinase	SCKEX2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	prb1	protease B	SCP RB1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	xpr2	alk.extracell. prot.	LXPR2
생물	cDNA,	효소      두문자      유전자	
<u>고등 진핵생물</u>			
<u>벌레</u>			
<i>Caenorhabditis elegans</i>	bli4	cuticle protease	CEBLI4
<u>곤충</u>			
<i>Drosophila</i> (fruit fly)	furl	furin 1	DMFUR1
<i>Drosophila</i> (fruit fly)	fur2	furin 2	DMFUR2
<u>식물</u>			
<i>Cucumis melo</i> (melon)	-	cucumisin	CMCUCU
<u>모유동물</u>			
Human (also rat, mouse)	fur	furin	HSFURI
Human (also mouse)	+	insulinoma PC2 prot.	HSIPC2
Mouse +		pituitary PC3 prot.	MMPPC3
Human +		tripeptidyl peptid.II	HSTPP

## 표 1에 사용된 참고자료

아미노산 서열에 대한 참고자료 (GenBank<sup>R</sup>/EMBL 데이터 뱅크 취득 번호가 팔호에 제시된다);

ARB172 Kamekura and Seno, (1990) *Biochem. Cell Biol.* **68** 352-359

(성숙한 프로테아제 잔기 1-35의 아미노산 서열; 잔기 I4는 결정안됨)

BSS168 Stahl. and Ferrari. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 411-418

(K01988). Yoshimoto, Oyama *et al.* (I488) *J. Biochem.*

103, 1060-1065 (*B.subtilis* var. *amylosacchariticus*로부터의 성숙한 셉틸리신은 T130S와 T162S를 가진다는 점에서 다르다). Svendsen, *et al.* (1986) *FEBS Lett.* **196**, 228-232 (PIR A23624; 아미노산 서열; *B.mesentericus*로부터의 성숙한 알카리성 메센테리코펩티다제는 S85A, A88S, S89A, S183A 및 N259S를 가진다는 점에서 다르다).

BASBPN Wells, *et al.* (1983) *Nucl.Acids Res.* **11** 7911-7925

(X00165). Vasantha *et al.*, (1984) *J. Bacteriol.* **159**

811-814(K02496).

BSSDY Nedkov *et al.* (1983) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**

1537-1540 (PIR A00969; 아미노산 서열화).

BLSCAR Jacobs *et al.* (1985) Nucleic Acids Res. 13 8913-8926

(X03341). Smith *et al.* (1968) J. Biol. Chem. 243

2184-2191 (PIR A00968; 아미노산 서열화; 성숙한 프로테아제 서열은 T103S, P129A, S158N, N161S 및 S212N을 가진다는 점에서 다르다)

BLS147 Hastrup *et al.* (1989) PCT Patent Appl. WO 8906279. Pub.

July 13 1989. (*B. lentus*로부터의 Esperase<sup>R</sup>). Takami *et*

*al.* (1990) Appl. Microbiol. Biotechnol., 33 519-523

(*Bacillus* sp. no. AH-101로부터의 성숙한 알카리성 프로테아제 잔기 1-20의 아미노산 서열화; 이 서열은 N11S를 가진다는 점에서 BLS147과 다르다).

BABP92 van der Laan *et al.* (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57

901-909. (Maxacal<sup>R</sup>). Hastrup *et al.* (1989) PCT Patent

Appl. WO 8906279. Pub. 13 Jul 1989. (*B. lentus*로부터의 세틸리신 309. Savinase<sup>R</sup>는 N87S을 가진다는 점에서만 다르다). Godette *et al.* (1991) Abstracts 5th Protein Society Symposium, June 6, Baltimore: abstract M8 (*B. lentus*로부터의 고-알카리성 프로테아제는 N87S, S99D, S101R, S103A, V104I and G159S를 가진다는 점에서 다르다).

BDSM48 Rettenmaier *et al.* (1990) PCT Patent Appl. WO 90/04022.

Publ. April 19, 1990.

BYSYAB Kaneko *et al.* (1989) J. Bacteriol. 171 5232-5236 (M28537).

BSEPR Sloma *et al.* (1988) J. Bacteriol. 170 5557-5563 (M22407).

Bruckner (1990) Mol. Gen. Genet. 221 486-490 (X53307).

BSBPF Sloma *et al.* (1990) J. Bacteriol. 172 1470-1477 (M29035);

corrected). Wu *et al.* (1990) J. Biol. Chem. 265 6845-6850

(JO5400; 이 서열은 구조이동으로 인하여 A169V와 586 보다 작은 C-말단 잔기를 가진다는 점에서 다르다).

BSISPI Koide *et al.* (1986) J. Bacteriol. 167 110-116 (M13760).

BSIA50 Strongin *et al.* (1978) J. Bacteriol. 133 1401-1411

(성숙한 프로테아제 잔기 1-54의 아미노산 서열화; 잔기 3, 39, 40, 45, 46, 49 및 50은 결정안됨).

BTINI Chestukhina *et al.* (1985) Biokhimiya 50 1724-1730 (*B. ringiensis* Variety *israeliensis*로부터의 성숙한 프로테아제 잔기 1-14와 변종 *finitimus*로부터의 성숙한 프로테아제 잔기 1-16과 223-243의 아미노산 서열화). Kunitate *et al.* (1989) Agric. Biol. Chem. 53 3251-3256 (변종 *kurstaki*. BTKURS로부터의 성숙한 프로테아제 잔기 6-20의 아미노산 서열화).

BCESPR Chestukhina *et al.* (1985) *Biokhimiya* **50** 1724–1730 (성숙한 잔기 1–16과 223–243의 아미노산 서열화).

NDAPII Tsujibo *et al.* (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54** 2177–2179

(성숙한 잔기 1–26의 아미노산 서열화).

TVTHER Meloun *et al.* (1985) *FEBS Lett.* **183** 195–200 (PIR A00973; 성숙한 프로테아제 잔기 1–274의 아미노산 서열화)

EFCYLA Segarra *et al.* (1991) *Infect. Immun.* **59** 1239–1246.

SEEPPIP Schnell *et al.* (1991) personal communication (Siezen *et al.*

(*supra*)).

SPSCPA Chen *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265** 3161–3167(JO5224)

DNEBPR Kortt *et al.* (1991) Abstracts 5th Protein Society Symposium,

June 22–26, Baltimore.abstract S76.

LLSK11 Vos *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264** 13579–13585(J04962). Kok

*et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54** 231–238 (M24767; 균주 Wg2로부터의 서열은 프로테아제 도메인에서 18 다른점을 포함하여 44 위치에서 다르고 잔기 1617–1676이 결실이 다르다). Kiwaki *et al.* (1989) *Mol. Microbiol.* **3** 359–369 (X14130; 균주 NCD0763은 프로테아제 도메인에서 22를 포함하여 46 위치에서 다르고 잔기 1617–1676이 결실이 다르다).

XCEXPR Liu *et al.* (1990) *Mol. Gen. Genet.* **220** 433–440.

SMEXSP Yanagida *et al.* (1986) *J. Bacteriol.* **166** 937–994(M13469).

TAAQUA Terada *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265** 6576–6581(J05414).

TRT41A McHale *et al.* (1990) Abstracts 5th Eur. Congr. Biotechn.

Christiansen, Munck and Villadsen (eds), Munksgaard Int.

Publishers, Copenhagen.

VAPROA Deane *et al.* (1989) *Gene* **76** 281–288 (M25499).

SRESPD Lavrenova *et al.* (1984) *Biochemistry USSR.* **49** 447–454(잔기 1–23의 아미노산 서열화; 잔기 13, 18 및 19는 결정안됨)

AVPRCA Maldener *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* **225** 113–120 (발표된 서열은 구조이동 리딩 오류로 인하여 잔기 200–210 주위의 28 불확실한 잔기 를 가진다).

TAPROK Gunkel and Gassen (1989) *Eur. J. Biochem.* **179** 185–194

(X14688/X14689). Jany *et al.* (1986) *J. Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367** 87 (PIR A24541; 아미노산 서열화; 성숙한 프로테아제는 S745G, SILST204–208DSL과 VNLL264–267FNL을 가진 점에서 다르다).

TAPROR Samal *et al.* (1990) *Mol. Microbiol.* **4** 1789–1792 (X56116).

TAPROT Samal *et al.* (1989) *Gene* **85** 329–333.

AOALPR Tatsumi *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* **219** 33–38. Cheevadhanarah *et al.* (1991) EMBL Data Library (X54726).

MPTHMY Gaucher and Stevenson (1976) *Methods Enzymol.* **45** 415–433(잔기 1–28의 아미노산 서열화와 활성부위 세린을 가진 헥사펩티드 LSGTSM ).

ACALPR Isogai *et al.* (1991) *Agric. Biol. Chem.* **55** 471–477. Stepanov *et al.* (1986) *Int. J. Biochem.* **18** 369–375 (잔기 1–27의 아미노산 서열화; 성숙한 프로테아제는 H13[1]Q, R13[2]N 및 S13[6]A를 가진 점에서 다르다).

KLKEX1 Tanguy-Rougeau, Wesolowski-Louvel and Fukuhara (1988) *FEBS Lett.* **234** 464–470 (X07038).

SCKEX2 Mizuno *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156** 246–254(M24201).

SCPRB1 Moehle *et al.* (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7** 4390–4399 (M18097).

YLXYPR2 Davidow *et al.* (1987) *J. Bacteriol.* **169** 4621–4629 (M17741). Matoba *et al.* (1988) *Mol. Cell Biol.* **8** 4904–4916 (M23353).

CEBL14 Peters and Rose (1991) *The Worm Breeder's Gazette* **11** 28.

DMFUR1 Roebroek *et al.* (1991) *FEBS Lett.* **289** 133–137 (X59384).

DMFUR2 Roebroek *et al.* (1992) **267** 17208–17215.

CMCUCU Kaneda *et al.* (1984) *J. Biochem.* **95** 825–829(활성부위 세린을 가진 옥타펩티드 NIISGTSM의 아미노산 서열화).

HSFURI van den Ouwehand *et al.* (1990) *Nucl. Acids Res.* **18** 664 (X04329)

(마우스 푸린의 서열은 촉매 도메인:A15E, Y21F, S223F, A232V 및 N258[2]D의 다섯을 포함하여 51 위치에서 다르다). Misumi *et al.* (1990) *Nucl. Acids Res.* **18** 6719 (X55660: 래트 푸린의 서열은 촉매 도메인:A15E, Y21F, H24R의 셋을 포함하여 49 위치에서 다르다)).

HSIPC2 Smeekens and Steiner (1990) *J. Biol. Chem.* **265** 2997–3000(J05252).

Seidah *et al.* (1990) *DNA Cell Biol.* **9** 415–424 (마우스 뇌하수체 PC2 프로테아제의 서열은 프로테아제 도메인 I4F, S42[2]Y, E45D, N76S, D133E, V134L 및 G239[1]D의 일곱을 포함하여 23 위치에서 다르다)

MMPPC3 Smeekens *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** 340–344

(M58507). Seidah *et al.* (1990) *DNA Cell Biol.* **9** 415–424 (M55668/

M55669; 부분적인 서열).

HSTPP Tomkinson and Jonsson (1991) *Biochemistry* **30** 168–174 (J05299).

## 정의

본 발명을 더 자세히 논의하기에 앞서, 다음의 용어가 먼저 정의되어야 할 것이다.

### "변화된 자가분해 안정성"

"변화된 자가분해 안정성" 또는 "변화하는 자가분해 안정성"의 용어는 자가분해 안정성이 원래의 프로테아제에 비해 증가되거나 감소되는 것을 뜻하기를 의도한다.

### "변화된 자가단백분해적 분해 위치"

"변화된 자가단백분해적 분해 위치"의 용어는 원래 프로테아제 자가단백분해적 분해 위치에서 변화된 것을 나타내기를 의도한다. 이 변화는 원래의 프로테아제에서 완전히 새로운 위치의 형성 또는 한 위치의 제거가 될 수 있다. "변화된 자가단백분해적 분해 위치"의 용어는 또한 원래의 프로테아제에서 분해 패턴의 변화가 예를 들면, 첫번째 또는 두번째 자가단백분해 위치로 판명된 후, 예를 들면, 첫번째 또는 두번째 자가단백분해 위치가 아닌 자가단백분해 위치에서의 변화를 의미한다.

### "자가단백분해적 절단 위치"

자가단백분해적 절단 위치는 프로테아제의 자가단백분해가 일어난다고 믿어지는 프로테아제의 위치를 의미한다. 이 위치는 예를 들면 아미노산 잔기 X와 Y 사이에 위치한 것으로 정의된다.

절단 위치는 프로테아제 수용액을 제조함으로써 확인할 수 있다; 자기분해에 의해 생성된 웨티드 조각의 진행성 분해를 방지하기 프로테아제를 급속히 비활성화시킴으로써; 프로테아제의 재활성화를 방지하는 조건 하에서 웨티드 조각을 분리시킴으로써; 그리고 분리된 조각의 N-말단 아미노산을 확인함으로써 확인할 수 있다. 더 상세함을 위해서 참고자료가 여기 작업실시예로 제공된다(아래를 보라)

"자가단백분해적 절단 위치"의 용어는 다른 말로 "자가단백분해적 분열 위치"로 불릴 수 있다.

### "초기 자가단백분해적 절단 위치"

"초기 자가단백분해적 절단 위치"의 용어는 프로테아제 그 자체를 자가 분해하는 처음의 1-5 초기 절단 위치를 의미하는 것으로 의도된다.

### 펩ти드 변종의 변형

여기에 논의된 대로 펩티드 변종의 변형과 관련하여 사용되는 용어 "변형"은 자가분해성 분해 속도를 감소시키기 위하여 유전자 조작을 물론이고 화학적 변형도 포함하여 정의된다. 변형은 흥미있는 아미노산에서 또는 흥미있는 아미노산을 치환, 결실 및/또는 삽입함으로써 가능해진다.

"변형"의 용어가 자가분해성 절단 위치에서 또는 그 근처에서의 치환, 결실 및/또는 삽입과 관련하여 사용되어졌을 때, 이것은 자가분해성 분해의 속도를 감소시키기 위한 변형을 포함하는 것으로 정의된다. 변형은 감수성 있는 아미노산의 폴리펩티드 결합으로 이루어지는 아미노산에서 또는 그 근처에서 일어나야 한다. 이 구절 "그 근처에서"는 감수성 있는 결합을 형성하는 이들 아미노산의 상부 또는 하부의 세 아미노산 내를 의미하도록 여기에서 정의된다.

### "임의 돌연변이유발"

"임의 돌연변이유발"의 용어는 종래의 방법, 즉 부모 효소의 임의의 위치에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이의 도입 또는 부모 효소의 선택된 위치 또는 부위에서 임의의 아미노산 잔기 도입을 나타내는 것으로 이해하기를 의도한다. 임의 돌연변이유발은 부모 효소와 비교하여, 향상된 성질을 가지는 돌연변이된 효소를 선택하기 위한 스크리닝을 정상적으로 수행한다. 임의 돌연변이를 유발하고 향상된 성질을 스크리닝하기 위한 적당한 기법은 여기에서 더 상세히 논의된다.

### "세정 성능"

세정시 세정되는 물체 상에 존재하는 다양한 자연 발생 기질의 분해를 촉매하는 효소의 능력은 그것의 세정하는 능력, 세정력, 세척력 또는 세정 성능으로 나타낸다. 본 출원을 통하여 세정 성능의 용어가 이 성질을 포함하는 것으로 사용될 것이다.

## "SAVINASE<sup>R</sup>"

SAVINASE<sup>R</sup>은 NOVO NORDISK A/S에 의해 시판된다.

그것은 B.Lentus로부터의 섭틸리신 309이고 오직 N87S를 가진다는 점에서만 BABP92와 다르다(여기서 표 1을 보라).

## 작제

### "전구체 섭틸라제"

"전구체 섭틸라제"의 용어는 Siezen et al. (Protein Engineering 4:719-737 (1991))에 따라 정의된 섭틸라제이다. 더 자세한 설명을 위해, 여기에 설명된 "섭틸라제"로 명명된 절을 보라. 전구체 섭틸라제는 또한 천연원료에서 분리한 섭틸라제가 될 수 있으며, 여기서 이후의 변형은 섭틸라제의 특성을 보유하면서 이루어졌다.

### "기질"

프로테아제의 기질과 관련하여 사용되는 "기질"이란 용어는 섭틸리신 프로테아제에 의해 가수분해 가능한 적어도 하나의 펩타이드 결합을 포함하는 화합물로 이루어지는 것으로 그것의 가장 광의의 형태로 해석되어야 한다.

### "생성물"

프로테아제 효소 반응으로 유도된 생성물과 관련한 "생성물"이란 용어는 본 발명의 문맥에서, 섭틸라제 프로테아제가 수반되는 가수분해반응의 생성물을 포함하여 해석되어야 한다. 생성물은 이후의 가수분해반응에서 기질이 될 수 있다.

### "섭틸라제 변종"

본 발명의 문맥에서, 섭틸라제 변종 또는 돌연변이된 섭틸라제의 용어는 원래의 또는 부모의 유전자를 소유하고 상응하는 부모의 효소를 생산하는 부모 미생물에서 유도한 돌연변이 유전자를 발현하는 생물체에서 생산된 섭틸라제를 의미한다. 여기서 부모 유전자는 돌연변이 유전자를 생성하기 위하여 돌연변이되어졌고, 적당한 숙주에 발현되었을 때 돌연변이된 유전자로부터 상기 돌연변이된 섭틸라제 프로테아제가 생산된다.

### **발명의 상세한 설명**

변화된 자가단백분해적 분해 패턴을 가지는 섭틸라제 변종:

본 발명에 따라서 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로)에 가까운 또는 그 위치에서 초기 자가단백분해적 위치를 가지는 어떤 전구체 섭틸라제도 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 상기 자가분해성 절단 위치에 또는 그 근처(잔기 129-136 사이)를 치환하여 변형시킴으로써 증가된 자가분해 안정성을 보일 것이다. 본 발명에 따라서 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 그러한 초기 자가단백분해적 절단 위치를 가지는 전구체 섭틸라제는 섭틸라제 변종 또는 야생형 섭틸라제가 될 수 있다. 야생형 섭틸라제는 상기의 특정 절단 위치를 가지는 표 I에 나타난 어떤 것도 가능하다. 섭틸라제 변종은 표 II에서 설명되는 변종이 될 수 있는데, 그러나 그것에 한정되지는 않는다. 표 II에서 설명되어지는 것과 다른 섭틸라제 변종이 잔기 132와 133(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 초기 자가단백분해적 절단 위치를 가질 수 있는 것으로 현재 믿어진다.

본 발명에 따라서, 아래(표 II를 보라)에 상기 아미노 잔기의 하나 또는 그 이상에서 변형을 가지는 섭틸라제 변종은 변화된 자가단백분해적 분해 위치를 초래하는 데, 바람직하게는 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로)에 또는 그 근처에 위치하는 새로운 초기 자가단백분해성 위치를 초래한다.

본 발명에 따라서, 표 II에서 보여진 아미노 잔기 중 하나에서, 하나 또는 그 이상에서 변형을 가지는 섭틸라제 변종은 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 상기 자가분해성 절단 위치에 또는 그 근처(잔기 129-136 사이)에서 치환되어 변형됨으로써 증가된 자가분해 안정성을 보일 것이다.

표 II에서 보여진 아미노 잔기 중 하나에서, 하나 또는 그 이상에서 변형을 가지는 섭틸라제 변종은 잔기 192-193(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 자가분해성 절단 위치에 또는 그 근처(잔기 190-196 사이)에서 치환되어 변형됨으로써 역시 증가된 자가분해 안정성을 보일 것이고 본 발명에 따른 서로의 이점은 두 132-133과 192-193 사이의 자가 단백분해적 분해 위치의 근처에서의 변형을 조합함으로써 얻어질 수 있다.

### [표 II]

변형되었을 때, 변화된 자가단백분해적 분해 패턴을 가진 섭틸라제 변종을 발생시키는 잔기

위치/효소.	BASBPN	BLSCAR	BLS309	BLS147	TVTHER
129	P	P	P	T	T
131	G	G	P	G	G
136	K	K	E	E	Q
159	S	S	G	Q	T
164	T	T	S	G	A
165	V	I	I	V	P
167	Y	Y	Y	Y	Y
170	K	K	R	R	Y
171	Y	Y	Y	Y	Y

표 II는 도. 1에서 보여지는 정렬을 사용하여 구성되었다. 다른 섭틸라제를 포괄하는 유사한 또는 더 큰 표가 당업자에 의해 쉽게 만들어질 수 있음을 명백하다.

게다가, 표 II는 잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이에 위치한 상기 자가분해성 절단 부위의 근처에 있는 특정 아미노산 잔기를 나타낸다. 다른 섭틸라제를 포괄하는 이런 유사한 또는 더 큰 표가 당업자에 의해 쉽게 만들어질 수 있음을 명백하다.

### [표 III]

잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로)에 위치한 자가단백분해적 위치의 근처에 있는 잔기

위치/효소.	BASBPN	BLSCAR	BLS309	BLS147	TVTHER
129	P	P	P	T	T
130	S	S	S	S	V
131	G	G	P	G	G
132	S	S	S	S	N
133	A	T	A	S	S
134	A	A	T	T	G
135	L	M	L	L	L
136	K	K	E	E	Q

표 III은 도. 1에서 보여지는 배열을 사용하여 구성되었다.

잔기 192-193 사이에 위치한 자가단백분해적 위치의 근처에 있는 잔기를 나타내는 유사한 표가 당업자에 의해 쉽게 만들어 질 수 있다.

결과적으로 본 발명은 표 II에 나타낸 아미노 잔기 중 하나 또는 그 이상에서의 변형에, 위치 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이에 있는 자가단백분해적 위치의 근처(즉, 위치 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136)의 아미노산 잔기 중 하나 또는 그 이상이 더 변형된 아미노산 서열을 가지는 섭틸라제 변종; 또는

표 II에 나타낸 아미노 잔기 중 하나 또는 그 이상에서의 변형에, 위치 192-193(BASBPN 번호매기기로) 사이에 있는 자가 단백분해적 위치의 근처 (즉, 위치 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196)에서 더 변형된 섭틸라제 변종; 또는

표 II에 나타낸 아미노 잔기 중 하나 또는 그 이상에서의 변형에, 바로 위에서 언급된 두 자가단백분해적 위치의 근처에서 더 변형된 섭틸라제 변종에 관련된다.

본 발명에 따라서 잔기 132-133과 192-193(BASBPN 번호매기기로)에 위치한 두 자가단백분해적 위치의 또는 각 위치의 근처에서의 수많은 특이적 변형은 섭틸라제의 증가된 자가단백분해적 안정성을 제공할 것이다.

대체로 변형은 결과로 따르는 변종이 향상된 자가단백분해적 안정성을 초래하도록 절단 부위 근처에 위치한 아미노산 잔기를 다른 19개의 가능한 아미노산 잔기 중 하나로의 대체가 될 것이다. 유사하게, 변형은 결과로 따르는 변종이 향상된 자가단백분해적 안정성을 초래하도록 절단 부위 근처에서 20개의 가능한 아미노산 잔기 중 어느 것의 하나 또는 그 이상의 삽입이 될 것이다. 게다가 변형은 결과로 따르는 변종이 향상된 자가단백분해적 안정성을 초래하도록 절단 부위 근처에 위치한 아미노산 잔기 중 어느 것의 결실이 될 것이다.

증가된 자가단백분해적 안정성을 가져오는 특이적 변형을 확인하는 방법은 그 위치 중 하나 및/또는 두 위치 근처의 전체 부위에서 국지된 임의 돌연변이를 유발시키고(예를 들면, 129-136 및/또는 189-196 사이의 모든 잔기에서 국지된 임의 돌연변이 유발), 이어서 증가된 안정성을 가져온 특이적 변형을 확인하는 스크리닝 시험을 하는 것이다. 이 방법의 설명을 위해서, 참고자료가 여기 작업 실시예로서 제시된다(아래를 보라).

증가된 자가단백분해적 안정성을 가져오는 수많은 특이적 변형들은 여기 나타낸다(아래의 "B"와 "C" 절을 보라).

증가된 자가단백분해적 안정성을 가진 섭틸라제 변종의 수많은 후보물질은 예를 들어, 표 II 또는 표 III을 봄으로써 그리고 본 발명의 원리를 적용시킴으로써 명확해진다.

잔기 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이에서 자가단백분해적 분열 위치를 가지는 두 BASBPN과 BLSCAR의 전구체 섭틸라제 변종을 증가된 자가단백분해적 안정성을 가진 변종으로 만들기 위해 이 자가단백분해적 위치의 근처에 있는 위치 중 어느 곳에서 치환하는 것이 적당할 것이다.

본 발명의 문맥에서, 섭틸라제는 상기 Siezen 등에 따라 정의된다. 더 좁은 의미에서, 본 발명의 많은 구체화에서 적용 가능한 흥미있는 섭틸라제는 하위군 I-S1과 I-S2에 속하는 것들이다. 더 구체적인 의미에서, 본 발명의 많은 구체화는 상기 표 I에 목록된 섭틸라제와 함께, 일차 구조에서 본질적으로 명백한 상동을 가져올 수 있는 그람-양성 박테리아의 세린 프로테아제에 관련된다.

본 발명은 또한 부모 효소의 아미노산 서열에 어떤 다른 치환, 결실, 삽입과 조합하여 상기 언급된 위치에서의 어떤 하나 또는 그 이상의 치환으로 이루어진다. 특히 효소에 향상된 성질을 제공하는 것으로 알려진 다른 치환과의 조합도 관찰된다.

이러한 조합은 다음의 위치로 이루어진다: 222 (산화 안정성 향상), 218 (열 안정성 향상), 효소를 안정화하는 칼슘-결합 위치(예를 들면, 위치 76)에서의 치환, 그리고 이전 기술에서의 많은 다른 명백한 위치.

더욱이, EP 405 901에 언급된 변종과의 조합도 또한 특별히 고려된다.

### 변종

A: 132-133(BASBPN 번호매기기로) 사이의 변화된 자가단백분해적 절단위치를 가진 단일 변종

단일 변종은 아래에서 언급되는 돌연변이의 하나 또는 그 이상으로 이루어진다.

섭틸리신 BPN', 섭틸리신 Carlsberg, 섭티리신 168 그리고 섭틸리신 DY 변종:

A129V, A129I, A129L, A129M, A129F

G131V, G131I, G131L, G131M, G131F

K136V, K136I, K136L, K136M, K136F,

S159V, S159I, S159L, S159M, S159F,

T164V, T164I, T164L, T164M, T164F,

Y167V, Y167I, Y167L, Y167M, Y167F

K170V, K170I, K170L, K170M, K170F,

Y171V, Y171I, Y171L, Y171M, Y171F

Thermitase 변종:

A129V, A129I, A129L, A129M, A129F

G131V, G131I, G131L, G131M, G131F

Q136V, Q136I, Q136L, Q136M, Q136F,

T159V, T159I, T159L, T159M, T159F,

A164V, A164I, A164L, A164M, A164F,

Y167V, Y167I, Y167L, Y167M, Y167F

Y171V, Y171I, Y171L, Y171M, Y171F

Y170V, Y170I, Y170L, Y170M, Y170F

섭틸리신 309, 섭틸리신 147 그리고 Bacillus PB92 프로테아제 변종:

T129V, T129I, T129L, T129M T129F

G131V, G131I, G131L, G131M, G131F

E136V, E136I, E136L, E136M, E136F,

G159V, G159I, G159L, G159M, G159F,

G164V, G164I, G164L, G164M, G164F, (BLS147)

S164V, S164I, S164L, S164M, S164F. (BLS309과 BAPB92)

Y167A, Y167H, Y167N, Y167P, Y167C, Y167W,

Y167Q, Y167S, Y167T, Y167G, Y167V, Y167I, Y167L, Y167M, Y167F

R170W, R170A, R170H, R170N, R170P, R170Q, R170S, R170T, R170Y(BAPB309에는 버려짐), R170V(BAPB92에는 버려짐), R170I(BAPB92에는 버려짐), R170L, R170M(BAPB92에는 버려짐), R170F, R170G, R170C,

Y171A, Y171H, Y171N, Y171P, Y171C, Y171W, Y171Q, Y171S, Y171T, Y171G, Y171V, Y171I, Y171L, Y171M, Y171F

B: 위치 132-133 사이에 있는 자가단백분해적 절단 위치의 근처에서 변형된 변종.

다음의 돌연변이 중 어느 것의 하나 또는 그 이상으로 더 이루어지는 상기 "A:" 절 아래에 언급된 단일 변종 중 어느것:

P129D, P129E, P129A (BLS309)

S130D, S130E, S130A (BLS309)

P131G, P131D, P131A (BLS309)

S132C, S132A, S132P (BLS309)

A133P (BLS309)

T134C, T134P, T134A (BLS309)

L135P, L135A (BLS309)

E136A, E136P, E136K (BLS309)

V104C+ S132C (BLS309)

V104C+ T134C (BLS309)

A108C+ T134C (BLS309)

C: 위치 192-193 사이에 있는 자가단백분해적 절단 위치의 근처에서 변형된 변종.

다음의 돌연변이 중 어느 것의 하나 또는 그 이상으로 더 이루어지는 상기 "A:" 절 아래에 언급된 단일 변종 중 어느것:

F189A, F189G, F189D, F189R, F189Y, F189E, F189N (BLS309)

S190P, S190D, S190T (BLS309)

Q191S, Q191T, Q191N, Q191A, Q191L, Q191D, Q191W (BLS309)

Y192A, Y192P, Y192D, Y192E, Y192V (BLS309)

G193A, G193N, G193P (BLS309)

A194P, A194D (BLS309)

G195E (BLS309)

L196A (BLS309)

D: 위치 132-133과 192-193 사이에 있는 두 자가단백분해적 절단 위치의 근처에서 변형된 변종.

"B" 절 이하에 언급된 돌연변이 중 어느 것의 하나 또는 그 이상 및/또는 상기 "C" 절 이하에 언급된 돌연변이 중 어느 것의 하나 또는 그 이상의 조합으로 더 이루어지는 상기 "A:" 절 아래에 언급된 단일 변종 중 어느 것

E: 그 이상의 조합 변종:

"B", "C" 및/또는 "D" 절 이하에 언급된 상기 변종 중 어느 것은 다음 위치 중 어느 것에서의 다른 돌연변이와 조합된다면 장점을 보일 것으로 예상된다:

27, 36, 57, 76, 97, 101, 104, 120, 123, 206, 218, 222, 224, 235 및 274.

특히 다음의 BLS309 및 BAPB92 변종에서의 돌연변이는 조합에 적당한 것으로 생각된다: K27R, \*36D, S57P, N76D, G97N, S101G, V104A, V104N, V104Y, H120D, N123S, A194P, Q206E, N218S, M222S, M222A, T224S, K235L 및 T274A.

또는 상기 언급된 다른 치환, 결실 및/또는 삽입 중 어느 하나 또는 그 이상과 조합하여 치환 X167V, X167M, X167F, X167L, X167I, X170V, X170M, X170F, X170L 및/또는 X170I 중 어느 하나 또는 그 이상으로 이루어지는 이러한 변종은 "A", "B" 및/또는 "C" 절 이하에 언급된 돌연변이 중 어느 것과의 조합에 이점을 가진 것으로 생각된다.

게다가 상기 "A", "B" 및/또는 "C" 절 이하에 언급된 치환, 결실 및/또는 삽입 중 어느 하나 또는 그 이상과 조합하여, 돌연변이 V104N+ S101G, K27R+ V104Y+ N123S+ T274A, 또는 N76D+ V104A 또는 이들 돌연변이(V104N, S101G, K27R, V104Y, N123S, T274A, N76D, V104A)의 다른 조합 중 어느 것으로 이루어지는 변종은 향상된 성질을 보이는 것으로 생각된다.

언급되는 특정 조합은 다음과 같다:

A: Y167I + R170L + A133P

B: Y167I + R170L + T134P

C: Y167I + R170L + A133P + T134P

D: Y167I + R170L + V104C + S132C

E: Y167I + R170L + A108C + T134C

F: Y167A + R170S + F189A

G: Y167A + R170S + Y192A

H: Y167A + R170S + Y192P

I: Y167A + R170S + Y192A + A194P

J: Y167A + R170S + Y192P + A194P

K: Y167A + R170S + F189G

L: Y167A + R170S + F189E

M: Y167A + R170S + F189R

N: Y167I + R170L

M: Y167I+ R170L+ A194P

O: Y167A+ R170S+ A194P

P: Y167A+ R170L+ A194P

Q: Y167A+ R170N+ A194P

R: V104C+ S132C+ Y167I+ R170L

S: A108C+ T134C+ Y167I+ R170L

T: V104C+ S132C+ Y167A+ R170S

U: V104C+ S132C+ Y167A+ R170L

V: V104C+ S132C+ Y167A+ R170N

X: A133D+ Y167I+ R170L

Y: P129K+ Y167I+ R170L

Z: A133P+ Y167A+ R170S+ A194P

AA: T134P+ Y167A+ R170S+ A194P

BB: A133P+ T134P+ Y167A+ R170S+ A194P

CC: A133P+ Y167A+ R170N+ A194P

DD: T134P+ Y167A+ R170N+ A194P

EE: A133P+ T134P+ Y167A+ R170N+ A194P

FF: A133P+ Y167A+ R170L

GG: P129K+ P131H+ Y167I+ R170L

HH: A133P+ Y167A+ R170S

II: A133P+ Y167A+ R170N

JJ: Y167A+ R170S+ F189K

KK: V104C+ T134C+ Y167A+ R170S

#### 설틸라제 유전자에서 돌연변이를 생성하는 방법

돌연변이를 유전자에 도입하는 많은 방법이 당기술에서 잘 알려져 있다. 설틸라제 유전자를 클로닝의 간략한 논의 후, 설틸라제 내의 임의 위치, 그리고 특이적 위치 둘다에서 돌연변이를 생성하는 방법이 논의될 것이다.

#### 설틸라제 유전자의 클로닝

설틸라제를 암호화하는 유전자는 표 I에서 나타낸 생물 중 어느 것, 특히 그람-양성 박테리아 또는 진균으로부터 당기술에 잘 알려진 다양한 방법으로 클로닝 할 수 있다. 우선 연구되는 설틸라제를 생산하는 생물로부터 염색체 DNA 또는 메신저 RNA를 사용하여, DNA의 계놈 및/또는 cDNA 라이브러리를 구성한다. 그 다음, 설틸라제의 아미노산 배열이 알려져 있다면, 상동의 표지된 올리고뉴클레오타이드 탐침을 합성하고 박테리아 DNA의 계놈 라이브러리, 또는 cDNA 라이브러리로

부터 섭틸리신을 암호화하는 클론을 확인하는 데 사용한다. 다른 방법으로, 다른 박테리아 균주 또는 생물로부터의 섭틸라제에 상동인 서열을 함유하는 표지된 올리고뉴클레오타이드 탐침을 염증함이 더 낮은 조건에서 보합결합하고 세척하여 섭틸라제-암호화하는 클론을 확인하는 데 탐침으로서 사용할 수 있다.

그러나 섭틸라제-생산하는 클론을 확인하는 다른 방법은 계놈 DNA의 조각을 플라스미드와 같은 발현벡터에 삽입하고, 결과로 나오는 DNA 라이브러리와 함께 프로테아제-음성 박테리아를 형질전환하고, 그 다음 형질전환된 박테리아를 뜯찌기 우유와 같은 섭틸라제의 기질을 포함하는 한천 위에 판상으로 까는 방법을 포함할 수 있다. 섭틸라제를 품은 플라스미드를 포함하는 이들 박테리아는 분비된 섭틸라제에 의해 뜯찌기 우유가 소화되어서, 맑은 한천의 한 무리에 의해 둘러싸여진 쿨로니를 생성할 것이다.

### 섭틸라제 유전자에서 임의 돌연변이의 생성

일단 섭틸라제 유전자가 플라스미드와 같은 적당한 벡터에 클로닝되었으면, 임의의 돌연변이를 유전자에 도입하기 위해 여러가지 방법이 사용될 수 있다.

이를 테면, 임의의 돌연변이 유발은 적당한 물리적 또는 화학적 돌연변이유발제를 사용함으로써, 적당한 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로써, 또는 DNA 서열을 PCR 생성 돌연변이유발에 적용시킴으로써 수행할 수 있을 것이다. 게다가, 임의 돌연변이유발은 이들 돌연변이유발제의 어떤 조합을 사용함으로써 수행할 수 있다.

돌연변이유발제는 예를 들면, 전이, 염기전환, 역위, 스크램블링, 결실 및/또는 삽입을 유발하는 것이 될 것이다.

본 목적에 적당한 물리적 또는 화학적 돌연변이유발제의 예는 자외선(UV)조사, 히드록실아민, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아닌(MNNG), O-메틸 히드록실아민, 아질산, 살포산 에틸 메탄(EMS), 아황산수소나트륨, 포름산 그리고 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

이러한 작용제가 사용되었을 때, 돌연변이유발은 전형적으로 부모 효소를 암호화하는 DNA 서열을 돌연변이유발이 일어날 적당한 조건에서, 선택한 돌연변이유발제의 존재 하에 돌연변이되도록 배양하고, 원하는 성질을 가지는 돌연변이된 DNA를 선택함으로써 수행된다.

돌연변이유발이 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행되었을 때, 변화되기를 원하는 위치에서 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 동안, 세 개의 비-부모 뉴클레오타이드를 혼입하거나 소량 첨가할 수 있다. 혼입 또는 소량 첨가는 원치 않는 아미노산의 코돈을 피하기 위해 수행된다. 혼입된 또는 소량 첨가된 올리고뉴클레오타이드는 어떤 공지된 기법 예를 들어, PCR, LCR 또는 어떤 DNA 폴리머라제와 리가아제를 사용하여 프로테아제 효소를 암호화하는 DNA에 결합될 수 있다.

PCR 생성 돌연변이유발이 사용되어졌을 때, 부모 프로테아제 효소를 암호화하는 화학적으로 처치되거나, 처치되지 않은 유전자를 뉴클레오타이드의 오류 결합을 증가시키는 조건 하에서 PCR에 적용시킨다(Deshler 1992, Leung et al. 1989).

*E. coli* (Fowler et al. 1974), *S. cereviciae* 또는 다른 어떤 미생물의 돌연변이 균주도 예를 들면, 부모 효소를 포함하는 플라스미드를 돌연변이 균주로 형질전환시킴으로써, 플라스미드를 가진 돌연변이 균주를 키우고, 돌연변이 균주로부터 돌연변이된 플라스미드를 분리함으로써 프로테아제 효소를 암호화하는 DNA의 임의의 돌연변이유발에 사용될 수 있다.

돌연변이되는 DNA 서열은 부모 프로테아제 효소를 발현하는 생물로부터 제조된 계놈 또는 cDNA 라이브러리에 편리하게 존재할 수 있다. 다른 방법으로, DNA 서열은 플라스미드 또는 박테리오파지와 같은 적당한 벡터 상에 존재할 수 있다. 그러한 상태로 돌연변이유발제와 같이 배양되거나 그렇지 않으면 돌연변이유발제에 노출될 수 있다. 돌연변이유발되는 DNA는 또한 상기 세포의 계놈에 융합되거나 또는 세포에 잠복한 벡터 상에 존재함으로써 숙주세포에 존재할 수 있다. 마지막으로, 돌연변이되어지는 DNA는 분리된 형태로 있을 수 있다. 임의 돌연변이유발에 적용되는 DNA 서열은 바람직하게 cDNA 또는 계놈 DNA 서열이다.

임의의 돌연변이유발은 문제의 부모 프로테아제의 일부에 이롭게 위치할 수 있다. 이것은 예를 들면, 효소의 어떤 부위가 효소의 주어진 성질에 특히 중요한 것으로 확인되었을 때, 그리고 이것이 변형되어, 향상된 성질을 가지는 변종을 초래할 것이 예상될 때, 이로울 수 있다. 그러한 부위는 정상적으로 부모 효소의 3차 구조가 밝혀졌고 효소의 기능에 관련되었을 때 확인될 수 있다.

국지된 임의의 돌연변이유발은 상기 설명한 PCR 생성 돌연변이유발 기법을 사용하거나 또는 당기술에서 알려진 어떤 다른 적당한 기법을 사용하여 편리하게 수행할 수 있다.

다른 방법으로, 변형되는 DNA 서열의 일부를 암호화하는 DNA 서열을 예를 들어, 적당한 벡터에 삽입하거나 해서 분리할 수 있고, 상기 부분은 이어서 상기 설명한 돌연변이유발 방법 중 어느 것을 사용하여 돌연변이를 유발시킬 수 있다.

국지된 임의의 돌연변이유발은 이들 부위 중 하나 또는 그 이상에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 적어도 둘 이상의 부위에서 수행된다.

#### 설틸라제 유전자에서 부위 지향적 돌연변이의 생성

일단 설틸라제 유전자가 클로닝되었고, 돌연변이에 바람직한 위치를 확인하고, 원래의 것에 대체할 잔기를 결정하였으면, 이들 돌연변이는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 도입할 수 있다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 원하는 돌연변이 위치의 측면에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다; 돌연변이 뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드 합성하는 동안 삽입된다. 바람직한 방법에서, 부위-지향적 돌연변이유발은 Deng et al. (Anal. Biochem. 200:81-88 (1992))와 Markvardsen et al. (BioTechniques 18(3):371-372 (1995))에 각각 설명된 "유일 부위 제거(Unique site elimination, USE)" 또는 "우라실-USE" 기법에 따라 수행된다.

#### 재조합 발현 벡터

본 발명의 효소를 암호화하는 DNA 구조물로 이루어진 재조합 발현 벡터는 재조합 DNA 과정에 편리하게 이용될 수 있는 어떤 벡터도 가능하고, 벡터의 선택은 자주 벡터가 삽입되는 숙주 세포에 따른다. 따라서, 벡터는 자율 복제 벡터, 즉 염색체의 실체로서 존재하는 벡터, 염색체 복제에서 독립적인 복제, 예를 들면, 플라스미드가 될 수 있다. 다른 대안으로, 벡터는 숙주세포에 들어갔을 때, 숙주세포 계놈으로 일부가 또는 그 전체가 융합되고, 융합된 염색체과 함께 복제되는 것이 될 수 있다.

본 발명의 효소를 암호화하는 DNA 서열을 가진 발현벡터는 DNA의 전사에 필요한 추가의 분절이 실시가능하게 연결되어 있는 것이 바람직하다. 일반적으로, 발현 벡터는 플라스미드나 바이러스 DNA에서 유도된 것이거나, 이 둘의 성분을 포함 할 수도 있다. "실시가능하게 연결된"이란 용어는 분절이 정돈되어 이들이 의도한 목적에 부합하게 기능하는 것을 의미한다. 예를 들어, 전사가 프로모터에서 시작되어 효소를 암호화하는 DNA 서열을 통하여 진행된다.

프로모터는 선택된 숙주 세포에서 전사 활성을 보여주는 DNA 서열이 될 수 있고 숙주세포와 동종이거나 이종인 단백질을 암호화하는 유전자에서 유도될 수 있다.

박테리아 숙주세포에서 사용하기에 적당한 프로모터의 예는 *Bacillus stearothermophilus* maltogenic 아밀라아제 유전자, *Bacillus licheniformis* 알파-아밀라아제 유전자, *Bacillus amyloliquefaciens* 알파-아밀라아제 유전자, *Bacillus subtilis* 알카리성 프로테아제 유전자 또는 *Bacillus pumilus* 자일로시다제 유전자, 또는 phage Lambda P<sub>R</sub> 또는 P<sub>L</sub> 프로모터 또는 *E. coli lac*, *trp* 또는 *tac* 프로모터를 포함한다.

본 발명의 효소를 암호화하는 DNA서열은 또한 필요하다면, 적당한 터미네이터에 실시가능하게 연결될 수 있다.

본 발명의 재조합 벡터는 벡터가 문제의 숙주세포에서 복제가능하도록 하는 DNA 서열로 더 이루어질 수 있다.

벡터는 또한 선택가능한 마커, 예를 들어 숙주세포에서의 결점을 보충하는 생성물의 유전자 또는 예를 들어 카나마이신, 클로람페니콜, 에리스로마이신, 테트라사이클린, 스펙티노마이신 등과 같은 항생제에 내성을 암호화하는 유전자 또는 종금속이나 제초제에 내성을 암호화하는 유전자로 이루어질 수 있다.

본 발명의 효소를 숙주세포의 분비 경로로 향하게 하기 위해, 분비신호서열(또한 리더 서열, 프레프로 서열 또는 프레 서열로 알려진)이 재조합 벡터에 제공되어 질 수 있다. 분비신호서열은 맞는 리딩 프레임에서 효소를 암호화하는 DNA 서열에 연결된다. 분비신호서열은 주로 효소를 암호화하는 DNA 서열에 대해 5'에 위치한다. 분비신호서열은 효소와 정상적으로 연관된 것일 수 있고, 또는 다른 분비된 단백질을 암호화하는 유전자로부터의 것일 수 있다.

본 효소를 암호화하는 DNA 서열과 프로모터 그리고 선택적으로 터미네이터 및/또는 분비신호 서열을 각각 라이제이션하거나 또는 이들 서열을 적당한 PCR 증폭 방법으로 조립하고 이들을 복제 또는 융합에 필요한 정보를 포함하는 적당한 벡터에 삽입하는 데 사용되는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다 (cf. 이를테면, Sambrook 등., 앞에 인용한 책에)

### 숙주세포

숙주세포에 삽입되는 본 효소를 암호화하는 DNA 서열은 문제의 숙주에 동종이거나 이종일 수 있다. 숙주세포에 동종이라면 즉, 천연에서 숙주세포에 의해 생산된 것이라면, 전형적으로 실시가능하게 다른 프로모터 서열 또는 응용가능하다면, 천연 환경에서보다 다른 분비신호 서열 및/또는 터미네이터 서열에 연결될 수 있다. "동종의"라는 용어는 문제의 숙주 생물 기원의 효소를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 의미한다. "이종의"라는 용어는 천연에서 숙주세포에 의해 발현되지 않는 DNA 서열을 포함하는 것을 의미한다. 따라서 DNA 서열은 다른 생물체에서 기원할 수 있고, 또는 합성된 서열이 될 수도 있다.

본 발명의 DNA 구조물 또는 제조합 벡터가 삽입되는 숙주세포는 본 효소를 생산할 수 있는 어떤 세포라도 가능한데, 박테리아, 효모, 진균 및 더 고등한 진핵 세포를 포함한다.

배양 상, 본 발명의 효소를 생산할 수 있는 박테리아 숙주 세포의 예는 *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.lentus*, *B.brevis*, *B.stearothermophilus*, *B.alkalophilus*, *B.amylolyquefaciens*, *B.coagulans*, *B.circulans*, *B.lautus*, *B.megatherium* 또는 *B.thuringiensis*의 균주와 같은 *Bacillus*의 균주 또는 *S.lividans* 또는 *S.murinus*와 같은 *Streptomyces* 균주와 같은 그림 양성 박테리아, 또는 *Escherichia coli*와 같은 그람 음성 박테리아이다. 박테리아의 형질전환은 원래 알려진 방법에서 콤피텐트 세포를 사용함으로써 또는 원형질체 형질전환, 에렉트로포레이션, 접합에 의해 초래할 수 있다(cf. Sambrook 등., 상기)

*E.coli*와 같은 박테리아에서 효소가 발현될 때, 효소는 세포질에서 전형적으로 불용성 과립(봉입체로서 알려진)으로서 보유될 수 있고, 또는 박테리아의 분비 순서에 의해서 주변 세포질 공간으로 향할 수도 있다. 전자의 경우에서, 세포는 용해되고 그 과립은 원상태로 회복되고 변성된다. 그 후 변성제를 희석시킴으로써 효소가 되집힌다. 후자의 경우에 있어서는, 주변세포질 공간의 내용물을 방출하기 위해서 세포를 음파처리 또는 삼투충격으로 교란시키고 효소를 원상태로 복구시켜 주변 세포질 공간으로부터 효소를 복구할 수 있다.

*Bacillus* 또는 *Streptomyces* 균주와 같은 그람 양성균에서 효소가 발현될 때, 효소는 세포질 내에 보유되거나, 또는 박테리아의 분비 순서에 따라 세포외 배지로 나올 수 있다. 후자의 경우에, 효소는 아래에 설명된 것처럼 배지로부터 원상태로 복구될 수 있다.

### 설틸라제 생산방법

본 발명은 본 발명에 따라서 분리된 효소를 생산하는 방법을 제공한다. 여기서, 효소를 암호화하는 DNA 서열을 가지게 형질전환된 적당한 숙주세포를 효소의 생산을 허용하는 조건에서 배양하고, 그 결과의 효소는 배양물에서 회수한다.

여기에 정의되는 것처럼, 분리된 폴리펩티드(예, 효소)는 필수적으로 설틸라제가 아닌 다른 폴리펩티드가 없는, 예를 들면, SDS-PAGE에 의해 결정되어 지는 것으로 적어도 약 20 % 순수한, 바람직하게는 적어도 약 40 % 순수한, 더 바람직하게는 약 60 % 순수한, 훨씬 더 바람직하게는 약 80 % 순수한, 가장 바람직하게는 90 % 순수한, 그리고 보다 가장 바람직하게는 약 95 % 순수한 폴리펩티드이다. 이 용어 "분리된 폴리펩티드"는 "정제된 폴리펩티드"로 대체하여 사용될 수 있다.

효소를 암호화하는 DNA 서열로 이루어진 발현벡터가 이종의 숙주세포내로 형질전환되었을 때 본 발명의 효소의 이종 재조합 생산이 가능하다.

그 때문에 동종의 불순물이 없는 것을 특징으로 하는 고도로 정제된 설틸라제 조성물을 만들 수 있다.

본 문맥에서 동종의 불순물은 본 발명의 효소가 원래 얻어지는 동종의 세포에서 기원되는 어떤 불순물(예를 들어, 본 발명의 효소가 아닌 다른 폴리펩타이드)을 의미한다.

형질전환된 숙주세포를 배양하기 위해 사용되는 배지는 문제의 숙주세포를 성장시키기에 적당한 어떤 종래의 배지가 될 수 있다. 발현된 섭틸라제는 배양배지로 간편하게 분비될 수도 있고, 원심분리 또는 여과, 황산암모늄과 같은 염으로 배지의 단백질성 성분을 침전시키고, 이어서 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피등과 같은 크로마토그래피적 방법으로 세포를 배지에서 분리시키는 것을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 배지로부터 복구할 수 있다.

### 돌연변이 효소로 이루어지는 세제 조성물

본 발명은 세정 및 세제 조성물에 본 발명의 돌연변이 효소의 사용과 돌연변이 섭틸리신 효소로 이루어지는 그러한 조성물로 이루어진다. 그러한 세정 및 세제 조성물은 아래에서 더 상세하게 설명된다.

#### 세제 개시와 실시예

##### 계면활성제 시스템

본 발명에 따르는 세제 조성물은 계면활성제 시스템으로 이루어진다. 여기서, 계면활성제는 비이온성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 양성 및/또는 쯔비터이온성 및/또는 반극성 계면활성제에서 선택되어질 수 있다.

계면활성제는 전형적으로 0.1 중량%에서 60 중량%의 수준에서 존재한다.

계면활성제는 조성물에 존재하는 효소 성분과 양립되게 바람직하게 제형화된다. 액체 또는 겔 조성물에서 계면활성제가 이들 조성물 중의 어떤 효소의 안정성을 증진시키거나 또는 적어도 분해되지는 않는 방법으로 가장 바람직하게 제형화된다.

본 발명에 따라서 사용되는 선호되는 시스템은 여기에 설명되는 비이온성 및/또는 음이온성 계면활성제의 하나 또는 그 이상을 계면활성제로 포함한다.

알킬 폐놀의 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 및 폴리부티렌 옥사이드 축합체가 본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용하기에 적합한데, 폴리에틸렌 옥사이드 축합체를 가진 것이 더 바람직하다. 이들 화합물은 알킬렌 옥사이드를 가진 직쇄이거나 분지쇄 배열인 약 6 내지 약 14 의 탄소원자, 바람직하게는 약 8 내지 약 14 의 탄소원자를 포함하는 알킬기를 가진 알킬폐놀의 축합 생성물을 포함한다. 바람직한 구체화에서, 에틸렌 옥사이드는 알킬폐놀 몰 당 에틸렌 옥사이드 약 2 내지 약 25 몰, 더 바람직하게는 약 3 내지 약 15 몰에 해당하는 양으로 존재한다. 이러한 형태의 상업적으로 유용한 비이온성 계면활성제는 GAF Corporation회사에 의해 시판되는 Igepal<sup>TM</sup>CO-630 및 Rohm & Haas Company에 의해 모두 시판되는 Triton<sup>TM</sup>X-45, X-114, X-100 및 X-102를 포함한다. 이들 계면활성제는 자주 알킬 폐놀 알콕실레이트(예, 알킬 폐놀 에톡실레이트)로서 상기다.

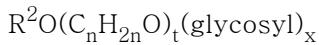
약 1 내지 약 25 몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 1차 및 2차 지방족 알코올의 축합생성물은 본 발명의 비이온성 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용하기에 적합하다. 지방족 알코올의 알킬 체인은 직쇄이거나 분지쇄, 1차 또는 2차 일 수 있고, 일반적으로 약 8 내지 약 22개의 탄소 원자를 포함한다. 알코올 몰 당 약 2 내지 약 10몰의 에틸렌 옥사이드를 가지고 약 8 내지 약 20의 탄소원자를, 더 바람직하게는 약 10 내지 약 18의 탄소원소를 포함하는 알킬기를 가지는 알코올의 축합생성물이 바람직하다. 알코올의 몰 당 약 2 내지 약 7몰의 에틸렌 옥사이드가, 가장 바람직하게는 약 2 내지 약 5몰의 에틸렌옥사이드가 상기 축합생성물에 존재한다. 이러한 형태의 상업적으로 유용한 비이온성 계면활성제의 예는 Union Carbide Corporation에 의해 둘다 시판되는 Tergitol<sup>TM</sup> 15-S-9 (9몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 C<sub>11</sub>-C<sub>15</sub>의 직선형 알코올의 축합생성물), Tergitol<sup>TM</sup> 24-L-6 NMW (한정된 문자량 분포를 가진 6몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> 1차 알코올의 축합생성물); Shell Chemical Company에 의해 시판되는 Neodol<sup>TM</sup> 45-9(9몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> 직선형 알코올의 축합생성물), Neodol<sup>TM</sup> 23-3(3.0몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> 직선형 알코올의 축합생성물), Neodol<sup>TM</sup> 45-7(7몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>의 직선형 알코올의 축합생성물), Neodol<sup>TM</sup> 45-5(5몰의 에틸렌 옥사이드를 가진 C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>의 직선형 알코올의 축합생성물), Procter & Gamble Company에 의해 시판된 Kyro<sup>TM</sup>

EOB (9몰의 에틸렌 옥사이드를 가진  $C_{13}-C_{15}$  알코올의 축합생성물), Hoechst에 의해 시판된 Genapol LA 050 (5몰의 에틸렌 옥사이드를 가진  $C_{12}-C_{14}$ 의 축합생성물)을 포함한다. 이들 생성물에서 HLB의 바람직한 범위는 8-11이고 가장 바람직한 범위는 8-10이다.

US 4,565,647에 개시된 알킬폴리사카라이드가 본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로서 유용하다. 이것은 약 6 내지 약 30의 탄소원자, 바람직하게는 약 10 내지 약 16 탄소원자를 포함하는 소수성기와 약 1.3 내지 약 10, 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3, 가장 바람직하게 약 1.3 내지 약 2.7 사카라이드 단위를 포함하는 친수성기인 폴리사카라이드(예를 들어, 폴리글리코시드)를 가진다. 5 또는 6의 탄소원자를 포함하는 어떤 환원형 사카라이드도 사용될 수 있는데, 예를 들어, 글루코스, 갈락토스 및 갈락토실 일부는 글루코실 일부로 치환될 수 있다(선택적으로 소수성기는 글루코사이드 또는 갈락토사이드에 반대되는 것으로 글루코스 또는 갈락토스를 가져오는 2-, 3-, 4-, 등의 위치에 붙게 된다). 사카라이드 간의 결합은 첨가되는 사카라이드 단위의 한 위치와 이전에 있던 사카라이드 단위 상의 2-, 3-, 4-, 및/또는 6-위치 사이가 될 수 있다.

선호되는 알킬폴리글리코사이드는 다음 식을 가진다.

### 화학식 1



여기서  $R^2$ 는 알킬기가 약 10 내지 약 18, 바람직하게는 약 12 내지 약 14의 탄소원자를 포함하는 알킬기를 가진 알킬, 알킬페닐, 히드록시알킬, 히드록시알킬페닐 및 이들의 혼합물로 구성되는 군에서 선택된 것이고; n은 2 또는 3, 바람직하게는 2; t는 0 내지 10, 바람직하게는 0; 및 x는 약 1.3 내지 약 10, 바람직하게는 약 1.3 내지 약 3, 가장 바람직하게는 약 1.3 내지 2.7이다. 글리코실은 글루코스로부터 유도되는 것이 바람직하다. 이들 화합물을 제조하기 위해 알코올 또는 알킬풀리에 특시 알코올이 먼저 형성되고, 그 다음 글루코사이드(1-위치에 붙은)를 형성하기 위해, 글루코스 또는 글루코스 공급원과 반응한다. 그 다음, 첨가되는 글리코실 단위는 자신의 1-위치와 이전의 글리코실 단위 2-, 3-, 4- 및/또는 6-위치, 바람직하게는 우세하게 2-위치의 사이에 붙을 수 있다.

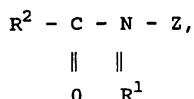
프로필렌 옥사이드를 프로필렌 글리콜과 축합시켜 형성된 소수성 염기를 가진 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물이 또한 본 발명의 추가의 비이온성 계면활성제 시스템으로 사용되기에 적당하다. 이들 화합물의 소수성 부분은 분자량 약 1500 내지 1800을 가지는 것이 바람직할 것이고 수불용성을 보일 것이다. 이 소수성 부분에 폴리옥시에틸렌 일부분의 첨가는 총괄적으로 분자의 수용성을 증가시키는 경향이 있고, 생성물의 액체 특성은 폴리옥시에틸렌 함유량이 축합생성물의 전체량의 약 50 %되는 점(에틸렌 옥사이드의 약 40몰까지 축합된 것에 해당한다)까지 유지된다. 이러한 형태의 화합물의 예는 BASF에 의해 시판되는 상업적으로 유용한 Pluronic<sup>TM</sup> 계면활성제 몇 개를 포함한다.

또한 프로필렌 옥사이드와 에틸렌디아민의 반응에서 나오는 생성물과 에틸렌 옥사이드의 축합생성물이 본 발명의 비이온성 계면활성시스템의 비이온성 계면활성제로서 사용하기에 적합하다. 이들 생성물의 소수성 일부분은 에틸렌디아민과 과량의 프로필렌 옥사이드의 반응생성물로 구성되고, 일반적으로 약 2500 내지 약 3000의 분자량을 가진다. 이 소수성 일부분은 축합생성물이 폴리옥시에틸렌을 약 40 중량% 내지 약 80 중량%까지 포함하는 정도까지 에틸렌 옥사이드와 축합되고 약 5,000 내지 약 11,000의 분자량을 가진다. 이러한 형태의 비이온성 계면활성제의 예는 BASF에 의해 시판되는 상업적으로 유용한 Tetronic<sup>TM</sup> 화합물 몇 개를 포함한다.

에틸렌옥사이드, 알킬폴리사카라이드 및 이들의 혼합물의 약 1 내지 약 25 몰과 1차 및 2차 지방족 알콜의 축합생성물인 알킬페놀의 폴리에틸렌 옥사이드 축합물이 본 발명의 계면활성제 시스템의 비이온성 계면활성제로 사용하기에 바람직하다. 3 내지 15 에톡시기를 가지는  $C_8-C_{14}$  알킬 페놀 에톡실레이트와 2 내지 10 에톡시기를 가지는  $C_8-C_{18}$  알코올 에톡실레이트(바람직하게는 평균  $C_{10}$ )와 이들의 혼합물이 가장 바람직하다.

매우 선호되는 비이온성 계면활성제는 다음 식의 폴리히드록시 지방산 아미드 계면활성제이다.

### 화학식 2

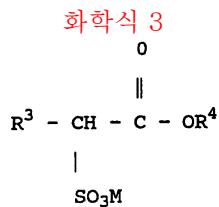


여기서 R<sup>1</sup>은 H, 또는 R<sup>1</sup>은 C<sub>1-4</sub> 히드로카르빌, 2-히드록시에틸, 2-히드록시프로필 또는 이들의 혼합물이고, R<sup>2</sup>는 C<sub>5-31</sub> 히드록시카르빌이며, Z는 적어도 3 히드록실이 체인에 직접 결합된 직선형 히드로카르빌 체인을 가지는 폴리히드록시히드로카르빌이거나 또는 이들의 알콕실레이트 유도체이다. 바람직하게는, R<sup>1</sup>은 메틸, R<sup>2</sup>는 직쇄 C<sub>11-15</sub> 알킬 또는 C<sub>16-18</sub> 알킬 또는 코코넛 알킬과 같은 알케닐 체인 또는 이들의 혼합물이고, Z는 환원적 아미노화 반응에서 포도당, 과당, 옛당 또는 젓당과 같은 환원당에서 유도된다.

매우 선호되는 음이온성 계면활성제는 알킬 알콕실레이트 설페이트 계면활성제를 포함한다. 수용성 염이나 화학식 RO(A)mSO<sub>3</sub>M의 산이 이들의 예가 되는 데, 여기서 R은 C<sub>10-C<sub>24</sub></sub> 알킬 성분을 가지는 치환되지 않은 C<sub>10-C<sub>24</sub></sub> 알킬 또는 히드록시알킬기, 바람직하게는 C<sub>12-C<sub>20</sub></sub> 알킬 또는 히드록시알킬, 더 바람직하게는 C<sub>12-C<sub>18</sub></sub> 알킬 또는 히드록시알킬이고, A는 에톡시 또는 프로필 단위, m은 0보다 큰, 전형적으로 약 0.5와 약 6 사이, 더 바람직하게는 약 0.5와 약 3 사이이며, M은 H 또는 예를 들면 금속양이온(예, 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 등), 암모늄 또는 치환된 암모늄 양이온과 같은 양이온이다. 알킬 프로포실레이트 설페이트는 물론 알킬 에톡실레이트 설페이트도 여기에서 고려된다. 치환된 암모늄 양이온의 구체적인 예는 메틸-, 디메틸, 트리메틸-암모늄 양이온과, 테트라메틸-암모늄과 디메틸 피페디늄 양이온과 같은 4급 암모늄 양이온과, 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 이들의 혼합물과 같은 알킬아민으로부터 유도된 것 등을 포함한다. 본보기가 되는 계면활성제는 M이 나트륨과 칼륨에서 간편하게 선택된 C<sub>12-C<sub>18</sub></sub> 알킬 폴리에톡실레이트(1.0) 설페이트(C<sub>12-C<sub>18</sub></sub>E(1.0)M), C<sub>12-C<sub>18</sub></sub> 알킬 폴리에톡실레이트(2.25) 설페이트 (C<sub>12-C<sub>18</sub></sub>(2.25)M), 및 C<sub>12-C<sub>18</sub></sub> 알킬 폴리에톡실레이트(3.0) 설페이트 (C<sub>12-C<sub>18</sub></sub>E(3.0)M), 및 C<sub>12-C<sub>18</sub></sub> 알킬 폴리에톡실레이트(4.0) 설페이트 (C<sub>12-C<sub>18</sub></sub>E(4.0)M)이다.

"The Journal of the American Oil Chemists Society", 52 (1975), pp. 323-329에 따라 가스상의 SO<sub>3</sub>로 설폰화된 C<sub>8-C<sub>20</sub></sub> 카르복실산의 직선형 에스테르(예, 지방산)를 포함하는 알킬 에스테르 설포네이트 계면활성제가 사용하기에 적합한 음이온성 계면활성제이다. 적당한 출발물질은 수지, 야자유 등에서 유도된 천연 지방 물질을 포함한다.

특히 세탁물에 응용되는 선호되는 알킬 에스테르 설포네이트 계면활성제는 다음 구조식의 알킬 에스테르 설포네이트 계면활성제로 이루어진다.



여기서 R<sup>3</sup>는 C<sub>8-C<sub>20</sub></sub> 히드로카르빌, 바람직하게는 알킬, 또는 이들의 조합이고, R<sup>4</sup>는 C<sub>1-C<sub>6</sub></sub> 히드로카르빌, 바람직하게는 알킬, 또는 이들의 조합이며, M은 알킬 에스테르 설포네이트를 가진 수용성 염을 형성하는 양이온이다. 적당한 염-형성 양이온은 나트륨, 칼륨, 리튬과 같은 금속과 모노에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민과 같은 치환되거나 또는 치환되지 않은 암모늄 양이온을 포함한다. 바람직하게 R<sup>3</sup>는 C<sub>10-C<sub>16</sub></sub> 알킬 및 R<sup>4</sup>는 메틸, 에틸 또는 이소프로필이다. 특히 R<sup>3</sup>가 C<sub>10-C<sub>16</sub></sub> 알킬인 메틸 에스테르 설포네이트가 바람직하다.

다른 적당한 음이온성 계면활성제는 R이 바람직하게 C<sub>10-C<sub>24</sub></sub> 히드로카르빌, 바람직하게는 C<sub>10-C<sub>20</sub></sub> 알킬 성분을 가지는 알킬 또는 히드록시알킬이고, 더 바람직하게는 C<sub>12-C<sub>18</sub></sub> 알킬 또는 히드록시알킬 그리고 M은 H이거나 양이온, 예를 들어, 알카리금속양이온(예, 나트륨, 칼륨, 리튬) 또는 암모늄 또는 치환된 암모늄(예를 들어, 메틸-, 디메틸- 및 트리메틸 암모늄 양이온과 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 이들의 혼합물과 같은 알킬아민에서 유도된 4급 암모늄 양이온과 테트라메틸 암모늄 양이온과 디메틸 피페디늄 양이온과 같은 4차 암모늄 양이온)인 화학식 RO SO<sub>3</sub>M의 산 또는 가용성 염인 알킬 설페이트 계면활성제를 포함한다. 전형적으로, C<sub>12-C<sub>16</sub></sub>의 알킬 체인이 낮은 세정온도(예, 약 50°C 이하)에서 바람직하고, C<sub>16-C<sub>18</sub></sub> 알킬 체인이 더 높은 세정온도(예, 약 50°C 이상)에서 바람직하다.

세정 목적으로 유용한 다른 음이온 계면활성제가 또한 본 발명의 세탁물 세제의 조성물에 포함될 수 있다. 이들은 C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> 1차 또는 2차 알칸 설포네이트, C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> 올레핀설포네이트, 예를 들어 영국 특허 명세서 No. 1,082,179에 설명되어진대로 알칼리 토금속 시트레이트 열분해 생성물의 설폰화에 의해 제조된 설폰화된 폴리 카르복실산, C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> 알킬폴리글리콜에 테르설페이트(에틸렌 옥사이드 10몰까지 포함하는); 알킬 글리세롤 설포네이트, 지방 아실 글리세롤 설포네이트, 지방 올레일 글리세롤 설페이트, 알킬 폐놀 에틸렌 옥사이드 에테르 설페이트, 파라핀 설포네이트, 알킬 포스페이트, 알실 이세소네이트와 같은 이세티오네이트, N-아실 타우레이트, 알킬 숙시나메이트 및 설포숙시네이트, 설포숙시네이트의 모노에스테르(특히 포화된 및 포화되지 않은 C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> 모노에스테르)와 설포숙시네이트의 디에스테르(특히 포화된 및 포화되지 않은 C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> 디에스테르), 아실 사르코시네이트, 알킬폴리글루코사이드(아래에 설명되어질 비이온성 비설페이트 화합물)의 설페이트와 같은 알킬폴리사카라이드의 설페이트, 분자쇄 1차 알킬 설페이트 및 R이 C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub> 알킬이고, k는 1 내지 10의 정수, M은 양이온을 형성하는 가용성염인 화학식 RO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>k</sub>-CH<sub>2</sub>COO-M+의 것과 같은 알킬 폴리에톡시 카르복실레이트, 비누의 염(모노-, 디-, 트리에탄올아민 염과 같이 치환된 암모늄염, 암모늄, 칼륨, 나트륨을 포함하는)를 포함할 수 있다.

알킬벤젠 설포네이트가 크게 바람직하다. 특히 알킬기가 바람직하게 10 내지 18의 탄산원소를 포함하는 직선형(직쇄) 알킬 벤젠 설포네이트(LAS)가 바람직하다.

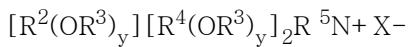
더 이상의 예는 "Surface Active Agents and Detergents" (Vol. I and II by Schwartz, Perrry and Berch)에서 설명되어 진다. 다양한 이러한 계면활성제가 또한 일반적으로 US 3,929,678 (23항, 58행에서 29항, 23행까지, 여기 참고자료로서 삽입됨)에 개시된다.

거기에 포함될 때, 본 발명의 세탁물 세제 조성물은 전형적으로 이러한 음이온 계면활성제의 약 1중량% 내지 약 40중량%, 특히 약 3중량% 내지 약 20중량%로 이루어진다.

본 발명의 세탁물 세제 조성물은 또한 여기 이미 설명된 것이 아닌 비이온성 및/또는 음이온성 계면활성제는 물론 양이온성, 양성, 쪼비터이온성, 반극성 계면활성제도 포함할 수 있다.

본 발명의 세탁물 세제 조성물에 사용하기에 적당한 양이온성 세제 계면활성제는 하나의 긴 체인 히드로카르빌기를 가지는 것들이다. 이러한 양이온성 계면활성제의 예는 알킬트리메틸암모니움 할로게니드와 같은 암모늄 계면활성제, 다음식을 가지는 이들 계면활성제를 포함한다.

#### 화학식 4



여기서 R<sup>2</sup>는 알킬 체인에 약 8 내지 약 18의 탄소원자를 가지는 알킬 또는 알킬 벤질기이고, 각 R<sup>3</sup>는 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-، CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>OH)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> 및 이들의 혼합물로 구성되는 군에서 선택되어지고; 각 R<sup>4</sup>는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 히드록시알킬, 두 R<sup>4</sup>기가 연결되어 형성된 벤젠 고리 구조, R<sup>6</sup>가 약 1000이하의 분자량을 갖는 어떤 헥소스 또는 헥소스 폴머, 그리고 y가 0이 아닐 때, 수소인 -CH<sub>2</sub>CHOHCHOHCOR<sup>6</sup>CHOHCH<sub>2</sub>OH로 구성되는 군에서 선택되어지고; R<sup>5</sup>는 R<sup>4</sup>와 같거나 또는 알킬 체인, 여기서 탄소원자의 총 수 또는 R<sup>2</sup>와 R<sup>5</sup>를 더한 수가 약 18을 넘지 않고; 각 y는 0 내지 약 10, 그리고 y 값의 총합은 0 내지 약 15; 그리고 X는 어떤 양립가능한 음이온이다.

크게 바람직한 양이온성 계면활성제는 다음 화학식을 가지는 본 조성물에서 유용한 수용성 4급 암모늄 화합물이다:

#### 화학식 5



여기서  $R_1$ 은  $C_8-C_{16}$  알킬이고,  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_4$  각각은 독립적으로  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  히드록시알킬, 벤질 그리고 여기서 x는 2 내지 5의 값, X는 음이온인  $-(C_2H_{40})_xH$ 이다. 많아야  $R_2$ ,  $R_3$ , 또는  $R_4$  중 하나가 벤질이어야 한다.

$R_1$ 의 바람직한 알킬 체인 길이는  $C_{12}-C_{15}$ 인데, 특히 여기서의 알킬기가 코코넛 또는 야자씨 지방에서 유도된 체인 길이의 혼합물이거나 또는 올레핀 축척 또는 OXO 알코올 합성에 의해 합성적으로 유도된 것이다.

$R_2R_3$  및  $R_4$ 의 바람직한 기는 메틸, 히드록시에틸기이고 음이온 X는 할라이드, 메소설페이트, 아세테이트 및 포스페이트 이온에서 선택될 수 있다.

여기에 사용되는 화학식 5의 적당한 4급 암모늄 화합물의 예는:

염화 또는 브롬화 코코넛 트리메틸 암모늄;

염화 또는 브롬화 코코넛 메틸 디히드록시에틸 암모늄;

염화 데실 트리에틸 암모늄;

염화 또는 브롬화 데실 디메틸 히드록시에틸 암모늄;

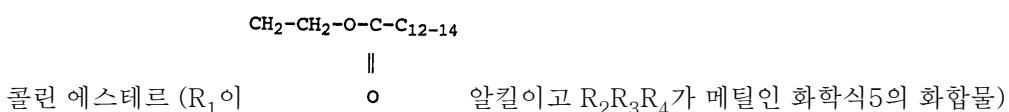
염화 또는 브롬화 C<sub>12-15</sub> 디메틸 히드록시에틸 암모늄;

염화 또는 브롬화 코코넛 디메틸 히드록시에틸 암모늄;

미리스틸 트리메틸 암모늄 메틸 설페이트;

염화 또는 브롬화 라우릴 디메틸 벤질 암모늄;

염화 또는 브롬화 라우릴 디메틸 (에텐옥시)<sub>4</sub> 암모늄;



디-알킬 이미다졸린(화학식5의 화합물)

여기에 유용한 다른 양이온성 계면활성제는 또한 US 4,228,044 및 EP 000 224에 설명되어 있다.

여기에 포함되어졌을 때, 본 발명의 세탁물 세제 조성물은 전형적으로 이러한 양이온성 계면활성제 중량상 약 0.2 % 내지 약 25 %, 특히 약 1 % 내지 약 8 %로 이루어진다.

양성 계면활성제도 또한 본 발명의 세탁물 세제 조성물에 사용하기에 적합하다. 이를 계면활성제는 2차 또는 3차 아민의 지방족 유도체 또는 지방족 라디칼이 직쇄 또는 분지쇄가 될 수 있는 헤테로사이클릭 2차 및 3차 아민의 지방족 유도체로서 넓게 설명될 수 있다. 지방족 치환분의 하나는 적어도 약 8개의 탄소원자를 포함하는 데, 전형적으로 약 8 내지 약 18의 탄소원자를 포함하고 적어도 하나는 음이온성 수용성기(예를들면 카르복시, 설포네이트, 설페이트)를 포함한다. 양성 계면활성제의 예는 US 3,929,678(19항 18-35행)을 보라.

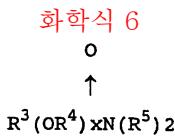
거기에 포함되었을 때 본 발명의 세탁물 세제 조성물은 전형적으로 이러한 양성 계면활성제의 중량상 약 0.2 % 내지 약 15 %, 특히 약 1 % 내지 약 10 %로 이루어진다.

쓰비터이온성 계면활성제가 세탁물 세제 조성물에 사용하기에 또한 적당하다. 이들 계면활성제는 2차 및 3차 아민의 유도체, 헤테로사이클릭 2차 및 3차 아민의 유도체, 또는 4급 암모늄 유도체, 4급 포스포늄 또는 3차 설포니움 화합물로서 넓게 설명될 수 있다. 쓰비터이온성 계면활성제의 예를 위해서는 US 3,929,678(19항, 38행에서 22항 48행까지)을 보라.

거기에 포함되었을 때, 본 발명의 세탁물 세제 조성물은 전형적으로 이러한 쓰비터이온성 계면활성제의 중량상 약 0.2 % 내지 약 15 %, 특히 약 1 % 내지 약 10 %로 이루어진다.

반극성 비이온성 계면활성제는 약 10 내지 약 18의 탄소원자의 하나의 알킬부분과 약 1 내지 약 3의 탄소원자를 포함하는 알킬기와 히드록시알킬기로 구성되는 군에서 선택된 2부분을 포함하는 수용성 아민 옥사이드; 약 10 내지 약 18의 탄소원자의 하나의 알킬부분과 약 1 내지 약 3의 탄소원자를 포함하는 알킬기와 히드록시알킬기로 구성되는 군에서 선택된 2부분을 포함하는 수용성 포스핀 옥사이드; 약 10 내지 약 18의 탄소원자의 하나의 알킬부분과 약 1 내지 약 3의 탄소원자를 포함하는 알킬기와 히드록시알킬기로 구성되는 군에서 선택된 한 부분을 포함하는 수용성 설포사이드를 포함하는 비이온성 계면활성제의 특별한 범주이다.

반극성 비이온성 세제의 계면활성제는 다음식을 가지는 아민 옥사이드 계면활성제를 포함한다.



여기서  $\text{R}^3$ 는 약 8 내지 약 22의 탄소원자를 포함하는 알킬, 히드록시알킬, 또는 알킬 페닐기 또는 이들의 혼합물이고;  $\text{R}^4$ 는 약 2 내지 약 3의 탄소원자를 포함하는 알킬렌 또는 히드록시알킬렌기 또는 이들의 혼합물;  $x$ 는 0 내지 3; 그리고 각  $\text{R}^5$ 는 약 1내지 약 3의 탄소원자를 포함하는 알킬 또는 히드록시알킬 또는 약 1 내지 약 3의 에틸렌 옥사이드기를 포함하는 폴리에틸렌 옥사이드기이다.  $\text{R}^5$ 기는 고리구조를 형성하기 위해 예를 들어, 산소원자 또는 질소원자를 통하여 서로 붙을 수 있다.

이들 아민 옥사이드 계면활성제는 특히  $\text{C}_{10}-\text{C}_{18}$  알킬 디메틸 아민 옥사이드 d와  $\text{C}_8-\text{C}_{12}$  알콕시 에틸 디히드록시 에틸 아민 옥사이드를 포함한다.

거기에 포함되었을 때, 본 발명의 세탁물 세제 조성물은 전형적으로 이러한 반극성 비이온성 계면활성제의 중량상 약 0.2 % 내지 약 15 %, 특히 약 1 % 내지 약 10 %로 이루어진다.

### 보조제 시스템

본 발명에 따른 조성물은 보조제시스템을 더 포함할 수 있다. 알루미늄규산염 물질, 규산염, 폴리카르복실레이트 및 지방산, 에틸렌디아민 테트라아세테이트와 같은 물질, 아미노폴리포스페이트와 같은 금속이온 은폐제, 특히 에틸렌디아민 테트라메틸렌 포스폰산과 디에틸렌 트리아민 펜타메틸렌포스폰산을 포함하여 종래의 어떤 보조제 시스템도 여기에서 사용하기에 적당하다. 명백한 환경적인 이유로 덜 바람직하지만, 인산염 보조제가 또한 여기에 사용될수 있다.

적당한 보조제는 무기이온교환물질, 주로 무기 수화 알루미늄규산염 물질, 특히 더 수화된 지올라이트 A, X, B, HS 또는 MAP와 같은 수화된 합성 지올라이트가 될 수 있다.

또 다른 적당한 무기 보조제 물질은 층상 규산염(예를 들면, SKS-6 (Hoechst))이다. SKS-6은 규산나트륨( $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ )을 구성하는 결정성 층상 규산염이다.

하나의 카르복시기를 포함하는 적당한 폴리카르복실레이트는 벨기에 특허 Nos. 831,368, 821,369와 821,370에 개시된 대로, 젖산, 글리콜산 및 이들의 에테르 유도체를 포함한다. 두 개의 카르복시기를 포함하는 폴리카르복실레이트는 독일 Offenle-enschrift 2,446,686 및 2,446,487, US 3,935,257에 설명된 에테르 카르복실레이트와 벨기에 특허 No. 840,623에 설명된 설퍼닐 카르복실레이트는 물론이고 숙신산, 말론산, (에틸렌디옥시)디아세트산, 말레이산, 디글리콜산, 타르트산, 타르트론산 및 푸마르산의 수용성염을 포함한다. 세개의 카르복시기를 포함하는 폴리카르복실레이트는 영국 특

허 No. 1,379,241에 설명된 카르복시메틸옥시숙시네이트, 네델란드 출원 7205873에 설명된 락트옥시숙시네이트와 같은 숙시네이트의 유도체 및 영국특허 No. 1,387,447에 설명된 2-옥사-1,1,3-프로판 트리카르복실레이트와 같은 옥시폴리 카르복실레이트 물질은 물론이고 특히, 수용성시트레이트, 아코니트레이트 및 시트라코네이트를 포함한다.

네 개의 카르복시기를 함유하는 폴리카르복실레이트는 영국 특허 No. 1,261,829에 개시된 옥시디숙시네이트를 포함하고, 설포 치환분을 함유하는 1,1,2,2,-에탄 테트라카르복실레이트, 1,1,3,3-프로판 테트라카르복실레이트는 영국 특허 Nos. 1,398,421 및 1,398,422 및 US 3,936,448에 개시된 설포숙시네이트유도체 및 영국특허 No. 1,082,179에 설명된 설플화 열분해된 시트레이트를 포함하는 반면, 포스폰 치환분을 함유하는 폴리카르복실레이트는 영국특허 No. 1,439,000에 개시되어 있다.

지방족고리 및 헤테로사이클릭 폴리카르복실레이트는 시클로펜坦-시스,시스-시스-테트라카르복실레이트, 시클로펜坦디에니드 펜타카르복실레이트, 2,3,4,5-테트라히드로-퓨란-시스,시스-테트라카르복실레이트, 2,5-테트라히드로-퓨란-시스, 디스카르복실레이트, 2,2,5,5,-테트라히드로퓨란-테트라카르복실레이트, 1,2,3,4,5,6-헥산-헥사카르복실레이트 및 소르비톨, 만니톨, 잘리톨과 같은 폴리히드릭 알코올의 카르복시메틸 유도체가 포함된다. 방향성 폴리카르복실레이트는 영국 특허 No.1,425,343에 개시된 프탈산 유도체와 멜리트산, 피로멜리트산이 포함된다.

상기 중에서 바람직한 폴리카르복실레이트는 분자당 3개까지의 카르복시기를 포함하는 히드록시-카르복실레이트이고, 특히 더 시트레이트이다.

본 조성물에 사용하기에 바람직한 보조제 시스템은 지올라이트 A와 같은 수불용성의 알루미늄규산염 보조제 또는 충상 규산염(SKS-6)과 시트르산과 같은 수용성 카르복실레이트 퀼레이트제의 혼합물을 포함한다.

본 발명에 따른 세제 조성물에서 포함하기에 적당한 퀼란트는 에틸렌디아민-N,N'-디숙신산(EDDS) 또는 알카리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄, 또는 이들의 치환된 암모늄염, 또는 이들의 혼합물이다. 바람직한 EDDS 화합물은 유리산 형태와 이들의 나트륨 또는 마그네슘염이다. 그러한 바람직한 EDDS의 나트륨염의 예는  $\text{Na}_2\text{EDDS}$ 와  $\text{Na}_4\text{EDDS}$ 를 포함한다. 그러한 바람직한 EDDS의 마그네슘 염의 예는  $\text{MgEDDS}$  및  $\text{Mg}_2\text{EDDS}$ 를 포함한다. 마그네슘 염은 본 발명에 따른 조성물의 포함에 가장 바람직하다.

바람직한 보조제시스템은 지올라이트 A와 같은 수불용성 알루미늄규산염 보조제와 시트르산과 같은 수용성 카르복실레이트 퀼레이트제의 혼합물을 포함한다.

과립 조성물에서 사용하기 위한 보조제 시스템의 일부를 형성할 수 있는 다른 보조제 물질은 알카리금속탄산염, 이탄산염, 규산염과 같은 무기물질과 유기포스포네이트, 아미노폴리알킬렌포스포네이트, 아미노폴리카르복실레이트와 같은 유기물질을 포함한다.

다른 적당한 수용성 유기염은 많아야 두 개의 탄소원자에 의해 서로 분리된 적어도 두 개의 카르복실 라디칼로 이루어지는 폴리카르복실산이 있는 호모- 또는 코-폴리머산 또는 이들의 염이다.

이러한 형태의 폴리머는 GB-A-1,596,756에 개시되어 있다. 이러한 염의 예는 MW 2000-5000의 폴리아크릴레이트와 이들의 말레이 안히드라이드와의 코폴리머, 분자량 20,000 내지 70,000을 가진 특히, 약 40,000을 가진 이들의 코폴리머이다.

세제 보조제 염은 정상적으로 조성물의 중량상 5 % 내지 80 %의 양으로 포함된다. 액체 세제의 보조제의 바람직한 수준은 5 % 내지 30 %이다.

### 효소

본 발명의 효소 조제품에 더하여, 바람직한 세제 조성물은 세정 성능 및/또는 섬유 보호 이점을 제공하는 다른 효소도 포함한다.

이러한 효소는 다른 프로테아제, 리파아제, 큐티나제, 아밀라아제, 셀룰라아제, 퍼옥시다제, 옥시다제 (예, 라카제)를 포함한다.

프로테아제: 알카리성 용액에 사용하기 적당한 어떤 다른 프로테아제도 사용될 수 있다. 적당한 프로테아제는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것을 포함한다. 미생물 기원이 바람직하다. 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이도 포함된다. 프로테아제는 세린 프로테아제, 바람직하게는 알카리성 미생물 프로테아제 또는 트립신-유사 프로테아제가 될 수 있다. 알카리성 프로테아제의 예는 섭틸리신, 특히 Bacillus에서 유도된 것, 예를 들면, 섭틸리신 Novo, 섭틸리신 Carlsberg, 섭틸리신 309, 섭틸리신 147 및 섭틸리신 168 (WO 89/06279에 설명됨)이다. 트립신-유사 프로테아제의 예는 트립신(예, 돼지 또는 소 기원의) 및 WO 89/06270에 설명된 Fusarium 프로테아제이다.

바람직하게 상업적으로 유용한 프로테아제 효소는 Novo Nordisk A/S(덴마크)에 의해 Alcalase, Savinase, Primase, Durazym, 및 Esperase의 상품명으로 팔린 것, Genencor International에 의해 Maxatase, Maxacal, Maxapem, Properase, purafect, 그리고 Purafect OXP의 상품명으로 팔린 것, 그리고 Solvay Enzyme에 의해 Opticlean과 Optimase의 상품명으로 팔린 것을 포함한다. 프로테아제 효소는 본발명에 따른 조성물에 조성물의 중량상 0.00001 % 내지 2 %의 효소 단백질 수준에서, 바람직하게는 조성물의 중량상 0.0001 % 내지 1 %의 효소 단백질 수준에서, 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.001 % 내지 0.5 %의 효소 단백질 수준에서, 훨씬 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.01 % 내지 0.2 %의 효소 단백질 수준에서 결합될 수 있다.

리파아제: 알카리성 용액에 사용하기 적합한 어떤 리파아제도 사용될 수 있다. 적당한 리파아제는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이도 포함된다.

유용한 리파아제의 예는 예를 들어 EP 258 068 및 EP 305 216에 설명된대로, Humicola lanuginosa 리파아제, 예를 들어 EP 238 023에 설명된대로, Rhizomucor miehei 리파아제, C. antarctica 리파아제(예를 들어 EP 214 761에 설명된 대로, C. antarctica 리파아제 A 또는 B)와 같은 Candida 리파아제, EP 218 272에 설명된대로 P. alcaligenes 및 P. pseudoalcaligenes 리파아제와 같은 Pseudomonas Lipase, EP 331 376에 설명된 P. cepacia 리파아제, GB 1,372,034에 개시된 P. stutzeri 리파아제, P. fluorescens 리파아제, 예를 들어 B. subtilis 리파아제(Dartois et al., (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260)와 같은 Bacillus lipase, B. stearothermophilus 리파아제 (JP 64/744992) 및 B. pumilus 리파아제 (WO 91/16422)를 포함한다.

케다가, Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61-67)에 의해 설명된 Penicillium camembertii 리파아제, Geotrichum candidum 리파아제 (Schimada, Y. et, al., (1989), J. Biochem., 106, 383-388) 및 R. delemar 리파아제(Hass, M.J. et al., (1991), Gene 109, 117-113)와 같은 다양한 Rhizopus 리파아제, R. niveus 리파아제 (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716-719) 및 R. oryzae 리파아제를 포함하여, 수많은 클론된 리파아제도 유용할 수 있다.

큐티나제와 같은 다른 형태의 지방분해성 효소가 또한 유용할 수 있다. 예를 들면, WO 88/09367에 설명되어진 Pseudomonas mendocina에서 유래된 큐티나제 또는 (예를 들어 WO 90/09446에 설명된) Fusarium solani pisi에서 유래된 큐티나제가 있다.

특히 적당한 리파아제는 M1 Lipase<sup>TM</sup>, Luma fast<sup>TM</sup> 와 Lipomax<sup>TM</sup> (Genencor), Lipolase<sup>TM</sup>와 Lipolase Ultra<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S) 그리고 Lipase P "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.)와 같은 리파아제가 있다.

리파아제는 정상적으로 세제조성물에 조성물의 중량상 0.00001 % 내지 2 %의 효소 단백질 수준에서, 바람직하게는 조성물의 중량상 0.0001 % 내지 1 %의 효소 단백질 수준에서, 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.001 % 내지 0.5 %의 효소 단백질 수준에서, 훨씬 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.01 % 내지 0.2 %의 효소 단백질 수준에서 결합된다.

아밀라아제: 알카리성 용액에 사용하기 적합한 어떤 아밀라아제( $\alpha$  및/또는  $\beta$ )를 사용할 수 있다. 적당한 아밀라아제는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이도 포함된다. 아밀라아제는 예를 들면, GB 1,296,839에 더 자세히 설명된 B. licheniformis의 특별한 균주에서 얻어진  $\alpha$ -아밀라아제를 포함한다. 상업적으로 유용한 아밀라아제는 Duramyl<sup>TM</sup>, Termamyl<sup>TM</sup>, Fungamyl<sup>TM</sup> 및 BAN<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S로부터 사용가능함) 과 Rapidase<sup>TM</sup>와 Maxamyl P<sup>TM</sup>(Genencor로부터 사용가능함)가 있다.

아밀라아제는 정상적으로 세제조성물에 조성물의 중량상 0.00001 % 내지 2 %의 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 중량상 0.0001 % 내지 1 %의 효소 단백질 수준에서, 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.001 % 내지 0.5 %의 효소 단백질 수준에서, 훨씬 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.01 % 내지 0.2 %의 효소 단백질 수준에서 결합된다.

셀룰라아제: 알카리성 용액에 사용하기 적합한 어떤 셀룰라아제도 사용할 수 있다. 적당한 셀룰라아제는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이도 포함한다. 적당한 셀룰라아제는 US 4,435,307에 개시된 Humicola insolens에서 생산된 진균 셀룰라아제가 있다. 특히 적당한 셀룰라아제는 색상보호이점을 가진 셀룰라아제이다. 그러한 셀룰라아제의 예는 유럽 특허 출원 No. 0 495 257에 설명된 셀룰라아제이다.

상업적으로 사용가능한 셀룰라아제는 Humicola insolens의 한 균주에서 생산된 Celluzyme™ (Novo Nordisk A/S)와 KAC-500(B)™ (Kao Corporation)을 포함한다.

셀룰라아제는 정상적으로 세제조성물에 조성물의 중량상 0.00001 % 내지 2 %의 효소 단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 중량상 0.0001 % 내지 1 %의 효소 단백질 수준에서, 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.001 % 내지 0.5 %의 효소 단백질 수준에서, 훨씬 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.01 % 내지 0.2 %의 효소 단백질 수준에서 결합된다.

페옥시다제/옥시다제: 페옥시다제 효소는 수소 페옥사이드 또는 이들의 공급원(예를 들면, 과탄산염, 과붕산염 또는 과황산염)과 조합하여 사용된다. 옥시다제 효소는 산소와 조합하여 사용된다. 두 형태의 효소는 "용액 표백" 즉, 염색된 섬유가 세탁액에서 함께 세탁될 때, 염색된 섬유에서의 섬유염색액이 다른 섬유로 전이되는 것을 방지하기 위해, 바람직하게는 WO 94/12621과 WO 95/01426에 설명되어진 것처럼 증진제와 함께 사용되어진다. 적당한 페옥시다제/옥시다제는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이도 포함한다.

페옥시다제 및/또는 옥시다제 효소는 정상적으로 세제조성물에 조성물의 중량상 0.00001 % 내지 2 %의 효소단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 중량상 0.0001 % 내지 1 %의 효소 단백질 수준에서, 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.001 % 내지 0.5 %의 효소 단백질 수준에서, 훨씬 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.01 % 내지 0.2 %의 효소 단백질 수준에서 결합된다.

상기 상기 효소의 혼합물은, 특히 프로테아제, 아밀라아제, 리파아제 및/또는 셀룰라아제의 혼합물은 여기에 포함된다.

본 발명의 효소 또는 세제 조성물에 결합되는 어떤 다른 효소도 정상적으로 세제조성물에 조성물의 중량상 0.00001 % 내지 2 %의 효소단백질의 수준에서, 바람직하게는 조성물의 중량상 0.0001 % 내지 1 %의 효소 단백질 수준에서, 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.001 % 내지 0.5 %의 효소 단백질 수준에서, 훨씬 더 바람직하게는 조성물의 중량상 0.01 % 내지 0.2 %의 효소 단백질 수준에서 결합된다.

표백제: 본 발명의 세제 조성물에 포함될 수 있는 추가의 선택적인 세제 성분은 PB1, PB4 및 400-800 미크론의 입자크기를 가진 탄산염과 같은 표백제를 포함한다. 이들 표백제 성분은 하나 또는 그 이상의 산소표백제와 선택된 표백제에 의존하여, 하나 또는 그 이상의 표백활성제를 포함할 수 있다. 본 산소표백제는 전형적으로 약 1 % 내지 약 25 %의 수준에서 존재한다. 일반적으로, 표백화합물은 과립 세제와 같은 액체가 아닌 제형에서 선택적 성분으로 가해진다.

여기에 사용되는 표백제성분은 당기술에 잘 알려진 다른 것은 물론 산소표백제를 포함하여 세제 조성물로서 유용한 어떤 표백제도 가능하다.

본 발명에 적합한 표백제는 활성화된 또는 활성화되지 않은 표백제가 될 수 있다.

사용가능한 산소표백제의 한 범주는 과카르복실산 표백제와 이들의 염을 포함한다. 이 종류의 작용제의 적당한 예는 마그네슘 모노페옥시프탈레이트 헥사히드레이트, 메타-클로로 퍼벤조산, 4-노닐아미노-4-옥소페옥시부티르산 및 디페옥시도데칸디오산의 마그네슘염을 포함한다. 이러한 표백제는 US 4,483,781, US 740,446, EP 0 133 354 및 US 4,412,934에 개시되어 있다. 크게 바람직한 표백제는 또한 US 4,634,551에 설명되어진 6-노닐아미노-6-옥소페옥시카프로산을 포함한다.

사용될 수 있는 표백제의 또 다른 범주는 할로겐 표백제를 포함한다. 예를 들면, 하이포할라이트 표백제의 예는 트리클로로 이소시아누르산과 나트륨 및 칼륨 디클로로이소시아누레이트와 N-클로로 및 N-브로모 알кан 살포아미드를 포함한다. 이러한 화합물은 정상적으로 제조된 제품의 중량상 0.5-10 %로, 바람직하게는 1-5 %중량으로 가한다.

수소 페옥사이드 방출제는 향상된 표백제 효과를 유도하는, 과가수분해되어 활성 표백 종류로서 과산을 형성하는 테트라세틸에틸렌디아민(TAED), 노나노일옥시벤젠설포네이트(NOBS, US 4,412,934에 설명됨), 3,5-트리메틸-헥사놀옥시

벤젠설포네이트(ISONOBS, EP 120 591에 설명됨) 또는 펜타아세틸글루코오스(PAG)와 같은 표백활성제와 조합하여 사용될 수 있다. 게다가, 표백활성제 C8(6-옥탄아미도-카프로일) 옥시벤젠-설포네이트, C9(6-노난아미도 카프로일) 옥시벤젠설포네이트 또는 C10 (6-데칸아미도 카프로인) 옥시벤젠설포네이트 또는 이들의 혼합물이 매우 적당한다. 또한 유럽 특허 출원 No. 91870207.7에 개시된 것과 같이 아실화된 시트레이트 에스테르도 적당한 활성제이다.

본 발명에 따라 세정 조성물에 사용되는 과산소 표백 화합물과 표백 활성제로 이루어지는 표백 시스템과 퍼옥시엑시드을 포함하여 유용한 표백제는 출원 USSN 08/136,626에 설명된다.

수소 퍼옥사이드도 또한 세탁 시작할 때, 또는 세탁하는 동안 및/또는 행굼과정에서 수소 퍼옥사이드를 생성할 수 있는 효소 시스템(즉, 효소와 그 기질)을 첨가함으로써 존재할 수 있다. 이러한 효소 시스템이 유럽 특허 출원 EP 0 537 381에 개시되어 있다.

산소표백제가 아닌 표백제도 당 기술에 잘 알려져 있고, 여기서 사용될 수 있다. 특별히 흥미있는 비산소계 표백제의 한 형태은 설폰화된 아연 및/또는 알루미늄 프탈로시아닌과 같은 광활성화된 표백제를 포함한다. 이들 물질은 세탁과정동안 기질에 침전될 수 있다. 일광에서 건조시키기위해 옷을 걸어놓는 것과 같이 산소 존재하에 빛을 조사하면, 설폰화된 아연 프탈로 시아닌이 활성화되고 결과적으로 기질이 표백된다. 바람직한 아연 프탈로시아닌과 광활성화 표백방법은 US 4,033,718에 설명된다. 전형적으로, 세제조성물은 설폰화된 아연 프탈로시아닌의 0.025 중량% 내지 약 1.25 중량%를 포함한다.

표백제는 또한 망간 촉매로 이루어질 수 있다. 망간 촉매는 예를 들면, "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", *Nature* 369, 1994, pp. 637-639에 설명된 화합물 중 하나가 될 수 있다.

거품억제제: 또 다른 선택적인 성분은 실리콘, 및 실리카-실리콘 혼합물로 예시되는 거품억제제이다. 실리카가 정상적으로 실리카에어로겔과 제로겔 및 다양한 형태의 소수성 실리카로 예시되는 잘게 나누어진 형태로 사용되는 반면 실리콘은 일반적으로 알킬화된 폴리실옥산 물질로 나타낼 수 있다. 이들 물질은 미립자로서 결합될 수 있는데, 이 미립자 내의 거품억제제는 이롭게 방출되게 수용성 또는 수분산성의 실질적으로 비계면활성 세제가 침투할 수 없는 운반체에 결합된다. 다른 한편으로 거품억제제는 액체 운반체에 용해되거나 분산될 수 있고, 하나 또는 그 이상의 다른 성분에 분사됨으로써 응용될 수도 있다.

바람직한 실리콘 거품 조절제는 US 3,933,672에 개시된다. 다른 특히 유용한 거품억제제는 독일 특허 출원 DTOS 2,646,126에 설명된, 자가-유화 실리콘 거품억제제이다. 이러한 화합물의 예는 DC-544, 실록산-글리콜 코폴리머인 상업적으로 사용가능한 형태 Dow Corning이다. 특히 바람직한 거품조절제는 실리콘 오일과 2-알킬-알카놀의 혼합물로 이루어지는 거품억제시스템이다. 적당한 2-알킬-알카놀은 Isofol 12 R의 상품명으로 상업적으로 사용가능한 2-부틸-옥탄올이다.

이러한 거품 억제 시스템은 유럽 특허 출원 EP 0 593 841에 설명되어 있다.

특히 바람직한 실리콘 거품 조절제는 유럽 특허 출원 No. 92201649.8에 설명되어진다. 상기 조성물은 Aerosil<sup>R</sup>과 같은 훈증된 비공성 실리카와 조합하여 실리콘/실리카 혼합물로 이루어질 수 있다.

상기 설명된 거품억제제는 정상적으로 조성물 중량상 0.001 % 내지 2 % 수준으로 특히 0.01 % 내지 1 %의 수준으로 사용된다.

다른 성분: 세제 조성물에 사용되는 다른 성분은 오물 부유제, 오물-방출제, 광학적 광택제, 마찰제, 살균제, 변색 방지제, 착색제 및/또는 캡슐화된 또는 캡슐화되지 않은 방향성분과 같은 것이 사용될 수 있다.

특히 적당한 캡슐형 물질은 GB 1,464,616에 설명된 것과 같이 폴리사카라이드와 폴리히드록시 화합물의 매트릭스로 구성되는 수용성 캡슐이다.

다른 적당한 수용성 캡슐형 물질은 US 3,455,838에 설명된 것과 같이 치환된 디카르복실산의 젤라틴화되지 않은 전분 산 에스테르에서 유도된 텍스트린으로 이루어진다. 이들 산-에스테르 텍스트린은 바람직하게 밀랍 옥수수, 밀랍 사탕수수,

사고, 타피오카 및 감자와 같은 전분에서 제조된다. 상기 캡슐형 물질의 적당한 예는 National Starch에 의해 제조된 N-Lok을 포함한다. N-Lok 캡슐형 물질은 변형된 옥수수전분과 글루코오스로 구성된다. 전분은 옥테닐 숙신산무수물과 같은 단기능성 치환된 기를 가함으로써 변형된다.

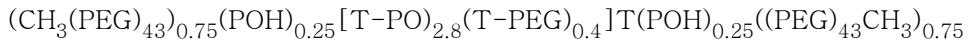
여기에 적당한 재침착 방지 및 오물 혼탁제는 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스와 히드록시에틸셀룰로오스와 같은 셀룰로오스 유도체와 호모- 또는 코-폴리머릭 폴리카르복실산 또는 이들의 염을 포함한다. 이 형태의 폴리머는 코폴리머의 적어도 20 몰 퍼센트를 구성하는 말레이의 안하드리드, 메틸비닐 에테르 또는 메타크릴산, 에틸렌과 말레이의 안하드리드의 코폴리머는 물론이고, 보조제로서 앞서 언급되었던 폴리아크릴레이트와 말레이의 안하드리드-아크릴산의 코폴리머를 포함한다. 이들 물질은 정상적으로 조성물의 중량상 0.5 % 내지 10 %의 수준에서, 더 바람직하게는 0.75 % 내지 8 %, 가장 바람직하게는 1 % 내지 6 %의 수준에서 사용된다.

선호되는 광학적 광택제는 특성상 음이온인데, 이들의 예는 이나트륨 4,4'-비스-(2-디에탄올아미노-4-아닐리노-에스-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2:2' 디설포네이트, 이나트륨 4, -4'-비스-(2-모르폴리노-4-아닐리노-에스-트리아진-6-일아미노-스틸벤-2:2'-디설포네이트, 이나트륨 4,4'-비스-(2,4-디아닐리노-에스-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2:2'-디설포네이트, 일나트륨 4,4''-비스-(2,4-디아닐리노-에스-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2-설포네이트, 이나트륨 4,4'-비스-(4-페닐-2,1,3-트리아졸-2-일)-스틸벤-2,2' 디설포네이트, 이나트륨 4,4'-비스-(2-아닐리노-4-(N-메틸-N-2-히드록시에틸아미노)-에스-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2,2'-디설포네이트, 이나트륨 4,4'-비스(2-아닐리노-4-(1-메틸-2-히드록시에틸아미노)-에스-트리아진-6-일아미노)스틸벤-2,2'디설포네이트, 나트륨 2(스틸빌-4''-(나프토 1',2':4,5)-1,2,3,-트리아졸-2''-설포네이트 및 4,4'-비스(2-설포스티릴)비페닐이다.

다른 유용한 폴리머 물질은 폴리에틸렌 글리콜, 특히 분자량 1000-10000의 것, 더 특히 2000-8000이고, 가장 바람직한 것은 약 4000이다. 이들은 0.20 중량% 내지 5 중량%의 수준에서, 더 바람직하게는 0.25 중량% 내지 2.5 중량%의 수준에서 사용된다. 이들 폴리머와 앞서 상기 호모- 또는 코-폴리머릭 폴리-카르복실레이트 염은 전이금속 불순물의 존재 하에서 단백질성 및 산화성 오물, 진흙에 대한 세정 성능, 직물 회(灰) 침착, 백색유지력을 향상시키는 데 매우 유용하다.

본 발명의 조성물에서 유용한 오물 방출제는 간편하게 다양한 배열상의 에틸렌글리콜 및/또는 프로필렌 글리콜 단위와 테레프탈산의 코폴리머 또는 터폴리머이다. 이러한 폴리머의 예는 US 4,116,885와 4,711,730 및 EP 0 272 033에 개시되어 있다. EP 0 272 033에 따라 특히 선호되는 폴리머는 다음식을 가진다.

### 화학식 7



여기서 PEG는  $-(OC_2H_4)O-$ , -PO는  $(OC_3H_6O)$  및 T는  $(pOOC_6H_4CO)$ 이다.

또한 디메틸 테레프탈레이트, 디메틸 설포이소프탈레이트, 에틸렌글리콜 및 1,2-프로판디올, 일차적으로 설포벤조에이트로, 이차적으로 에틸렌글리콜 및/또는 1,2-프로판디올의 모노 에스테르로 구성된 말단기의 임의의 코폴리머로서 변형된 폴리에스테르가 매우 유용하다. 그 목적은 설포벤조에이트기에 의해서 양 끝이 덮여 씌워진 폴리머를 얻기 위한 것인데, "일차적으로", 본 문맥에서 가장 많이 상기 여기서의 코폴리머는 설포벤조에이트에 의해 끝이 덮여 씌어질 것이다. 그러나, 몇몇 코폴리머는 덜 완전히 덮여 씌어질 것이고, 그러므로 이를 말단기는 에틸렌글리콜 및/또는 1,2-프로판디올의 모노에스테르로 구성될 것인데, 그것으로부터 그러한 종류로 "이차적으로" 구성된다.

여기서 선택된 폴리에스테르는 디메틸 테레프탈산의 약 46 중량%, 1,2-프로판디올의 약 16 중량%, 에틸렌글리콜의 약 10 중량%, 디메틸 설포벤조산의 약 13 중량%와 설포이소프탈산의 약 15 중량%를 포함하고, 약 3000의 분자량을 가진다. 폴리에스테르와 이들의 제법은 EP 311 342에 자세하게 설명된다.

**유연제:** 섬유 유연제가 또한 본 발명에 따른 세탁물 세제 조성물에 결합될 수 있다. 이를 작용제는 형태상 무기 또는 유기 일 수 있다. 무기섬유유연제는 GB-A-1 400898과 US 5,019,292에 개시된 스멕타이트 점토에 의해 예시된다. 유기 섬유 유연제는 GB-A1 514 276과 EP 0 011 340에 개시된 것으로서 수불용성 3급아민과 EP-B-0 026 528에 개시된 모노 C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> 4급 암모늄 염과 이들의 조합 및 EP 0 242 919에 개시된 디-롱 체인 아미드를 포함한다. 다른 유용한 섬유유연제의 유기성분은 EP 0 299 575 및 0 313 146에 개시된 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드 물질을 포함한다.

스멕타이트 점토의 수준은, 제형의 잔여물에 건조 혼합성분으로서 가해지는 물질과 함께, 정상적으로 5 중량% 내지 15 중량%의 범위에서, 더 바람직하게는 8 중량% 내지 12 중량%의 범위에 있다. 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드 물질과 수용

성양이온성 물질이 중량상 0.1 % 내지 2 % 수준에서, 정상적으로 0.15 % 내지 1.5 % 수준에서 가해지는 반면, 수불용성 3급아민 또는 디간체인 아미드 물질과 같은 유기 섬유 유연제는 중량상 0.5 % 내지 5 %의 수준으로, 정상적으로는 1 % 내지 3 % 수준으로 결합된다. 이들 물질은 몇몇의 경우에 건조 혼합 입자로서 가해지거나 또는 조성물의 다른 고체성분에 용해된 액체로서 분사하여 더 편리하게 가해질수도 있지만, 정상적으로는 조성물의 분사 건조된 부분에 가한다.

고분자 염료-전이 저해제: 본 발명에 따른 세제 조성물은 중량상 0.001 % 내지 10 %, 바람직하게는 0.01 % 내지 2 %, 더 바람직하게는 0.05 % 내지 1 %의 고분자 염료-전이 저해제를 포함할 수 있다. 상기 고분자 염료-전이 저해제는 정상적으로 색상 직물에서 같이 세탁되는 직물로 염료가 전이되는 것을 억제하기 위하여 세제 조성물에 혼합된다. 이들 고분자는 세탁시 염료가 다른 세탁물에 불을 기회를 가지기 전에 색상 직물에서 씻겨 나온 일시적인 염료를 흡수하거나 복합하는 능력을 갖는다.

특히 적당한 고분자 염료-전이 저해제는 폴리아민 N-옥사이드 폴리머, N-비닐-피롤리돈과 N-비닐이미다졸의 코폴리머, 폴리비닐피롤리돈 폴리머, 폴리비닐로옥사졸리돈과 폴리비닐이미다졸 또는 이들의 혼합물이다.

이러한 폴리머의 첨가는 또한 본 발명에 따른 효소의 작용을 증진시킨다.

본 발명에 따른 세제 조성물은 액체, 페이스트, 젤, 바 또는 과립 형태가 될 수 있다.

가루가 아닌 과립은 예를 들어 US 4,106,991과 4,661,452(둘다 Novo Industri A/S)에 개시된 대로 제조될 수 있고, 선택적으로 당기술에 공지된 방법에 의해 코팅될 수도 있다. 밀립 코팅 물질의 예는 평균 1000 내지 2000의 분자량을 가지는 폴리(에틸렌 옥사이드) 제품(폴리에틸렌글리콜, PEG); 16 내지 50 에틸렌 옥사이드 단위를 가지는 에톡실화된 노닐페놀; 12 내지 20의 탄소원자로 구성된 알코올과 15 내지 80 에틸렌 옥사이드 단위를 가진 에톡시화된 지방 알코올; 지방알코올; 지방산; 그리고 지방산의 모노- 및 디- 및 트리글리세리드이다. 유체 베드 기술에 의해 응용에 적당한 필름-형성 코팅 물질의 예는 GB 1483591에 주어진다.

본 발명에 따른 과립 조성물은 또한 "밀집된 형태"가 될 수 있다. 즉 종래의 과립 세제 보다 상대적으로 더 높은 밀도, 즉, 550 내지 950 g/l를 형성하는 밀도를 가질수 있다; 이 경우에 본 발명에 따르는 과립 세제 조성물은 종래의 과립 세제와 비교하여 더 작은 양의 "무기 필러 염"을 포함할 것이다; 전형적인 필러 염은 황산과 염소의 알카리 토금속염, 전형적으로 황산나트륨이다; "밀집된" 세제는 전형적으로 많아야 10 % 필러염으로 이루어진다. 본 발명에 따른 액체 조성물은 "농축된 형태"가 될 수 있다. 이 경우에, 본 발명에 따른 액체 조성물은 종래의 액체세제에 비교하여 더 작은 양의 물을 포함할 것이다. 전형적으로, 농축 액체 세제의 수분 함유량은 세제 조성물의 중량상 30 % 미만이고, 더 바람직하게는 20 % 미만, 가장 바람직하게는 10 % 미만이다.

본 발명의 조성물은 예를 들면, 세탁물 첨가 조성물과 염색된 천의 전처리에 사용하기에 적당한 조성물을 포함하여 손 및 기계 세탁 세제 조성물, 섬유 유연제 조성물을 가한 행구제, 및 일반적인 가정용 경화 표면 세정 작업과 접시닦기 작업에 사용되는 조성물로서 제형화될 수 있다.

다음의 실시예는 본 발명의 조성물을 예시하는 것을 의미한다. 그러나 본 발명의 범위를 제한하거나, 그렇지 않으면 정의하는 것을 필수적으로 의미하는 것은 아니다.

세제 조성물에서 간략화된 성분 표시는 다음의 의미를 가진다.

LAS: 직선형 C<sub>12</sub> 알킬 벤젠 살론산 나트륨

TAS: 수지 알킬 황산나트륨

XYAS: C<sub>1X</sub>-C<sub>1Y</sub> 알킬 황산나트륨

SS: 화학식 2-부틸 옥탄산의 이차 비누 계면활성제

25EY: 평균 Y 몰의 에틸렌 옥사이드로 축합된 C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> 우세하게 직선형인 일 차 알코올

45EY: 평균 Y 몰의 에틸렌 옥사이드로 축합된 C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> 우세하게 직선형인 일 차 알코올

XYEZS: 몰당 평균 Z 몰의 에틸렌 옥사이드로 축합된 C<sub>1X</sub>-C<sub>1Y</sub> 알킬 황산나트륨

비이온성: BASF GmbH에 의해 상품명 Plurafax LF404로 팔리는 평균 3.8도의 에톡실화과 평균 4.5도의 프로폭실화를 가진 C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub>의 혼합된 에톡 실화/프로폭실화된 지방알코올

CFAA: C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> 알킬 N-메틸 글루카미드

TFAA: C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> 알킬 N-메틸 글루카미드

규산염: 무정형 규산나트륨 (SiO<sub>2</sub>:Na<sub>2</sub>O 비율 = 2.0)

NaSKS-6: 결정형 층상의 화학식 δ-Na<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 규산염

탄산염: 무수 탄산나트륨

인산염: 트리폴리인산나트륨

MA/AA: 평균 분자량 약 80,000의 1:4 말레이산/아크릴산의 코폴리머

폴리아크릴레이트: BASF GmbH에 의해 상품명 PA30으로 팔리는 평균분자량 8,000의 폴리아크릴레이트 호모폴리머

지올라이트 A : 1 내지 10 마이크로미터 범위의 일차 입자경을 가지는 화학식 Na<sub>12</sub>(AlO<sub>2</sub>SiO<sub>2</sub>)<sub>12</sub>·27H<sub>2</sub>O의 수화된 알루미늄규산나트륨

시트레이트: 이수화 시트르산삼나트륨

시트릭: 시트르산

과붕산염: 실험식 NaBO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 무수 일수화 과붕소산나트륨 표백제

PB4: 무수 사수화 과붕소산 나트륨

과탄산염: 실험식 2Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 무수 과탄산나트륨 표백제

TAED: 테트라아세틸 에틸렌 디아민

CMC: 카르복시메틸 셀룰로오스나트륨

DETPMP: 상품명 Dequest 2060으로 Monsanto에 의해 시판되는 디에틸렌 트리 아민 펜타 (인산메틸렌)

PVP: 폴리비닐피롤리돈 폴리머

EDDS: 에틸렌디아민-N,N'-디숙신산, 나트륨염 형태의 [S,S]이성체

거품제거제: 용점 50°C의 25 % 파라핀 밀랍, 17 % 소수성 실리카, 58 % 파라핀 오일

과립형 거품억제제: 12 % 실리콘/실리카, 18 % 스테아릴 알코올, 70 % 과립형 전분

황산염: 무수 황산나트륨

HMWPEO: 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드

TAE 25: 수지 알코올 에톡실레이트 (25)

세제 실시예 I

본 발명에 따른 과립형 직물 세탁 조성물은 다음과 같이 제조될 수 있다.

직선형 C<sub>12</sub> 알킬벤젠설폰산나트륨 6.5

황산나트륨 15.0

지올라이트 A 26.0

니트릴로트리아세트산나트륨 5.0

본 발명의 효소 0.1

PVP 0.5

TAED 3.0

붕산 4.0

파봉산염 18.0

설폰산페놀 0.1

기타 100까지

세제 실시예 II

본 발명에 따른 밀집한 과립형 직물 세탁 조성물(밀도 800 g/l)은 다음과 같이 제조될 수 있다.

45AS 8.0

25E3S 2.0

25E5 3.0

25E3 3.0

TFAA 2.5

지올라이트 A 17.0

NaSKS-6 12.0

시트르산 3.0

탄산염 7.0

MA/AA 5.0

CMC 0.4

본 발명의 효소 0.1

TAED 6.0

과봉산염 22.0

EDDS 0.3

과립성 거품 억제제 3.5

수분/기타 100%까지

### 세제실시예 III

색상 직물의 세탁물에 특히 유용한 본 발명에 따른 과립형 섬유 세탁 조성물은 다음과 같이 제조될 수 있다.

LAS 10.7 -

TAS 2.4 -

TFAA - 4.O

45AS 3.1 10.0

45E7 4.O -

25E3S - 3.0

68E11 1.8 -

25E5 - 8.0

시트레이트 15.0 7.0

탄산염 - 10

시트르산 2.5 3.0

지올라이트 A 32.1 25.0

Na-SKS-6 - 9.0

MA/AA 5.0 5.0

DETPMP 0.2 0.8

본 발명의 효소 0.10 0.05

규산염 2.5 -

황산염 5.2 3.0

PVP 0.5 -

폴리 (4-비닐파리딘)-N-옥사이드/비닐-이미다졸 및 비닐-페롤리돈의 코폴리머 - 0.2

과봉산염 1.0 -

셀폰산페놀 0.2 -

수분/기타 100 %까지

#### 세제 실시예 IV

"세탁을 통한 유연성"을 제공하는 본 발명에 따른 과립형 직물 세탁 조성물은 다음과 같이 제조될 수 있다.

45AS - 10.0

LAS 7.6 -

68AS 1.3 -

45E7 4.0 -

25E3 - 5.0

염화 코코-알킬-디메틸 1.4 1.0

히드록시-에틸 암모늄

시트레이트 5.0 3.0

Na-SKS-6 - 11.0

지올라이트 A 15.0 15.0

MA/AA 4.0 4.0

DETPMP 0.4 0.4

과봉산염 15.0 -

과탄산염 - 15.0

TAED 5.0 5.0

스펙타이트 점토 10.0 10.0

HMWPEO - 0.1

본 발명의 효소 0.10 0.05

규산염 3.0 5.0

탄산염 10.0 10.0

파립성 거품 억제제 1.0 4.0

CMC 0.2 0.1

수분/기타 100%까지

#### 세제 실시예 V

본 발명에 따른 임무에 충실한 액체 직물 세탁 조성물은 다음과 같이 제조할 수 있다.

I II

LAS 산성형 - 25.0

시트르산 5.0 2.0

25AS 산성형 8.0 -

25AE2S 산성형 3.0 -

25AE7 8.0 -

CFAA 5 -

DETPMP 1.0 1.0

지방산 8 -

올레산 - 1.0

에탄올 4.0 6.0

프로판디올 2.0 6.0

본 발명의 효소 0.10 0.05

염화 코코-알킬 디메틸 - 3.0

히드록시 에틸 암모늄

스멕타이트 점토 - 5.0

PVP 2.0 -

수분/기타 100 %까지

#### 재료와 방법

코주:

*B. lentus* 309 및 147은 NCIB에 맡겨져서 취득번호 NCIB 10309 및 10147를 받고 여기 참고자료로 삽입된 US 특허 No. 3,723,250에 설명된 *Bacillus lentus*의 특정한 균주이다.

*E. coli* MC 1000 (M.J. Casadaban and S.N. Cohen (1980); *J. Mol. Biol.* **138** 179–207)은 종래의 방법에 의해서  $r^-, m^+$ 로 만들어지고 또한 미국 특허 출원 시리얼 No. 039,298에 설명되어진다.

#### 플라스미드:

pJS3: 셉틸라제 309를 암호화하는 합성 유전자를 포함하는 *E. coli* – *B. subtilis* 셔틀 벡터. (Jacob Schiødt et al. in Protein and Peptide letters **3**:39–44 (1996)에 설명됨)

pSX222: *B. subtilis* 발현 벡터 (WO PCT/DK96/00207에 설명됨)

#### 일반적인 문자 생물학 방법:

다른 방법으로 언급되지 않으면, DNA 조작과 형질전환은 문자 생물학의 표준방법을 사용하여 수행되었다(Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

DNA 조작을 위한 효소는 공급자의 설명서에 따라서 사용하였다.

#### DNA 조작을 위한 효소

다른 방법으로 언급되지 않으면, 제한 엔도뉴클레아제, 리가아제 등과 같은 DNA 조작을 위한 모든 효소는 New England Biolabs, Inc.로부터 얻는다.

#### 임의 돌연변이유발된 라이브러리의 구성

국지된 임의 돌연변이유발을 수행하는 것

돌연변이유발 프라이머 (올리고뉴클레오타이드)는 돌연변이되어지는 아미노산 코돈에 상응하는 뉴클레오타이드를 제외하고 돌연변이되어지는 DNA 서열의 일부에 상응하게 합성되어진다.

이어서, 결과로 따르는 돌연변이 프라이머는 적당한 상반되는 프라이머와 함께 PCR반응에 사용된다. 그 결과의 PCR 조각은 정제되고 절단되고 셔틀 벡터로 클로닝된다.

다른 방법으로 그리고 만약 필요하다면, 그 결과의 PCR조각은, 절단되고 셔틀 벡터로 돌연변이된 부분의 클로닝을 위해서 두번째의 적당한 상반된 프라이머와 함께 프라이머로서 두번째 PCR 반응에 사용된다. 그 PCR 반응은 정상조건에서 수행된다.

#### 단백질분해 활성

본 발명의 문맥에서 단백질 분해 활성은 Kilo Novo 프로테아제 유니트(KNPU)로 표현된다. 이 활성은 효소표준 (SAVINASE<sup>®</sup>)에 대하여 상대적으로 결정하고, 결정은 표준조건, 즉, 50°C, pH 8.3, 9분의 반응시간, 3분의 측정시간으로 단백질 분해 효소에 의한 디메틸 카제인 (DMC)용액의 소화를 기본으로 한다. 폴더 AF 220/1은 Novo Nordisk A/S, 덴마크에 청구하는 데로 사용가능한데, 폴더는 참고자료로 여기에 삽입된다.

글리신 단위인 GU는 표준조건 하, 기질로서 N-아세틸 카제인과 함께 40 °C에서 15분간 배양하는 동안 글리신의 1 mmole에 동등한 NH<sub>2</sub>-기의 양을 생성하는 단백질 분해 효소 활성으로 정의된다.

효소 활성은 또한 Journal of American Oil Chemists Society, Rothgeb, T.M., Goodlander, B.D., Garrison, P.H., and Smith, L.A., (1988)에 설명되어진 가용성 기질 숙시닐-알라닌-알라닌-프롤린-페닐-알라닌-파라-니트로페놀과 반응에 따라서 PNA 법을 사용하여 측정할 수 있다.

#### **발효:**

설텁라제의 발효는 100 ml의 BPX배지를 함유하는 500 ml의 조절된 엘렌메이어 플라스크 내 회전 진동 테이블(300 r.p.m) 상에서 30°C에서 5일동안 수행되었다.

결과적으로 예를 들어 2리터 브로스를 만들기 위해서 20 엘렌메이어 플라스크를 동시에 발효시켰다.

#### **증가된 자가단백분해적 안정성을 가진 프로테아제를 시험하는 실험:**

프로테아제를 함유하는 샘플은 마이크로타이터 플레이트 또는 진동 플라스크의 프로테아제가 발현가능한 적당한 배지에서 클루딩 참조 균주에 균주를 키워 만들어진다.

프로테아제를 함유하는 각 샘플에서, 분취량을 덜어내고, 이것에 1/10 vol. 2M Glycin-NaOH 완충액(pH 10.0)을 가한다. 분획을 4 °C와 55 °C에서 각각 세시간동안 배양한다.

배양 후, 프로테아제 활성도는 다음의 완충액에서 0.6 g/l로 기질 숙시닐-알라닌-알라닌-파라-니트로페놀(Suc-Ala-Ala-pNA)를 사용하여 결정된다: 150 mM KCl, 50 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>; pH 9.0으로 조정함

20 μl 샘플 + 180 μl 기질을 96 웰 마이크로타이터 플레이트에서 혼합한다.

발색은 마이크로플레이트 리더에서 405 nm로 측정된다.

활성도는 표준으로 Savinase<sup>R</sup>를 사용하여 결정한다.

샘플의 잔여 활성도는 4 °C에서 배양된 분취량의 프로테아제 활성도에 55 °C에서 배양된 분취량의 프로테아제 활성도의 백분율로서 계산된다.

증가된 잔여 활성도를 보이는 프로테아제가 확인된다.

**배지:** BPX: 조성(리터 당)

감자 전분 100 g

빻은 보리 50 g

대두 가루 20 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 12 H<sub>2</sub>O 9 g

플루로닉 0.1 g

카제인산나트륨 10 g

배지에서 전분은 α-아밀라아제로 액화하고 배지는 120 °C에서 45 분간 가열하여 살균한다. 살균 후, 배지의 pH는 NaHCO<sub>3</sub>를 0.1M까지 가하여 9로 조정한다.

#### **도면의 간단한 설명**

도 1은 표 1에 상기 수많은 섭틸라제의 정렬을 보여준다.

### **실시예**

본 발명에 따른 효소변종을 생성하기 위해, 다음에서 설명된 것과 동일한 재료와 방법이 사용된다: WO 89/06279 (Novo Nordisk A/S), EP 130,756 (Genentech), EP 479,870 (Novo Nordisk A/S), EP 214,435 (Henkel), WO 87/04461 (Amgen), WO 87/05050 (Genex), EP 출원 번호. 87303761 (Genentech), EP 260,105 (Genencor), WO 88/06624 (Gist-Brocades NV), WO 88/07578 (Genentech), WO 88/08028 (Genex), WO 88/08033 (Amgen), WO 88/08164 (Genex), Thomas *et al.* (1985) *Nature*, **318** 375-376; Thomas *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, **193**, 803-813; Russel and Fersht (1987) *Nature*, **328** 496-500. 당기술에서 확립된 다른 방법이 또한 사용될 수 있다.

#### 실시예 1

##### 효소 변종의 구성와 발현:

섭틸라제 309 부위 특이적 변종은 각각 Deng *et al.* (*Anal. Biochem.*, 200:81-88 (1992))와 Markvardsen *et al.* (*BioTechniques* 18(3):371-372(1995))에 설명되어진 "유일 부위 제거(Unique site elimination (USE))" 또는 "우라실-USE" 기법에 의해 제조된다.

주형 플라스미드는 pJS3, 또는 섭틸라제 309의 변종을 함유하는 이것의 유사체인데, 예를 들어 USE 돌연변이 유발은 올리고뉴클레오타이드를 가진 Y167A+R194L을 암호화하는 유전자를 포함하는 pJS3 유사체 상에서 구조물 A194P 돌연변이체를 지향하여 결국에는 Y167A+R170L+A194P 섭틸라제 309 변종을 초래한다.

pJS3에서 구조화된 섭틸라제 309 변종은 그 다음 제한효소 KpnI와 MluI를 사용해서 *B. subtilis* pSX222 발현 플라스미드로 서브클로닝되었다.

이 구조물을 콤피텐트 *B. subtilis* 균주로 형질전환하였고, 프로테아제를 정제하기 위해서, 10 µg/ml 클로람페니콜(CAM)을 함유하는 배지에서 상기에 설명된 것과 같이 발효시켰다.

#### 실시예 2

##### 효소 변종의 정제:

이 방법은 섭틸리신 147 효소, 섭틸리신 309 효소 또는 이들의 돌연변이체의 2 리터 스케일의 발효의 정제와 관련된다.

밸효 브로스의 약 1.6 리터가 1리터 비이커에서 35분간 5000 rpm에서 원심분리되었다. 그 상층액을 10 % 아세트산을 사용하여 pH 6.5로 맞추었고 Seitz Supra S100 필터 판 상에서 여과하였다.

여과물을 Amicon S1Y10 UF 카트리지로 장치된 Amicon CH2A UF 단위를 사용하여 약 400 ml로 농축하였다. UF 농축물을 원심분리하였고 pH 7에서 박시트라신 친화성 컬럼 상에 실온에서 흡수시키기에 앞서 여과하였다. 프로테아제를 pH 7로 조정한 0.01 디메틸글루타르산, 0.1 M 봉산과 0.002 M 염화칼슘의 완충액에서 25 % 2-프로판올과 1M 염화나트륨을 사용하여 실온에서 박시트라신 컬럼으로부터 유출시켰다.

박시트라신 정제 단계에서 프로테아제 활성을 가진 분획을 모으고 pH 6.5로 조정한 0.01 디메틸글루타르산, 0.2 M 봉산과 0.002 M 염화칼슘을 포함하는 완충액으로 평형화한 750 ml Sephadex G25 컬럼 (5 cm 직경)에 사용하였다.

Sephadex G25 컬럼에서 단백질 분해 활성을 가진 분획을 모으고 pH 6.5로 조정한 0.01 M 디메틸글루타르산, 0.2 M 봉산과 0.002 M 염화칼슘을 포함하는 완충액으로 평형화한 150 ml CM Sepharose CL 6B 양이온 교환 컬럼 (5 cm 직경)에 사용하였다.

프로테아제를 같은 완충액(섭틸리신 147의 경우에 0~0.2 M 염화나트륨)의 2 리터에 0~0.1 M 염화나트륨의 직선형 구배를 사용하여 유출시켰다.

마지막 정제 단계에서 CM Sepharose 컬럼으로부터의 분획을 함유하는 프로테아제를 모으고 GR81PP 맴브레인(Danish Sugar Factories Inc.로부터의)으로 장치한 Amicon 초여과 세포에서 농축시켰다.

구조화와 상기 분리과정을 위해 실시예 1의 기법을 사용하여 다음의 섭틸리신 309 변종을 제조하고 분리하였다.

A: Y167I + R170L + A133P

B: Y167I + R170L + T134P

C: Y167I + R170L + A133P + T134P

D: Y167I + R170L + V104C + S132C

E: Y167I + R170L + A108C + T134C

F: Y167A + R170S + F189A

G: Y167A + R170S + Y192A

H: Y167A + R170S + Y192P

I: Y167A + R170S + Y192A + A194P

J: Y167A + R170S + Y192P + A194P

K: Y167A + R170S + F189G

L: Y167A + R170S + F189E

M: Y167A + R170S + F189R

N: Y167I + R170L

M: Y167I+ R170L+ A194P

O: Y167A+ R170S+ A194P

P: Y167A+ R170L+ A194P

Q: Y167A+ R170N+ A194P

R: V104C+ S132C+ Y167I+ R170L

S: A108C+ T134C+ Y167I+ R170L

### 실시예 3

자가분해적 절단 위치의 확인:

Savinase<sup>R</sup> 변종 N:167I+ R170L(상기 설명한 것과 같이 정제 후)의 한 분획이 SDS-PAGE 분석을 통하여 자가분해적 분해로부터 생겼다고 생각되는 두 밴드를 포함한 것을 발견했다. 이 밴드들은 각각 12 kDa와 10 kDa의 Mr's과 함께 이동하였다. 이 두 밴드로 구성되는 펩티드의 N-말단 아미노산 서열은 SDS-PAGE와 PVDF 멤브레인 상에서의 일렉트로블로팅에 따라서 결정되었다.

Mr 12 kDa과 함께 이동하는 밴드의 N-말단 아미노산 서열은 N:Y167I+ R170L의 N-말단 아미노산 서열과 동일한 Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Trp-Gly-Ile-Ser로 밝혀졌다.

Mr 10 kDa과 함께 이동하는 밴드의 N-말단 아미노산 서열은 N:Y167I+ R170L에서의 아미노산 잔기 187 내지 195의 아미노산 서열(BPN' 번호매기기에서는 잔기 193 내지 201)과 동일한 Gly-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-Val-Ala-Pro로 밝혀졌다. 이것은 자가분해적 절단 위치로서 N:Y167I+ R170L에서의 아미노산 잔기 186과 187(BPN' 번호매기기에서는 잔기 192와 193) 사이의 펩티드 결합을 확인한다.

두 성분의 질량은 분획의 매트릭스 보조된 레이저 탈착 이온화 비행시간 질량 분석으로 각각 12,997.5 KDa ± 13 KDa과 8,397.8 KDa ± 8 KDa 였다.

N:Y167I+ R170L에서의 아미노산 잔기 187 내지 269(BPN' 번호매기기에서는 잔기 193 내지 275)로 구성되는 자가분해적 조각의 이론상의 질량은 8,397.3 KDa이고 이것으로 어떤 다른 자가분해적 절단이 잔기 186의 C-말단에 일어나지 않았다는 것을 확신한다.

더 큰 조각의 질량 약(12,997.5 KDa)을 사용하면, 다른 자가분해적 절단이 N:Y167I+ R170L에서의 아미노산 잔기 130과 131(BPN' 번호매기기에서는 잔기 132과 133) 사이에서 일어난 것을 추측할 수 있다. N:Y167I+ R170L의 아미노산 잔기 1 내지 130 (BPN' 번호매기기에서는 잔기 1 내지 132)로 구성되는 자가분해적 조각의 이론상의 질량은 12,699.1 kDa이다.

이들 N:Y167I+ R170L에서의 자가분해적 절단 위치의 발견을 실증하기 위해, 프로테아제를 37 °C, pH 7.5에서 0.1 M 인산나트륨 중 2 mg/ml의 농도로 배양하였다. 0분에서 6 시간까지의 다양한 시간점에서 배양 혼합물 중 20 μl 분취량을 덜어내고 80 μl 1 % TFA를 가해 N:Y167I+ R170L의 단백분해 활성의 비가역적 저해를 초래하였다. 샘플을 매트릭스 보조된 레이저 탈착 비행시간 질량 분석기로 분석할 때까지 냉동고에 보관하였다.

질량 분석의 결과는 각각 12,698.9 kDa ± 13 kDa 와 8,396.1 kDa ± 8 kDa의 질량으로 조각의 양에서의 확고한 증가와 질량 26,607.0 kDa ± 26 kDa으로 성분에서의 확고한 감소를 보였다. N: Y167I+ R170L의 이론상의 질량은 26,605.4 KDa이다.

#### 실시예 4

##### 임의의 프로테아제 변종의 구성

3 임의의 라이브러리가 자가단백분해적 분해 위치 132-133의 근처에서 구성되었다. 3 라이브러리의 각각에서 BLS309 변종 Y167I+ R170L이 주형으로서 사용되었다.

아미노산 1)129-131, 2)132-133, 3)134-135의 3 라이브러리의 구조물을 상기 재료와 방법에서 설명되어진 것대로 제조하였다.

하나의 올리고뉴클레오타이드를 돌연변이되기를 원하는 아미노산 코돈의 첫번째와 두번째 염기에서 네 개의 염기 각각 25 %로 합성하였다. 코돈에서 세번째 뉴클레오타이드(동요 염기)를 하나 또는 두 개의 코돈을 가지는 아미노산에 더 큰 변화의 가능성을 주기위해 50%G/50%C로 합성하였다.

돌연변이유발성의 프라이머는 적당한 상반되는 프라이머와 주형으로서 플라스미드 pJS3:(Y167I+ R170L)를 사용하여 PCR 반응에 사용하였다. 그 결과의 PCR 조각을 정제하고 그 결과의 PCR 조각을 프라이머로서 두번째의 적당한 상반된 프라이머와 함께 두번째 PCR 반응에 사용하였다. 이 단계는 절단할 수 있고, 돌연변이유발 부위를 pJS3 셔틀 벡터로 클로닝 할 수 있는 점에서 유리하다.

부위 129-131, 132-133, 134-135의 라이브러리는 10,000-80,000 클론/라이브러리를 포함하도록 제조되었다.

임의로 선택된 콜로니는 계획된 돌연변이를 확인하기 위해 서열화된다.

#### 실시예 5

##### 증가된 자가단백분해적 활성을 가지는 프로테아제 변종의 확인

실시예 4에서 설명된대로 구성된 각 라이브러리에서의 클론을 상기 설명한 것과 같은 자가단백분해적 안정성을 시험하였다.

각 라이브러리 당 500의 클론을  $10 \mu\text{l}/\text{ml}$  클로람페니콜(CAM)이 첨가된  $200 \mu\text{l}$  LB 배지에서  $37^\circ\text{C}$ , 하루밤동안 마이크로 타이터 플레이트 내에서 배양하였다.

침조 균주로서 SAVINASE<sup>R</sup> 변종 N:Y167I+ R170L을 사용하여, 상대적으로 증가된 자가단백분해적 안정성을 가지는 두 변종을 X:A133D+ Y167I+ R170L, Y:P129K+ Y167I+ R170L, 및 GG:P129K+ P131H+ Y167I+ R170L로 확인하였다.

이것은 132-133 사이에 위치한 자가단백분해적 절단 위치의 근처에서의 치환(P129K, P131H, A133D)이 증가된 자가단백분해적 안정성을 제공한다는 것을 밝힌다.

#### 실시예 6

##### 증가된 자가단백분해적 안정성을 가지는 변종의 비교 발효 실험

Savinase<sup>R</sup> 변종 "M: Y167I+ R170L+ A194P"를, 잔기 192-193 사이에 위치한 자가단백분해적 분열 위치의 근처에 A194P 치환을 가지지 않는 그것의 전구체 변종 "N:Y167I+ R170L"과 비교하는 발효실험을 하였다.

두 변종을 pSX222 발현 벡터 배경에서 클로닝하였고,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  CAM을 포함하는  $100 \text{ ml}$  BPX 배지에서 상기 설명한 것과 같이 발효시켰다.

5일간의 발효 후,  $1.5 \text{ ml}$ 의 BPX 발효 배지를 원심분리하였고 그 상층액을 상기 설명한 것과 같이 단백분해 성질(KPNU)를 측정하기 위해 사용하였다.

"M: Y167I+ R170L+ A194P" 변종을 포함하는 발효 배지는 "N: Y167I+ R170L" 변종을 포함하는 발효 배지와 비교하여 상당히 더 높은 수준의 단백질분해 활성을 가졌다.

현재, 두 변종은 같은 비활성을 가진 것으로 생각되고, 결과적으로 "M: Y167I+ R170L+ A194P" 변종을 포함하는 발효 배지에서의 더 높은 단백분해 활성 수준은 A194P 치환을 가지지 않는 "N: Y167I+ R170L" 전구체 변종과 비교하여 "M: Y167I+ R170L+ A194P" 변종에서의 상대적으로 증가된 자가단백분해적 안정성이 원인인 것으로 현재 생각된다.

유사한 결과가 A194P 돌연변이가 없는 이들의 상응하는 변종과 비교하여 변종 O:Y167A+ R170S+ A194P, P:Y167A+ R170L+ A194P 및 Q:Y167A+ R170N+ A194P에서 얻어졌다.

게다가, 치환 A133P이 증가된 자가단백분해적 활성을 가져오는 것을 보여주는, 유사한 결과가 A133P 돌연변이가 없는 상응하는 전구체 변종과 비교하여 변종 HH: A133P+ Y167A+ R170S에서도 얻어졌다.

## (57) 청구의 범위

## 청구항 1.

(바실러스 아밀로리퀴페시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 섭틸리신BPN' (BASBPN) 번호매기기에서) 잔기 132와 133 사이의 자가단백분해적 분열위치를 가지는, 바실러스 렌투스 (*Bacillus lentus*) 섭틸리신 147 (BLS147), 바실러스 렌투스 (*Bacillus lentus*) 섭틸리신 309 (BLS309), 바실러스 알칼로필루스 (*Bacillus alcalophilus*) 섭틸리신 PB92 (BAPB92)를 포함하는 하위군 I-S2에서 선택되는 전구체 섭틸라제 효소로부터 유래하는 섭틸라제 효소 변종으로서, 다음의 돌연변이 중 어느 하나를 포함하는 섭틸라제 효소 변종.

A: Y167I + R170L + A133P

B: Y167I + R170L + T134P

C: Y167I + R170L + A133P + T134P

D: Y167I + R170L + V104C + S132C

E: Y167I + R170L + A108C + T134C

F: Y167A + R170S + F189A

G: Y167A + R170S + Y192A

H: Y167A + R170S + Y192P

I: Y167A + R170S + Y192A + A194P

J: Y167A + R170S + Y192P + A194P

K: Y167A + R170S + F189G

L: Y167A + R170S + F189E

M: Y167A + R170S + F189R

N: Y167I + R170L

M: Y167I+ R170L+ A194P

O: Y167A+ R170S+ A194P

P: Y167A+ R170L+ A194P

Q: Y167A+ R170N+ A194P

R: V104C+ S132C+ Y167I+ R170L

S: A108C+ T134C+ Y167I+ R170L

T: V104C+ S132C+ Y167A+ R170S

U: V104C+ S132C+ Y167A+ R170L

V: V104C+ S132C+ Y167A+ R170N

X: A133D+ Y167I+ R170L

Y: P129K+ Y167I+ R170L

Z: A133P+ Y167A+ R170S+ A194P

AA: T134P+ Y167A+ R170S+ A194P

BB: A133P+ T134P+ Y167A+ R170S+ A194P

CC: A133P+ Y167A+ R170N+ A194P

DD: T134P+ Y167A+ R170N+ A194P

EE: A133P+ T134P+ Y167A+ R170N+ A194P

FF: A133P+ Y167A+ R170L

GG: P129K+ P131H+ Y167I+ R170L

HH: A133P+ Y167A+ R170S

II: A133P+ Y167A+ R170N

JJ: Y167A+ R170S+ F189K

KK: V104C+ T134C+ Y167A+ R170S.

## 청구항 2.

(바실러스 아밀로리퀴페시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 섭틸리신BPN' (BASBPN) 번호매기기에서) 잔기 132와 133 사이의 자가단백분해적 분열위치를 가지는, 바실러스 렌투스 (*Bacillus lenthus*) 섭틸리신 147 (BLS147), 바실러스 렌투스 (*Bacillus lenthus*) 섭틸리신 309 (BLS309), 바실러스 알칼로필루스 (*Bacillus alcalophilus*) 섭틸리신 PB92 (BAPB92)를 포함하는 하위군 I-S2에서 선택되는 전구체 섭틸라제 효소로부터 유래하는 섭틸라제 효소 변종으로서, 돌연변이 A194P 및 A133P 중 하나 또는 둘과 조합하여 다음의 돌연변이 중 어느 하나를 포함하는 섭틸라제 효소 변종.

R170A

R170C

R170F

R170G

R170H

R170I

R170L

R170N

R170M

R170P

R170Q

R170S

R170T

R170V

R170Y

Y167A+ R170A

Y167C+ R170A

Y167F+ R170A

Y167G+ R170A

Y167H+ R170A

Y167I+ R170A

Y167L+ R170A

Y167M+ R170A

Y167N+ R170A

Y167P+ R170A

Y167Q+ R170A

Y167S+ R170A

Y167T+ R170A

Y167V+ R170A

Y167A+ R170C

Y167C+ R170C

Y167F+ R170C

Y167G+ R170C

Y167H+ R170C

Y167I+ R170C

Y167L+ R170C

Y167M+ R170C

Y167N+ R170C

Y167P+ R170C

Y167Q+ R170C

Y167S+ R170C

Y167T+ R170C

Y167V+ R170C

Y167A+ R170F

Y167C+ R170F

Y167F+ R170F

Y167G+ R170F

Y167H+ R170F

Y167I+ R170F

Y167L+ R170F

Y167M+ R170F

Y167N+ R170F

Y167P+ R170F

Y167Q+ R170F

Y167S+ R170F

Y167T+ R170F

Y167V+ R170F

Y167A+ R170G

Y167C+ R170G

Y167F+ R170G

Y167G+ R170G

Y167H+ R170G

Y167I+ R170G

Y167L+ R170G

Y167M+ R170G

Y167N+ R170G

Y167P+ R170G

Y167Q+ R170G

Y167S+ R170G

Y167T+ R170G

Y167V+ R170G

Y167A+ R170H

Y167C+ R170H

Y167F+ R170H

Y167G+ R170H

Y167H+ R170H

Y167I+ R170H

Y167L+ R170H

Y167M+ R170H

Y167N+ R170H

Y167P+ R170H

Y167Q+ R170H

Y167S+ R170H

Y167T+ R170H

Y167V+ R170H

Y167A+ R170I

Y167C+ R170I

Y167F+ R170I

Y167G+ R170I

Y167H+ R170I

Y167I+ R170I

Y167L+ R170I

Y167M+ R170I

Y167N+ R170I

Y167P+ R170I

Y167Q+ R170I

Y167S+ R170I

Y167T+ R170I

Y167V+ R170I

Y167A+ R170L

Y167C+ R170L

Y167F+ R170L

Y167G+ R170L

Y167H+ R170L

Y167I+ R170L

Y167L+ R170L

Y167M+ R170L

Y167N+ R170L

Y167P+ R170L

Y167Q+ R170L

Y167S+ R170L

Y167T+ R170L

Y167V+ R170L

Y167A+ R170M

Y167C+ R170M

Y167F+ R170M

Y167G+ R170M

Y167H+ R170M

Y167I+ R170M

Y167L+ R170M

Y167M+ R170M

Y167N+ R170M

Y167P+ R170M

Y167Q+ R170M

Y167S+ R170M

Y167T+ R170M

Y167V+ R170M

Y167A+ R170N

Y167C+ R170N

Y167F+ R170N

Y167G+ R170N

Y167H+ R170N

Y167I+ R170N

Y167L+ R170N

Y167M+ R170N

Y167N+ R170N

Y167P+ R170N

Y167Q+ R170N

Y167S+ R170N

Y167T+ R170N

Y167V+ R170N

Y167A+ R170P

Y167C+ R170P

Y167F+ R170P

Y167G+ R170P

Y167H+ R170P

Y167I+ R170P

Y167L+ R170P

Y167M+ R170P

Y167N+ R170P

Y167P+ R170P

Y167Q+ R170P

Y167S+ R170P

Y167T+ R170P

Y167V+ R170P

Y167A+ R170Q

Y167C+ R170Q

Y167F+ R170Q

Y167G+ R170Q

Y167H+ R170Q

Y167I+ R170Q

Y167L+ R170Q

Y167M+ R170Q

Y167N+ R170Q

Y167P+ R170P

Y167Q+ R170Q

Y167S+ R170Q

Y167T+ R170Q

Y167V+ R170Q

Y167A+ R170S

Y167C+ R170S

Y167F+ R170S

Y167G+ R170S

Y167H+ R170S

Y167I+ R170S

Y167L+ R170S

Y167M+ R170S

Y167N+ R170S

Y167P+ R170S

Y167Q+ R170S

Y167S+ R170S

Y167T+ R170S

Y167V+ R170S

Y167A+ R170T

Y167C+ R170T

Y167F+ R170T

Y167G+ R170T

Y167H+ R170T

Y167I+ R170T

Y167L+ R170T

Y167M+ R170T

Y167N+ R170T

Y167P+ R170T

Y167Q+ R170T

Y167S+ R170T

Y167T+ R170T

Y167V+ R170T

Y167A+ R170V

Y167C+ R170V

Y167F+ R170V

Y167G+ R170V

Y167H+ R170V

Y167I+ R170V

Y167L+ R170V

Y167M+ R170V

Y167N+ R170V

Y167P+ R170V

Y167Q+ R170V

Y167S+ R170V

Y167T+ R170V

Y167V+ R170V

Y167A+ R170Y

Y167C+ R170Y

Y167F+ R170Y

Y167G+ R170Y

Y167H+ R170Y

Y167I+ R170Y

Y167L+ R170Y

Y167M+ R170Y

Y167N+ R170Y

Y167P+ R170Y

Y167Q+ R170Y

Y167S+ R170Y

Y167T+ R170Y

Y167V+ R170Y.

### 청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, K27R, \*36D, S57P, N76D, G97N, S101G, V104A, V104N, V104Y, H120D, N123S, Q206E, N218S, M222S, M222A, T224S, K235L, 및 T274A를 포함하는 군으로부터 선택되는 추가의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 변종.

### 청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 1 항 또는 제 2항에 기재된 치환과 조합하여, V104N+ S101G, K27R+ V104Y+ N123S+ T274A, 또는 N76D+ V104A, 또는 돌연변이 V104N, S101G, K27R, V104Y, N123S, T274A, N76D 및 V104A의 다른 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 변종.

### 청구항 5.

제 1 항 또는 제 2 항의 섭틸라제 변종을 암호화하는 DNA 서열.

### 청구항 6.

제 5 항의 DNA 서열을 포함하는 벡터.

### 청구항 7.

제 6 항의 벡터로 형질전환된 미생물 숙주세포.

### 청구항 8.

제 7 항에 있어서, 박테리아인 것을 특징으로 하는 미생물 숙주세포.

### 청구항 9.

제 8 항에 있어서 바실러스 (*Bacillus*)인 것을 특징으로 하는 미생물 숙주세포.

### 청구항 10.

제 9 항에 있어서 바실러스 렌투스 (*B. lenthus*)인 것을 특징으로 하는 미생물 숙주세포

### 청구항 11.

제 1 항 또는 제 2 항의 변종을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 벡터로 형질전환된 미생물 숙주를 상기 변종의 발현과 분비를 유도하는 조건 하에서 배양하고, 그 변종을 회수하는, 제 1 항 또는 제 2 항의 변종을 생산하는 방법.

### 청구항 12.

제 1 항 또는 제 2 항에 따르는 섭틸라제 변종을 포함하는 조성물.

### 청구항 13.

제 12 항에 있어서, 셀룰라아제, 리파아제, 큐티나제, 산화환원효소, 또 다른 프로테아제 또는 아밀라아제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 14.

제 12 항에 있어서, 조성물이 세제 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 15.

삭제

### 청구항 16.

삭제

### 청구항 17.

삭제

### 청구항 18.

삭제

### 청구항 19.

삭제

### 청구항 20.

삭제

### 청구항 21.

삭제

청구항 22.

제 14 항에 있어서, 조성물은 세탁 또는 식기세척 세제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

삭제

청구항 32.

삭제

도면

## 도면 1

130	-	140	-	160	-	170	190	200
BASBN	GGPSG-----	SPALKVNDKAVAS	EGTSGSSS-----	TVGPGKYP-----	FSS-----	VGPE-----	-LDVWAP	
BSS168	GGPTG-----	SPALKVVDKAVAS	EGSSGTS-----	TVGTPAKY-----	FSS-----	AGSE-----	-LDVWAP	
BSSDY	GGPSG-----	SPALKVNDKAVAS	SSGSQSON-----	TIGTPAKY-----	FSS-----	VGAE-----	-LEVWAP	
BLSCAR	GGPSG-----	SPALKVNDKAVAR	SSGSQTN-----	TIGTPAKY-----	FSS-----	VGAE-----	-LEVWAP	
BAPB92	GPSP-----	SATLQAVNSATSR	SGAG-----	SISTPARYA-----	FSQ-----	YGAG-----	-LDIVAP	
BYSTAB	GSSAG-----	SATLQAVNQATAS	SCAG-----	NVGPARYK-----	FSQ-----	YGAG-----	-LDIVAP	
BLS147	GTSIG-----	SSTLVEAVNRRNA	TGRO-----	GVNYPARY-----	FSQ-----	VGPE-----	-TEISAP	
BSEPR	GTTSD-----	SKILHDVNVKAYEQ	DENGK-----	PVNYPARY-----	FSQ-----	TGDE-----	-VEFSAF	
BSISI1	GGPSD-----	VEPLEAVKAVYN	EUGDERTE-----	ELSYPAKY-----	FSN-----	ANKE-----	-LDIVAP	
TVTHR	GGTVG-----	NSGLQAVNYAWNK	AGNT-----	APNYPARY-----	FSN-----	YGSW-----	-VDVWAP	
DNEBPR	GGGG-----	CSONSQRMIDKTINL	ENODA-----	SRWPSSCN-----	FSN-----	YGR-----	-VHLAAP	
XCEXP	GGGGS-----	CSITMONAINGAVSR	DASNV-----	SGSLPANCIA-----	FSN-----	YGR-----	-VHLAAP	
BSBPF	GGSSG-----	LDEWYDMMYNAFRA	TDLFPGG-----	STIANPANY-----	FSL-----	QGPSPYDEIKE1SAF	-DVDSAP	
EFCYL	GSKRN-----	MEIDDERFTVEAFRKNVYARNK	ERSDISTGN-----	EKHIPGGLE-----	FSN-----	YGSN-----	-VSIYGP	
SEEPIP	GNYLI-(9)-----	RODEKVYDODALOKAINYACK	DEJNUVKVKEINKR(5)'TSKVKVYSPNLN	FSN-----	YGNN-----	FIDLMTI		
SPSPCA	GNAAI-----	AYANPDETKADEFARKS	SETSGATEGVNDRYGLODNEMVSPECTSR	FS-----	WGLTAGDNIKEDIAF			
LJSK11	GNSNG-----	NOTLEDPELADEVANAMES	SGTSGATEGVNDRYGLODNEMVSPECTSR	ET-----	YGPVSNLSFKEDITAP			
SMEXSP	GTAPD-(43)-----	OPVPIGGHSAMSTLRAAH	YNNNNTPEAKSL-----	PYAFPDYLN-----	SST-----	SCGQTAS-----	-ICVSAP	
AVPRCA	GFPDG-(10)-----	ROKVPPLPSTRUANDYALINK	GRESVD-----	NDGASTEK-----	YSD-----	EGTA-----	-WCAFP	
MPPPC3	GPNDD-----	GKTYVECPGLAORAFEGYWKKG	GERQGDNC-----	CDGYTDISLY-----	YAE-----	KCSS-----	-TLMATSY	
HSIPC2	GPTDN-----	GKTYVOPRVTQLOMADGYNK	GGSY-DDCN-----	CDGYTASSNW-----	YDE-----	SCSS-----	-TLASTTF	
GPEDD	GPTD-----	GKTYVOPGLABAEFRGVSQ	GREHDSCN-----	CDGYTNSLY-----	YSE-----	ACSS-----	-TLATTY	
DMFOR1	GPDDD-----	GKTYVOPGLASRAFEGTKG	GREODNCN-----	CDGYTNSIW-----	YSE-----	KCSS-----	-TLATTY	
KIKEX1	GPSDD-----	GKTMQAQDPLVKKAKIGVTEG	GGMFGUSCN-----	FGGTNTSIF-----	YSE-----	SCSA-----	-VMVVTY	
SCKEX2	GPADD-----	GHHLQGPSPDLYKLVKGYTEG	GOTRGDNCN-----	YDGTYNSLY-----	YSE-----	GCSA-----	-VMATVY	
VAPROA	GGGOS-----	VALDSAVOSAVOS	SNR-DACN-----	TSMPARVA-----	FSN-----	WGSC-----	-VDVFAP	
TRT11A	GGGAS-----	TALDGYMANINA	DNR--DAEF-----	TSMPART-----	FSN-----	YGRG-----	-LDIFAP	
TAAQUA	GGGV-----	TALONAVKNSTA	DNA--NACN-----	YSPARVA-----	FSN-----	YGSC-----	-VDVFAP	
TAPROK	GGCY-----	SVNSAARLOSS	NNA---DARN-----	YSPASEP-----	FSN-----	YGSV-----	-LDIFGP	
TAPOR	GGCY-----	SVNSAANLQS	NNA---DARN-----	YSPASES-----	FSN-----	YGSV-----	-LDIFAP	
TAROT	GGPSS-----	SAVRRAAEITSA	EAT---DASS-----	YSPASEE-----	FSN-----	FGSV-----	-VDLJAP	
ACALPR	GGGYS-----	SAFNAYNTAYSR	DNO---NAAN-----	YSPASAA-----	FSN-----	YGSV-----	-LDIFAP	
AOALPR	GGGYS-----	KAFNDAVNAFEQ	ENS---DAGQ-----	YSPASAP-----	FSN-----	FGKV-----	-VDVFAP	
SCPBL1	GGGKS-----	PALDLAYNAAEV	ENO---DACN-----	YSPASAD-----	FSN-----	WGRC-----	-VDVFAP	
YLXPR2	GGPKS-----	ASQDALWRSRQE	DAV---DACN-----	YSPASD-----	OSPGNIGG WSGQGSNXYGTC-----	YDVFAP		