



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0069980
(43) 공개일자 2008년07월29일

(51) Int. Cl.

C12N 9/42 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7010525

(22) 출원일자 2008년04월30일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년04월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/038556

국제출원일자 2006년09월29일

(87) 국제공개번호 WO 2007/089290

국제공개일자 2007년08월09일

(30) 우선권주장

60/722,579 2005년09월30일 미국(US)

(71) 출원인

노보자임스 인코포레이티드

미국 캘리포니아 95616-4880 데이비스 드류 애비뉴 1445

(72) 발명자

해리스, 폴

미국 워싱턴 98014 카네이션 342 애비뉴 11927

레이, 마이클

미국 캘리포니아 95616 데이비스 로빈 플레이스 605

당, 한슈

미국 캘리포니아 95616 데이비스 카라바지오 드라이브 2151

(74) 대리인

박종혁, 김정옥, 정삼영, 송봉식

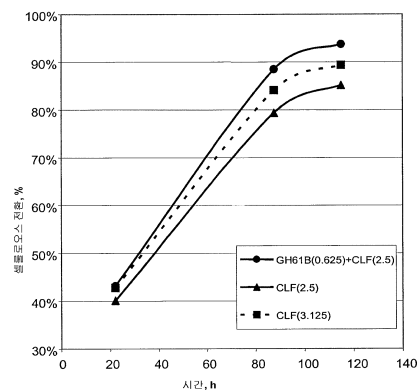
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 셀룰로오스성 물질의 분해 또는 전환을 증진하는 방법

(57) 요약

본 발명은 셀룰로오스성 물질의 분해 또는 전환하는 방법 및 셀룰로오스성 물질로부터 물질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 유효량의 존재 하에, 셀룰로오스성 물질을 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 단백질의 유효량으로 처리하는 단계를 포함하며, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 부재시에 비하여 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재가 셀룰로오스성 물질의 분해를 증가시키고, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는:

- (a) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- (b) 최소한 중간 엄격 조건 하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드;
- (c) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)는 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 폴리펩타이드; 및
- (d) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체

로 구성되는 군으로부터 선택되는,

셀룰로오스성 물질을 분해 또는 전환하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 셀룰로오스성 물질은 초본 물질, 농업 부산물, 임업 부산물, 도시 고체 폐기물, 폐지, 및 펄프와 제지 부산물로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 효소는 셀룰라아제, 엔도글루카나아제, 셀로바이오가수분해효소, 및 베타-글루코시다아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 셀룰로오스성 물질을 헤미셀룰라아제, 에스테라아제, 프로테아제, 락카아제, 퍼옥시다아제, 또는 이들의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소의 유효량으로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 선처리 공정, 동시 당화 및 발효 공정(SSF) 단계, 또는 혼성가수분해 및 발효 공정(HHF) 단계인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 분해된 셀룰로오스성 물질을 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 분해된 셀룰로오스성 물질은 당(sugar)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 단백질 및/또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 세포를 포함하거나 또는 세포를 포함하지 않는 발효 액체 배지의 형태인 것을 특징으로

로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 바람직하게는 최소한 70% 일치, 더 바람직하게는 최소한 75% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 80% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 85% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 90% 일치, 가장 바람직하게는 최소한 95% 일치, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 97% 일치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2 또는 이들의 성숙 폴리펩타이드; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편을 포함하거나 또는 이들로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 바람직하게는 최소한 중간 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 내지 높은 엄격 조건, 및 가장 바람직하게는 최소한 높은 엄격 조건 하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 대장균(*E. coli*) NRRL B-30878 내에 함유된 플라스미드 pTr3337에 함유된 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제11항에 있어서, SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항, 제9항, 제10항, 및 제12항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하며, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)는 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

(A) 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 유효량의 존재하에, 셀룰로오스성 물질을 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 단백질의 유효량으로 당화(saccharifying)하는 단계로서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 부재시에 비하여 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재가 셀룰로오스성 물질의 분해를 증가시키고, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는:

(i) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

(ii) 최소한 중간 엄격 조건 하에서 (a) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (b) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (c) (a) 또는 (b)의 상보적 가닥과 혼성화하는

폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드;

(iii) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)는 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 폴리펩타이드; 및

(iv) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체;

로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드이고,

(B) (a) 단계에서 당화된 셀룰로오스성 물질을 하나 이상의 발효 미생물로 발효하는 단계; 및

(C) 발효물로부터 물질을 회수하는 단계

를 포함하는 물질을 생산하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 셀룰로오스성 물질은 초본 물질, 농업 부산물, 임업 부산물, 도시 고체 폐기물, 폐지, 및 펄프와 제제 부산물로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항 또는 18항에 있어서, 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 단백질은 셀룰라아제, 엔도글루카나아제, 셀로바이오가수분해효소, 및 베타-글루코시다아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 셀룰로오스성 물질을 헤미셀룰라아제, 에스테라아제, 프로테아제, 락카아제, 퍼옥시다아제, 또는 이들의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효소의 유효량으로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 및 (b) 단계는 동시 당화 및 발효 단계에서 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 물질은 알콜, 유기산, 케톤, 아미노산, 또는 기체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 단백질 및/또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 세포를 포함하거나 또는 세포를 포함하지 않는 발효 액체 배지의 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 바람직하게는 최소한 70% 일치, 더 바람직하게는 최소한 75% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 80% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 85% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 90% 일치, 가장 바람직하게는 최소한 95% 일치, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 97% 일치하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제17항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2 또는 이들의 성숙 폴리펩타이드; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편을 포함하거나 또는 이들로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제17항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 바람직하게는 최소한 중간 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 내지 높은 엄격 조건, 및 가장 바람직하게는 최소한 높은 엄격 조건 하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제17항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제17항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 대장균(*E. coli*) NRRL B-30878 내에 함유된 플라스미드 pTr3337에 함유된 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제17항 또는 제26항에 있어서, SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제17항, 제24항, 제25항, 및 제27항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제17항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하며, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)는 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

- (a) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- (b) 최소한 중간 엄격 조건 하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드;
- (c) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)는 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 폴리펩타이드; 및
- (d) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체

로 구성되는 군으로부터 선택되는

셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 포함하는 세정제 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 폴리펩타이드는 아미노산 서열이 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 바람직하게는 최소한 70% 일치, 더 바람직하게는 최소한 75% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 80% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 85% 일치, 더욱 더 바람직하게는 최소한 90% 일치, 가장 바람직하게는 최소한 95% 일치, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 97% 일치하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 34

제32항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2 또는 이들의 성숙 폴리펩타이드; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편을 포함하거나 또는 이들로 구성되는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 35

제32항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 바람직하게는 최소한 중간 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 내지 높은 엄격 조건, 및 가장 바람직하게는 최소한 높은 엄격 조건 하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 36

제32항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체인 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 37

제32항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 대장균(*E. coli*) NRRL B-30878 내에 함유된 플라스미드 pTr3337에 함유된 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 38

제32항 또는 제35항에 있어서, SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766인 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 39

제32항, 제33항, 제34항, 및 제36항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249인 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 40

제32항에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하며, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)는 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 셀룰로오스성 물질의 분해 또는 전환하는 방법 및 셀룰로오스성 물질로부터 기질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 셀룰로오스는 베타-1,4-결합에 의하여 공유결합된 단순 당 글루코스의 고분자이다. 다수의 미생물은 베타-결합 글루칸을 가수분해하는 효소를 생산한다. 이러한 효소는 엔도글루카나아제, 셀룰로바이오하이드롤라아제, 및 베타-글루코시다아제를 포함한다. 엔도글루카나아제는 셀룰로오스 고분자를 무작위적인 위치에서 절단하고, 셀룰로바이오하이드롤라아제가 공격하도록 개방한다. 셀룰로바이오하이드롤라아제는 셀룰로오스 고분자의 말단으로부터 셀로바이오스 분자를 순차적으로 방출한다. 셀로바이오스는 수용성 베타-1,4-결합 글루코스 이량체이다. 베타-글루코시다아제는 셀로바이오스를 글루코스로 가수분해한다.
- <3> 셀룰로오스성 공급 원료의 에탄올 전환은 대량 공급 원료의 활용성, 재료의 소각 또는 매립의 방지에 대한 바람

직함 및 에탄올 연료의 청정성에 이점이 있다. 목재, 농업 부산물, 초본 작물, 및 도시 고체 폐기물은 에탄올 생산의 공급 원료로서 고려되어 왔다. 이러한 재료들은 1차적으로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 및 리그닌으로 구성된다. 셀룰로오스가 글루코스로 전환되는 경우, 글루코스는 효모에 의하여 쉽게 발효되어 에탄올이 된다.

<4> 당해 기술 분야에서는 셀룰로오스성 공급 원료의 전환 능력을 개선시키는 것이 유리하게 된다.

<5> 미국 공개 출원 번호 제2003/0113734호는 EGVII로 동정된 분리된 셀룰라아제 단백질, 및 EGVII를 암호화하는 핵산을 개시하였다.

<6> 본 발명의 목적은 셀룰로오스성 공급 원료의 전환을 개선시키기 위한 셀룰로오스가수분해능 증진 활성을 보유한 분리된 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 서열을 제공하는 것이다.

<7> 발명의 개요

<8> 본 발명은 다음을 포함하는 셀룰로오스성 물질의 분해 또는 전환 방법으로서: 셀룰로오스성 물질을 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 유효량의 존재하에 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 단백질의 유효량으로 처리하는 단계를 포함하며, 여기서 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 부재시에 비하여, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재시에 셀룰로오스성 물질의 분해를 증가시키며, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된다:

<9> (a) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)은 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 폴리펩타이드;

<10> (b) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

<11> (c) 최소한 중간 엄격 조건하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드; 및

<12> (d) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체.

<13> 본 발명은 또한 물질을 생산하는 방법에 관한 것으로서 다음을 포함한다:

<14> (A) 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 유효량의 존재하에 셀룰로오스성 물질을 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 단백질의 유효량으로 당화하는 단계, 여기서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 부재시에 비하여 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재시 셀룰로오스성 물질의 분해를 증가시키며, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된다:

<15> (i) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드 (여기서 x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)은 3 근접 위치상의 모든 아미노산이다); 및

<16> (ii) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;

<17> (iii) 최소한 중간 엄격 조건하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드; 및

<18> (iv) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체;

<19> (B) 하나 이상의 발효 미생물로 (a) 단계에서 당화된 셀룰로오스성 물질을 발효하는 단계; 및

<20> (C) 발효물로부터 물질을 회수하는 단계.

<21> 본 발명의 양호한 특징으로서, 성숙 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766이다. 본 발명은 이러한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 포함하는 세정제 조성물에 관한 것이다.

<22>

발명의 상세한 설명

- <62> 본 발명은 셀룰로오스성 물질의 분해 또는 전환 방법으로서 다음을 포함한다: 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재 하에, 셀룰로오스성 물질을 셀룰로오스가수분해 단백질의 유효량으로 처리하는 단계로서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 부재시에 비하여 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재에 의하여 셀룰로오스성 물질의 분해가 증가하며, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단계:
- <63> (a) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)은 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 폴리펩타이드;
- <64> (b) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드;
- <65> (c) 최소한 중간 엄격 조건하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드; 및
- <66> (d) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체.
- <67> 본 발명은 분해된 또는 전환된 셀룰로오스성 물질을 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 셀룰로오스성 물질의 분해 또는 전환의 수용성 산물은 예컨대, 원심분리, 여과, 및 중력 침전 등의 공지의 기술을 사용하여 불용성 셀룰로오스성 물질로부터 분리될 수 있다.
- <68> 본 발명은 또한 다음을 포함하는 물질의 제조 방법에 관한 것이다: (A) 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드 유효량의 존재하에 셀룰로오스성 물질을 하나 이상의 셀룰로오스가수분해 단백질의 유효량으로 당화하는 단계로서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 부재시에 비하여 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드의 존재시 셀룰로오스성 물질의 분해를 증가시키며, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단계: (i) [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]를 포함하는 폴리펩타이드로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)은 3 근접 위치상의 모든 아미노산인 폴리펩타이드; (ii) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 최소한 70% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드; (iii) 최소한 중간 엄격 조건하에서 (a) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (b) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (c) (a) 또는 (b)의 상보적 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 폴리펩타이드; 및 (iv) SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 변이체; (B) 하나 이상의 발효 미생물로 (a) 단계에서 당화된 셀룰로오스성 물질을 발효하는 단계; 및 (C) 발효물로부터 물질을 회수하는 단계.
- <69> 본 명세서에서 설명하는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드 및 숙주 세포는 에탄올, 플라스틱, 그 밖의 산물 또는 중간체의 생산을 위한 바이오매스의 화학물질 또는 발효 공급 원료로서 단당류, 이당류, 및 다당류의 생산에 사용될 수 있다. 특히, 셀룰로오스 또는 헤미셀룰로오스의 부분적 또는 완전 가용화함으로써 폴리펩타이드 및 숙주 세포를 사용하여 공정 잔여물 (건조 증류기 찌꺼기, 양조 찌꺼기, 사탕수수 버캐스, 등.)의 가치를 증대시킬 수 있다.
- <70> 셀룰로오스성 물질의 셀룰로오스가수분해 단백질에 의하여 글루코스, 자일로오스, 만노스, 갈락토오스, 및 아라비노스, 하기하는 바와 같은 이들로부터 유도되는 이들의 고분자, 또는 산물을 처리하는 것을 증가시킴으로써, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 세포를 보유하거나 보유하지 않은 미정제(미정제) 발효 액체 배지의 형태 또는 반-정제 또는 정제 효소 제조물의 형태가 될 수 있다. 셀룰로오스가수분해 증진 단백질은 단일성분 제조품, 예컨대, 패밀리 61 단백질, 다성분 단백질 제조품, 예컨대, 다수의 패밀리 61 단백질, 또는 다성분 및 단일성분 단백질 제조품의 조합이 될 수 있다. 셀룰로오스가수분해 증진 단백질은 산성, 중성, 또는 염기성 pH-범위에서 셀룰로오스가수분해 단백질의 활성을 증대시킬 수 있다. 다른 실시 상태로서, 숙주 세포는 바이오매스에 의한 발효 공정 내에서 이러한 폴리펩타이드의 공급원으로서 사용될 수 있다. 숙주 세포는 셀룰로오스가수분해 단백질을 암호화하는 천연 또는 이종 유전자 및 바이오매스를 가공하기 위한 다른 효소를 포함할 수 있다.

- <71> 바이오매스는 목재, 도시 고체 폐기물, 폐지, 농작물, 및 농작물 부산물을 포함할 수도 있으나 이에 한정되지 않는다(예를 들면, Wiselogle et al., 1995, in Handbook on Bioethanol(Charles E. Wyman, editor), pp.105-118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of lignocellulosics, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer-Verlag, New York).
- <72> 바이오매스의 1차 세포벽 내의 주된 다당류는 셀룰로오스이며, 두번째로 많은 것은 헤미-셀룰로오스이고, 세번째는 펙틴이다. 세포가 성장을 멈춘 후 생성되는 2차 세포벽은 다당류를 포함하며, 헤미셀룰로오스와 공유 가교 결합된 고분자성 리그닌에 의하여 강화된다. 셀룰로오스는 안하이드로셀로바이오스의 단독중합체이고 따라서 선형 베타-(1-4)-D-글루칸이며, 반면 헤미셀룰로오스는 다양한 화합물, 예컨대, 치환체의 스펙트럼을 보유한 복합 가지 구조를 지닌 자일란, 자일로글루칸, 아라비노자일란, 및 만난을 포함한다. 일반적으로 다형성임에도, 셀룰로오스는 평행형 글루칸 사슬의 불용성 결정형 매트릭스로서 1차적으로 식물 조직 내에서 발견된다. 헤미셀룰로오스는 일반적으로 셀룰로오스, 및 다른 헤미셀룰로오스와 수소 결합하며, 이는 세포벽 매트릭스의 안정화에 기여한다.
- <73> **셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드 및 이들의 폴리뉴클레오타이드**
- <74> 본 발명의 제1 특징으로서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 분리된 폴리펩타이드로서, 다음의 모티브를 포함한다:
- <75> [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ]으로서, x는 모든 아미노산, x(4,5)는 4 또는 5 근접 위치상의 모든 아미노산이며, x(3)은 3 근접 위치상의 모든 아미노산이다. 상기 모티브에 있어서, 널리 쓰이는 IUPAC 단일 분자 아미노산 축약어가 사용되었다.
- <76> 본 발명의 제2 특징으로서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 분리된 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드 (즉, 성숙 폴리펩타이드)와 최소한 75%, 바람직하게는 최소한 80%, 더 바람직하게는 최소한 85%, 더욱 더 바람직하게는 최소한 90%, 가장 바람직하게는 최소한 95%, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 일치하는 아미노산 서열을 보유하며, 이는 셀룰로오스가수분해 증진 활성 (이하 "상동 폴리펩타이드")을 보유하게 된다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 상동 폴리펩타이드는 10 아미노산, 바람직하게는 5 아미노산, 더 바람직하게는 4 아미노산, 더욱 더 바람직하게는 3 아미노산, 가장 바람직하게는 2 아미노산이고, 가장 더 바람직하게는 1 개의 아미노산이 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드와 차이 나는 아미노산 서열을 보유한다.
- <77> 본 발명의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 바람직하게는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 이들의 대립 변이체; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편을 포함한다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드를 포함한다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249, 또는 이들의 대립 변이체; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249를 포함한다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 이들의 대립 변이체; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편으로 구성된다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열로 구성되어 있다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드로 구성되어 있다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249 또는 이들의 대립 변이체; 또는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 이들의 절편으로 구성된다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249로 구성된다.
- <78> 본 발명의 제3 특징으로서, 본 발명은 최소한 매우 낮은 엄격 조건, 바람직하게는 최소한 낮은 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 내지 높은 엄격 조건, 더욱 더 바람직하게는 최소한 높은 엄격 조건, 및 가장 바람직하게는 최소한 매우 높은 엄격 조건하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, (iii) (i) 또는 (ii)의 하위서열, 또는 (iv) (i), (ii), 또는 (iii)의 상보적 가닥과 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화되는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이다(J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition,

Cold Spring Harbor, New York). SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열의 하위서열은 최소한 100 개의 인접한 뉴클레오타이드 또는 바람직하게는 최소한 200 개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함한다. 이에 더하여, 하위서열은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드 절편을 암호화할 수 있다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766이다.

<79> SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 하위서열; 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 이들의 절편을 핵산 서열 프로브 설계에 사용하여 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다른 종(species) 또는 속(genera)의 균주들로부터 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 동정 및 클론할 수 있다. 특히, 이러한 프로브는 표준 서던 블롯팅 기법을 따라 관심 대상의 속 또는 종의 게놈 또는 cDNA와 혼성화함으로써 그 내부의 상응하는 유전자를 동정하고 분리하기 위하여 사용할 수 있다. 이러한 프로브는 전체 서열보다 상당히 짧을 수 있으나, 길이가 최소한 14, 바람직하게는 최소한 25, 더 바람직하게는 최소한 35, 및 가장 바람직하게는 최소한 70 뉴클레오타이드이다. 그러나, 핵산 서열 프로브는 길이가 최소한 100 뉴클레오타이드인 것이 바람직하다. 예를 들면, 핵산 서열 프로브는 길이가 최소한 200 뉴클레오타이드, 바람직하게는 최소한 300 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 최소한 400 뉴클레오타이드, 또는 가장 바람직하게는 최소한 500 뉴클레오타이드일 수 있다. 더 긴 프로브를 사용할 수도 있으며, 예컨대, 길이가 최소한 600 뉴클레오타이드, 최소한 바람직하게는 최소한 700 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 최소한 800 뉴클레오타이드, 또는 가장 바람직하게는 최소한 900 뉴클레오타이드인 핵산 서열 프로브를 사용할 수 있다. DNA 및 RNA 프로브 둘 다 사용될 수 있다. 프로브는 일반적으로 상응하는 유전자를 검출하기 위하여 (예를 들면, ^{32}P , ^3H , ^{35}S , 바이오틴, 또는 아비딘으로) 표지된다. 이러한 프로브는 본 발명에 의하여 포괄된다.

<80> 이러한 다른 유기체로부터 생성된 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리는 따라서 전술한 프로브로 혼성화한 DNA로 선별되며, 이들은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화한다. 이러한 다른 유기체 게놈 또는 다른 DNA는 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 또는 다른 분리 기술에 의하여 분리될 수 있다. 라이브러리의 DNA 또는 분리된 DNA는 이동되어 니트로셀룰로오스 또는 다른 적합한 담체 물질 상에 고정된다. SEQ ID NO: 1, 또는 이들의 하위서열과 상동인 클론 또는 DNA를 동정하기 위하여, 담체 물질은 서던 블롯에 사용되는 것이 바람직하다.

<81> 본 발명의 목적을 위하여, 혼성화는 매우 낮은 엄격 조건 내지 매우 높은 엄격 조건 하에서 뉴클레오타이드 서열이 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 이들의 상보적 가닥, 또는 이들의 하위서열에 상응하는 표지된 핵산 서열 프로브와 혼성화한다는 것을 나타낸다. 이러한 조건 하에서 핵산 서열 프로브와 혼성화된 분자는, 예를 들면, X-선 필름을 사용하여 검출할 수 있다.

<82> 본 발명의 양호한 특징으로서, 핵산 서열 프로브는 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 핵산 서열 프로브는 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 73 내지 1259이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 핵산 서열 프로브는 SEQ ID NO: 2의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 하위서열이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 핵산 서열 프로브는 에شري시아 콜리(*Escherichia coli*, 대장균) NRRL B-30878 내에 함유된 플라스미드 pTr3337에 함유된 폴리뉴클레오타이드 서열이며, 여기서 이들의 폴리뉴클레오타이드 서열은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화한다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 핵산 서열 프로브는 에شري시아 콜리(대장균) NRRL B-30878에 함유된 플라스미드 pTr3337에 함유된 성숙 폴리펩타이드 암호화 영역이다.

<83> 길이가 최소한 100 뉴클레오타이드의 긴 프로브를 위하여, 매우 낮은 엄격 조건 내지 매우 높은 엄격 조건은 선 혼성화 및 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 전단 및변성된 연어 정자 DNA에서 42°C로 혼성화로 정의되었으며, 12 내지 24 시간 동안 최적으로 표준 서던 블롯팅 절차를 따르는 경우 매우 낮은 엄격성 및 낮은 엄격성을 위하여 25% 포름아미드, 중간 엄격성 및 중간 내지 높은 엄격성을 위하여 35% 포름아미드, 또는 높은 엄격성 및 매우 높은 엄격성을 위하여 50% 포름아미드이다.

<84> 길이가 최소한 100 뉴클레오타이드의 긴 프로브를 위하여, 담체 물질을 바람직하게는 최소한 45°C (매우 낮은 엄격성), 더 바람직하게는 최소한 50°C (low 엄격성), 더 바람직하게는 최소한 55°C (중간 엄격성), 더 바람직하게는 최소한 60°C (중간 내지 높은 엄격성), 더욱 더 바람직하게는 최소한 65°C (높은 엄격성), 및 가장 바람직하게는 최소한 70°C (매우 높은 엄격성)에서 각각 15분간 2X SSC, 0.2% SDS를 사용하여 3회 수세한다.

<85> 길이가 약 15 뉴클레오타이드 내지 약 70 뉴클레오타이드인 짧은 프로브를 위하여, 엄격 조건은 12 내지 24 시

간 동안 최적으로 표준 서던 블롯팅 절차를 따르는 경우 0.9 M NaCl, 0.09 M Tris-HCl pH 7.6, 6 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1X 덴하르트 용액, 1 mM 피로포스페이트 나트륨, 1 mM 단염기성 인산 나트륨, 0.1 mM ATP, 및 0.2 mg의 효모 RNA/ml 내에서 볼튼 및 맥커티(Bolton and McCarthy, 1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390)에 따른 계산법을 사용하여 계산된 Tm 이하인 약 5°C 내지 약 10°C에서 선히성화, 혼성화 및 수세후-혼성화로 정의된다.

<86> 길이가 약 15 뉴클레오타이드 내지 약 70 뉴클레오타이드인 짧은 프로브를 위하여, 담체 물질은 먼저 6X SCC 및 0.1% SDS에서 15 분간 수세하고, 두 번째로 6X SSC를 사용하여 15 분간 계산된 Tm 이하의 5°C 내지 10°C에서 수세한다.

<87> 본 발명의 제4의 특징으로서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드 또는 이들의 상동 서열의 하나 이상의 아미노산; 또는 이들의 성숙 폴리펩타이드의 보존적 치환, 결실, 및/또는 삽입을 포함하는 인공 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 변화는 주요하지 않은 특성이며, 이는 단백질의 접힘 및/또는 활성에 현저하게 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환 또는 삽입; 일반적으로 1 내지 약 30 아미노산인 소량의 결실; 소량의 아미노- 또는 카르복실-말단 확장, 예컨대, 아미노-말단 메티오닌 잔기; 약 20-25 잔기까지의 소량의 링커 펩타이드; 또는 순 전하를 변화시킴으로써 정제를 촉진하거나 또는, 예컨대, 폴리-히스티딘 극소량, 항원성 에피토프 또는 결합 도메인 등의 다른 기능을 촉진시키는 소량의 확장이다.

<88> 보존적 치환의 예는 염기성 아미노산 (아르기닌, 라이신 및 히스티딘), 산성 아미노산 (글루탐산 및 아스파라긴산), 극성 아미노산 (글루타민 및 아스파라긴), 소수성 아미노산 (류신, 이소류신 및 발린), 방향성 아미노산 (페닐알라닌, 트립토판 및 티로신), 및 소형 아미노산 (글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌 및 메티오닌)의 군에 포함되어 있다. 일반적으로 특정 활성을 변화시키지 못하는 아미노산 치환은 공지되어 있으며, 예를 들면, H. Neurath and R.L. Hill, 1979, The Protein, Academic Press, New York에 설명되어 있다. 가장 일반적으로 발생하는 교환은 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, 및 Asp/Gly이다. 20 개의 표준 아미노산과 함께, 비-표준 아미노산 (예컨대, 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸 라이신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린, 및 알파-메틸 세린)이 야생형 폴리펩타이드의 아미노산 잔기에 치환될 수 있다. 제한된 수의 비-보존적 아미노산, 유전자 코드에 의하여 암호화되지 않은 아미노산, 및 비자연성 아미노산은 아미노산 잔기에 치환될 수 있다. "비자연성 아미노산"은 단백질 합성 후 변형된 것이거나, 및/또는 측쇄(들)이 표준 아미노산과는 다른 화학적 구조를 갖는 것이다. 비자연성 아미노산은 화학적으로 합성될 수 있으며, 바람직하게는, 구득할 수 있고, 여기에는 피페콜린산, 티아졸리딘 카르복실산, 테하이드로프롤린, 3- 및 4-메틸프롤린, 및 3,3-디메틸프롤린을 포함한다.

<89> 다른 실시 상태로서, 아미노산 변화는 폴리펩타이드의 물리-화학적 특성이 변경되는 것이다. 예를 들면, 아미노산 변화는 폴리펩타이드의 열적 안정성, 최적 pH의 변화 등을 개선할 수 있다.

<90> 모(母) 폴리펩타이드 내의 필수 아미노산은 당해 기술 분야에 공지된 방법, 예컨대, 부위-지향성 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발 (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085) 등을 따라서 동정될 수 있다. 후자의 기술에 있어서, 단일 알라닌 돌연변이는 분자 내의 모든 잔기로 도입되며, 결과 돌연변이 분자는 분자의 활성에 결정적인 아미노산 잔기를 동정하기 위하여 생물학적 활성(즉, 셀룰로오스가수분해 증진 활성)이 시험되었다. 문헌 Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 : 4699-4708를 참조한다. 추정 접촉 부위 아미노산의 돌연변이에 관하여 핵 자기 공명, 결정 분석법, 전자 회절, 또는 광친화도 표지법 등의 기술에 의하여 측정되는 것과 같이 효소의 활성 부위 또는 다른 생물학적 상호작용은 구조의 물리적 분석을 통하여 측정될 수도 있다. 예를 들면, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64를 참조한다. 필수 아미노산의 일치성은 본 발명에 따른 폴리펩타이드에 관련된 폴리펩타이드로 일치성 분석을 통하여 추론할 수 있다.

<91> 단일 또는 다중 아미노산 치환을 관련 선별 절차를 따르는 공지의 돌연변이유발, 재조합법, 및/또는 서플링 방법에 의하여 제조하고 시험할 수 있으며, 예컨대, Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; 또는 WO 95/22625에 개시하였다. 사용할 수 있는 다른 방법에는 오류-빈발(error-prone) PCR, 파지 디스플레이(예컨대, Lowman et al., 1991, Biochem. 30: 10832-10837; 미국 등록 특허 번호 5,223,409; WO 92/06204), 및 영역-지향 돌연변이유발 (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; tier et al., 1988, DNA 7: 127)가 포함된다.

<92> 돌연변이유발/서플링 방법은 숙주 세포에 의하여 발현되어 클론되고, 돌연변이유발된 폴리펩타이드의 활성을 검

출하기 위하여 고-처리량, 자동화 선별 방법과 결합하여 사용될 수 있다(Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). 활성 폴리펩타이드를 암호화하는 돌연변이유발된 DNA 분자를 숙주 세포로부터 회수할 수 있으며, 당해 기술 분야의 표준 방법을 사용하여 신속하게 시퀀싱 할 수 있다. 이러한 방법에 의하여 대상 폴리펩타이드 내의 개별적인 아미노산 잔기의 중요도를 신속하게 측정하게 되며, 미지의 폴리펩타이드 구조에 적용할 수 있다. SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입된 총 수는 10, 바람직하게는 9, 더 바람직하게는 8, 더 바람직하게는 7, 더 바람직하게는 최대한 6, 더 바람직하게는 5, 더 바람직하게는 4, 더욱 더 바람직하게는 3, 가장 바람직하게는 2, 및 가장 더 바람직하게는 1이다.

<93> 본 발명의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 모든 속(genus)의 미생물에서 획득할 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 소정의 공급원에 관하여 본원에서 사용되는 "로부터 획득한"이라는 표현은 뉴클레오타이드 서열에 의하여 암호화된 폴리펩타이드가 공급원에 의하여 또는 공급원에서 유래한 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 균주에 의하여 생산되었음을 의미한다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 소정의 공급원으로부터 획득한 폴리펩타이드는 세포외로 분비된다.

<94> 본 발명의 폴리펩타이드는 박테리아 폴리펩타이드가 될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드 그람 양성 박테리아 폴리펩타이드, 예컨대, 바실루스(*Bacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 락토바실루스(*LactoBacillus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 지오바실루스(*GeoBacillus*), 또는 오세아노바실루스(*OceanoBacillus*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드이거나, 또는 그람 음성 박테리아 폴리펩타이드, 예컨대, 대장균(*E. coli*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 살모넬라(*Salmonella*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 헬리코박터(*Helicobacter*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*), 일요박터(*Ilyobacter*), 네이세리아(*Neisseria*), 또는 우레아플라스마(*Ureaplasma*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드일 수 있다.

<95> 본 발명의 양호한 특징으로서, 폴리펩타이드는 바실루스 알칼로필루스(*Bacillus alkalophilus*), 바실루스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실루스 브레비스(*Bacillus brevis*), 바실루스 서쿨란스(*Bacillus Clrculans*), 바실루스 클라우시(*Bacillus clausii*), 바실루스 코아쿨란스(*Bacillus coagulans*), 바실루스 피르무스(*Bacillus firmus*), 바실루스 라우투스(*Bacillus lautus*), 바실루스 렌투스(*Bacillus lentus*), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 바실루스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*), 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 또는 바실루스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드이다.

<96> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 스트렙토코커스 에퀴시밀리스(*Streptococcus equisimilis*), 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 유베리스(*Streptococcus uberis*), 또는 스트렙토코커스 에퀴니 아종. 주에피데미쿠스(*Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드이다.

<97> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 스트렙토마이세스 아크로모제네스(*Streptomyces achromogenes*), 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*), 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*), 또는 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드.

<98> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 진균 폴리펩타이드, 더 바람직하게는 효모 폴리펩타이드 예컨대, 칸디다(*Candida*), 클루베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 또는 야로위아(*Yarrowia*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드; 또는 더 바람직하게는 사상 진균(filamentous fungal) 폴리펩타이드 예컨대, 아크레모니움(*Acremonium*), 아스퍼길루스(*Aspergillus*), 아우레오바시디움(*Aureobasidium*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 필리바시디움(*Filibasidium*), 푸사리움(*Fusarium*), 휴미콜라(*Humicola*), 마그나포르테(*Magnaporthe*), 뮤코르(*Mucor*), 마이셀리오프토라(*Myceliophthora*), 네오칼리마스틱스(*Neocallimastix*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 파에실로마이세스(*Paecilomyces*), 페니실리움(*Penicillium*), 피로마이세스(*Piromyces*), 스킴조필룸(*Schizophyllum*), 타라로마이세스(*Talaromyces*), 더모아스쿠스(*Thermoascus*), 티에라비아(*Thielavia*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 또는 트리코데르마(*Trichoderma*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드이다.

- <99> 본 발명의 양호한 특징으로서, 폴리펩타이드는 사카로마이세스 갈스베르겐시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 디아스타티쿠스(*Saccharomyces diastaticus*), 사카로마이세스 도우갈라시(*Saccharomyces douglasii*), 사카로마이세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 사카로마이세스 노르벤시스(*Saccharomyces norbensis*), 또는 사카로마이세스 오비포르미스(*Saccharomyces oviformis*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드이다.
- <100> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 폴리펩타이드는 아스퍼길루스 아쿨레아투스(*Aspergillus aculeatus*), 아스퍼길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼길루스 포에티두스(*Aspergillus foetidus*), 아스퍼길루스 자포니쿠스(*Aspergillus japonicus*), 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*), 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*), 코프린루스 시네레우스(*Coprinus cinereus*), 디플로디아 고시피나(*Diplodia gossypina*), 푸사리움 박트리디오이데스(*Fusarium bactridioides*), 푸사리움 세레알리스(*Fusarium cerealis*), 푸사리움 크록웰렌스(*Fusarium crookwellense*), 푸사리움 쿨모룸(*Fusarium culmorum*), 푸사리움 그라미네아툼(*Fusarium graminearum*), 푸사리움 그라미눔(*Fusarium graminum*), 푸사리움 헤테로스포룸(*Fusarium heterosporum*), 푸사리움 네군디(*Fusarium negundi*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 레티쿨라툼(*Fusarium reticulatum*), 푸사리움 로세움(*Fusarium roseum*), 푸사리움 삼부시눔(*Fusarium sambucinum*), 푸사리움 사르코크로움(*Fusarium sarcochromum*), 푸사리움 스포로트리키오이데스(*Fusarium sporotrichioides*), 푸사리움 숄푸레움(*Fusarium sulphureum*), 푸사리움 토루로숨(*Fusarium torulosum*), 푸사리움 트리코테시오이데스(*Fusarium trichothecoides*), 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*), 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 휴미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*), 마그나포르테 그리세아(*Magnaporthe grisea*), 뮤코르 미에헤이(*Mucor miehei*), 마이셀리오파토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*), 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*), 페니실리움 푸르푸로제눔(*Penicillium purpurogenum*), 파네로카에타 체리소스포리움(*Phanerochaete chrysosporium*), 슈도플렉타니아 니그렐라(*Pseudoplectania nigrella*), 더모아스쿠스 아우란티아쿠스(*Thermoascus aurantiacus*), 티에라비아 테레스트리스(*Thielavia terrestris*), 트리코테르마 하르지아눔(*Trichoderma harzianum*), 트리코테르마 코닝기(*Trichoderma koningii*), 트리코테르마 롱기브라치아툼(*Trichoderma longibrachiatum*), 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*), 또는 트리코테르마 비리데(*Trichoderma viride*) 또는 트리코파에아 사카타(*Trichophaea saccata*)의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드이다.
- <101> 본 발명의 더욱 바람직한 특징으로서, 폴리펩타이드는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*)의 폴리펩타이드이다. 본 발명의 가장 양호한 특징으로서, 폴리펩타이드는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) RutC30 (ATCC 56765)의 폴리펩타이드, 예컨대, SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 이들의 절편을 포함하는 폴리펩타이드, 예컨대, 성숙 폴리펩타이드이다.
- <102> 전술한 중에 있어서, 본 발명은 완전한 상태 및 불완전한 상태 모두, 및 분류학적으로 동등한 것, 예컨대, 알려진 종 이름과 무관하게 무성생식형 등을 포괄한다는 것을 이해하여야 한다. 당해 기술 분야의 숙련자는 적합한 동류의 일치성을 쉽게 인식할 수 있다.
- <103> 이러한 종의 균주는 다수의 미생물 기탁 기관, 예컨대, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC), 도이체 잠룽 폰 미크로오르가니즘엔 운트 젤쿨트렌 게엠베하(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSM), 사군 배지 중앙 보관소(Centraalbureau Voor Schimmelcultures, CBS), 및 아그리컬처럴 리서치 서비스 패턴트 컬처 컬렉션(Agricultural Research Service Patent Culture Collection), 노던 레지오널 리서치 센터(Northern Regional Research Center, NRRL)로부터 공개적으로 손쉽게 입수할 수 있다. 더욱이, 이러한 폴리펩타이드는 자연 (예컨대, 토양, 퇴비, 물, 등.)으로부터 분리된 미생물을 포함하는 다른 공급원으로부터 획득하고, 동정될 수 있다. 천연 자생지로부터 미생물을 분리하는 기술은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 폴리뉴클레오타이드는 이러한 미생물의 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 유사하게 선별하여 획득할 수 있다. 폴리폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 프로브(들)에 의하여 검출되는 경우, 폴리뉴클레오타이드는 당해 기술 분야의 숙련자에게 알려진 활용 기술에 의하여 분리되거나 또는 클론될 수 있다(예컨대, Sambrook et al., 1989, 전제서).
- <104> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 융합된 폴리펩타이드 또는 분해가능한 융합 폴리펩타이드를 포함할 수도 있으며, 다른 폴리펩타이드가 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 지닌 폴리펩타이드 또는 이들의 절편의 N-말단 또는 C-말단에서 융합된다. 융합된 폴리펩타이드는 다른 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 (또는 이들의 부분)과 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레

오타이드 서열 (또는 이들의 부분)을 융합하여 생성할 수 있다. 융합 폴리펩타이드 생성 기술은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 폴리펩타이드를 암호화하는 암호화 서열의 결찰을 포함하므로 이들은 프레임 내에 존재하여, 융합된 폴리펩타이드의 발현이 동일한 프로모터(들) 종결자의 조절하에 있게 된다.

- <105> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 보유하는 폴리뉴클레오타이드는 분리되고 전술한 바와 같이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.
- <106> 본 발명의 양호한 특징으로서, 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 1로 설명된다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 뉴클레오타이드 서열은 대장균(*E. coli*) NRRL B-30878에 함유된 플라스미드 pTr3337를 함유한 서열이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 영역이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 뉴클레오타이드 서열은 대장균(*E. coli*) NRRL B-30878 내에 함유된 플라스미드 pTr3337에 함유된 성숙 폴리펩타이드 암호화 영역이다. 본 발명은 유전자 코드의 퇴화에 의하여 SEQ ID NO: 1 또는 이들의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열과 달라진 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열 또는 이들의 성숙 폴리펩타이드를 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포괄한다. 본 발명은 또한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 SEQ ID NO: 2의 절편을 암호화한 SEQ ID NO: 1의 하위서열에 관한 것이다.
- <107> 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열 내의 최소한 하나의 돌연변이를 포함하는 돌연변이 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 여기서 돌연변이 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드를 암호화한다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 성숙 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249이다.
- <108> 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 분리 또는 클론하기 위한 기술은 공지되어 있으며, 게놈 DNA, cDNA의 제조품, 또는 이들의 조합으로부터의 분리를 포함한다. 이러한 게놈 DNA의 폴리뉴클레오타이드의 클로닝은 클론된 DNA 절편을 검출하기 위하여, 예컨대, 잘 알려진 폴리머라아제 사슬 반응 (PCR) 또는 발현 라이브러리의 항체 선별법에 의하여 달성된다. 예컨대, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Method and Application, Academic Press, New York를 참조한다. 그 밖의 핵산 서열 증폭 방법 예컨대, 리가아제 사슬 반응 (LCR), 결찰 활성화 전사 (LAT) 및 뉴클레오타이드 서열-기초 증폭 (NASBA)을 사용할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 트리코데르마(*Trichoderma*)의 균주, 또는 다른 또는 유관 유기체에서 클론될 수 있으며, 따라서, 예를 들면, 뉴클레오타이드 서열의 폴리펩타이드 암호화 영역의 대립 또는 중 변이체가 될 수 있다. 본 발명의 방법에 있어서, 폴리뉴클레오타이드는 활성 폴리펩타이드를 암호화하는 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열 (즉, 뉴클레오타이드 388 내지 1332)과 최소한 75%, 바람직하게는 최소한 80%, 더 바람직하게는 최소한 85%, 더욱 더 바람직하게는 최소한 90%, 가장 바람직하게는 최소한 95%, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 96%, 97%, 98%, 또는 99% 일치하는 뉴클레오타이드를 보유한다.
- <109> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 변형은 폴리펩타이드와 실질적으로 유사한 폴리펩타이드의 합성에 필요할 수 있다. 폴리펩타이드와 "실질적으로 유사한"이라는 표현은 비-자연 발생적 형태의 폴리펩타이드를 말한다. 이러한 폴리펩타이드는 이들의 천연 공급원, 예컨대, 특이적 활성, 열적안정성, 최적 pH, 등에서 차이가 있는 인공 변이체로부터 분리된 폴리펩타이드와 공학적 관점에서 일부 차이가 있다. 변이체 서열은 SEQ ID NO: 1의 폴리펩타이드 암호화 영역으로 제공된 뉴클레오타이드 서열, 예컨대, 이들의 하위서열 등을 기초로 구축될 수 있거나 및/또는 효소 생산을 위하여 의도된 숙주 유기체의 코돈 용도에 상응하는 뉴클레오타이드 서열에 의하여 암호화된 폴리펩타이드의 다른 아미노산 서열을 야기시키지 못하는 뉴클레오타이드 치환을 도입하거나 또는 다른 아미노산 서열을 야기시킬 수 있는 뉴클레오타이드 치환을 도입함으로써 구축할 수 있다. 클레오타이드 치환에 관한 일반적인 설명을 위하여, 예컨대, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107을 참조한다.
- <110> 이러한 치환은 분자 기능에 결정적인 영역 외에서 만들어지므로 여전히 활성 폴리펩타이드가 된다는 것은 당해 기술 분야의 숙련자에게 자명하다. 본 발명의 분리된 폴리뉴클레오타이드에 의하여 암호화된 폴리펩타이드의 활성에 필수적이며, 따라서, 바람직하게는 치환되지 않은 아미노산 잔기는 공지의 방법, 예컨대, 부위-지향 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발 (예컨대, Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085)에 의하여 동정될 수 있다. 후자의 기법에 있어서, 돌연변이는 분자 내의 모든 양성 대전 잔기에 도입되며, 결과 돌연변이 분자는 분자의 활성에 결정적인 아미노산 잔기를 동정하기 위하여 셀룰로오스가수분해 증진 활성이 시험되었다. 기질-효소 상호작용의 부위는 핵 자기 공명 분석, 결정 분석법 또는 광친화도 표지법 (예컨대, de

Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64) 등의 기술에 의하여 측정되는 3차원 구조의 분석에 의하여 결정될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 전술한 바와 같이 최소한 매우 낮은 엄격 조건, 바람직하게는 최소한 낮은 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 엄격 조건, 더 바람직하게는 최소한 중간 내지 높은 엄격 조건, 더욱 더 바람직하게는 최소한 높은 엄격 조건, 및 가장 바람직하게는 최소한 매우 높은 엄격 조건 하에서 (i) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열, (ii) SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열, 또는 (iii) (i) 또는 (ii)의 상보적 서열; 또는 대립 변이체 및 이들의 하위서열과 혼성화된 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 될 수 있다(Sambrook et al., 1989, 전제서). 본 발명의 양호한 특징으로서, 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열은 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오타이드 77 내지 766이다.

<11> 핵산 서열 구조체

<12> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드는 조절 서열에 적합한 조건 하의 적합한 숙주 세포 내에서 암호화 서열의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 결합된 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열 구조체를 구축함으로써 폴리펩타이드의 발현을 제공하기 위한 다양한 방법으로 조작될 수 있다. 벡터 삽입 전에 폴리뉴클레오타이드 서열을 조작하는 것은 발현 벡터에 따라 바람직하거나 또는 필수적이다. 재조합 DNA 방법을 활용하여 폴리뉴클레오타이드 서열을 변형시키는 기술은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.

<13> 조절 서열은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 위한 숙주 세포에 의하여 인식되는 뉴클레오타이드 서열인 적절한 프로모터 서열이 될 수 있다. 프로모터 서열은 폴리펩타이드의 발현을 매개하는 전사 조절 서열을 함유한다. 프로모터는 돌연변이, 절단, 및 혼성 프로모터를 포함하는 숙주 세포의 선택에 있어서 전사 활성을 나타내는 모든 뉴클레오타이드 서열이 될 수 있으며, 숙주 세포에 상동 또는 이종인 세포외 또는 세포내 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자로부터 획득할 수 있다.

<14> 특히, 박테리아 숙주 세포 내에서 본 발명의 핵산 구조물의 전사를 조절하는 적합한 프로모터의 예는 이. 콜리 (*E. coli*) lac 오페론, 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*) 아가라아제 유전자(dagA), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 레반슈크라아제 유전자(sacB), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 알파 아밀라아제(알파-아밀라아제) 유전자(amyL), 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) 말토오스형성 아밀라아제 유전자 (amyM), 바실루스 아밀로리큐에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 알파 아밀라아제 유전자 (amyQ), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 페니실리나아제 유전자 (penP), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) xylA 및 xylB 유전자, 및 원핵 베타-락타마아제 유전자 (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731)로부터 획득한 프로모터 및 tac 프로모터 (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21- 25)이다. 추가의 프로모터가 문헌 "Useful Proteins from Recombination bacteria" in Scientific American, 1980, 242: 74-94; 및 Sambrook et al., 1989 전제서에 기재되어 있다.

<15> 사상 진균 숙주 세포 내에서 본 발명의 핵산 구조물의 전사를 조절하는 적합한 프로모터의 예는 아스페길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 리조뮤코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 아스파틴 프로테이나아제, 아스페길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 뉴트럴 알파-아밀라아제, 아스페길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 산 안정성 알파-아밀라아제, 아스페길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 또는 아스페길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*) 글루코아밀라아제 (glaA), 리조뮤코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 리파아제, 아스페길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 염기성 프로테아제, 아스페길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 트리오스 포스페이트 아이소머라아제, 아스페길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 아세타미나아제, 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*) 아밀로글루코시다아제(WO 00/56900), 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*) 다리아(Daria)(WO 00/56900), 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*) 퀴인(Quinn)(WO 00/56900), 푸사리움 옥시스포름(*Fusarium oxysporum*) 티로신 유사 프로테아제(WO 96/00787), 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 베타-글루코시다아제, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 셀로바이오하이드롤라아제 I, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 엔도뉴클레아제 I, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 엔도뉴클레아제 II, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 엔도뉴클레아제 III, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 엔도뉴클레아제 IV, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 엔도뉴클레아제 V, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 자일라나아제 I, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 자일라나아제 II, 트

리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 베타-자일로시다아제, 및 NA2-tpi 프로모터 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 뉴트럴 알파-아밀라아제 및 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 트리오스 포스페이트 아이소머라아제의 유전자의 프로모터의 혼성화)의 유전자로부터 획득한 프로모터이고; 이들의 돌연변이, 절단, 및 혼성 프로모터이다.

- <116> 효모 숙주 내에서, 유용한 프로모터는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 에놀라아제(ENO-1), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 갈락토키나아제 (GAL1), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알콜 디하이드로지나아제/글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나아제 (ADH1, ADH2/GAP), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 트리오스 포스페이트 아이소머라아제 (TP1), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 메탈로티오닌 (CU P1), 및 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 3-포스포글리세르에이트 키나아제의 유전자로부터 획득한다. 그 밖의 유용한 효모 숙주 세포의 프로모터는 Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488에 기술되어 있다.
- <117> 조절 서열은 적합한 전사 종료자 서열, 즉, 숙주 세포가 전사를 종결하도록 인식하는 서열이다. 상기 종료자 서열은 상기 폴리펩타이드를 암호화한 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에 작동가능하게 결합 되었다. 선택된 숙주 세포 내에서 기능하는 모든 종료자가 본 발명에 사용될 수 있다.
- <118> 사상 진균 숙주 세포의 양호한 종료자는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제, 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 안트라닐레이트 신테테이즈, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 알파-글루코시다아제, 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 티로신-유사 프로테아제의 유전자로부터 획득한다.
- <119> 효모 숙주 세포의 양호한 종료자는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 에놀라아제, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 사이토크롬 C (CYC1), 및 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나아제의 유전자로부터 획득한다. 효모 숙주 세포의 다른 유용한 종료자는 전술한 Romanos *et al.*, 1992에 기재되어 있다.
- <120> 조절 서열은 적합한 선도 서열, 즉, 숙주 세포에 의한 번역에 중요한 mRNA의 비번역 영역일 수 있다. 상기 선도 서열은 상기 폴리펩타이드를 암호화한 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단에 작동가능하게 결합된다. 선택된 숙주 세포에서 기능하는 모든 선도 서열이 본 발명에 사용될 수 있다.
- <121> 사상 진균 숙주 세포의 양호한 선도체는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제 및 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 트리오스 포스페이트 아이소머라아제의 유전자로부터 획득한다.
- <122> 효모 숙주 세포의 적합한 선도체는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 에놀라아제 (ENO-1), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 3-포스포글리세르에이트 키나아제, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알파-인자, 및 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알콜 디하이드로지나아제/글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나아제 (ADH2/GAP)의 유전자로부터 획득한다.
- <123> 상기 조절 서열은 폴리아데닐화 서열, 즉 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에 작동가능하게 결합된 서열일 수 있으며, 상기 서열은 전사시 숙주 세포에 의하여 폴리아데노신 잔기에 전사된 mRNA를 부가하라는 신호로 인식된다. 선택된 숙주 세포에서 기능을 하는 모든 폴리아데닐화 서열이 본 발명에 사용될 수 있다.
- <124> 사상 진균 숙주 세포를 위한 양호한 폴리아데닐화 서열은 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제, 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 안트라닐염 합성효소, 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 티로신-유사 프로테아제, 및 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 알파-글루코시다아제의 유전자로부터 획득한다.
- <125> 효모 숙주 세포를 위한 유용한 폴리아데닐화 서열은 문헌 Guo and Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990에 기재되어 있다.
- <126> 상기 조절 서열은 폴리펩타이드의 아미노 말단에 결합된 아미노산 서열의 암호이며, 암호화된 폴리펩타이드를 세포의 분비 경로로 향하게 하는 신호 펩타이드 암호화 영역일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열의 암호화 서열의 5' 말단은 번역 해독틀 내에서 분비되는 폴리펩타이드를 암호화한 암호화 영역의 일부와 자연적으로 결합된 신호 펩타이드 암호화 영역을 생래적으로 함유한다. 또한, 상기 암호화 서열의 5' 말단은 암호화 서열에 외래의 것인 신호 펩타이드 암호화 영역을 함유할 수 있다. 상기 외래 신호 펩타이드 암호화 영역은 암호화 서열이 신

호 펩타이드 암호화 영역을 원래 함유하지 않았던 경우에 필요할 수 있다. 또한, 상기 외래 신호 펩타이드 암호화 영역은 신호 펩타이드 암호화 영역과 단순히 치환됨으로써 상기 폴리펩타이드의 분비를 증진하게 된다. 그러나, 상기 발현된 폴리펩타이드를 선택된 숙주 세포의 분비 경로로 향하게 하는 모든 신호 펩타이드 암호화 영역은 본 발명에 사용될 수 있다.

- <127> 박테리아 숙주 세포의 효과적인 신호 펩타이드 암호화 영역은 바실루스(*Bacillus*) NC1B 11837 말토오스생성 아밀라아제, 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) 알파-아밀라아제, 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 서브틸리신(서브틸리신), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 베타-락타마아제, 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) 뉴트럴 프로테아제 (nprT, nprS, nprM), 및 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) prsA의 유전자로부터 획득한 신호 펩타이드 암호화 영역이다. 추가의 신호 펩타이드는 문헌 Simonen and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137에 기재되어 있다.
- <128> 사상 진균 숙주 세포의 효과적인 신호 펩타이드 암호화 영역은 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 뉴트럴 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제, 리조뮤코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 아스파라긴산 프로테인나아제, 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) 셀룰라아제, 및 휴미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*) 라파아제의 유전자로부터 획득한 신호 펩타이드 암호화 영역이다.
- <129> 본 발명의 양호한 실시상태에서, 상기 신호 펩타이드 암호화 영역은 SEQ ID NO:2의 아미노산 -165 내지 -142를 암호화한 SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드 1 내지 72 이다.
- <130> 효모 숙주 세포에 유용한 신호 펩타이드는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알파-인자 및 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 인버타아제의 유전자로부터 획득한다. 다른 유용한 신호 펩타이드 암호화 영역은 전술한 문헌 Romanos et al., 1992에 기재되어 있다.
- <131> 조절 서열 전사를 종결시키는 숙주세포에 의하여 인식되는 서열인 적합한 전사 종결자 서열일 수 있다. 종결자 서열은 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에 작동가능하게 결합된다. 선택된 숙주 세포 내에서 기능성인 모든 종결자가 본 발명에서 사용될 수 있다.
- <132> 사상진균 숙주 세포에서 선호되는 종결자는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제, 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 안트라닐레이트 합성효소, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 알파-글루코시다아제, 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 트립신-유사 프로테아제의 유전자로부터 획득한다.
- <133> 효모 숙주 세포에서 선호되는 종결자는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 에놀라아제, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 시토크롬 C (CYC1), 및 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로제네이트의 유전자로부터 획득한다. 효모 숙주 세포 유용한 다른 종결자는 Romanos et al., 1992, 전제서에 설명되어 있다.
- <134> 조절 서열은 적합한 선도 서열, 즉, 숙주 세포에 의한 번역에 중요한 mRNA의 비번역 영역일 수 있다. 상기 선도 서열은 상기 폴리펩타이드를 암호화한 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단에 작동가능하게 결합된다. 선택된 숙주 세포에서 기능하는 모든 선도 서열이 본 발명에 사용될 수 있다.
- <135> 사상진균 숙주 세포의 양호한 선도체는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제 및 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 트리오스 포스페이트 아이소머라아제의 유전자로부터 획득한다.
- <136> 효모 숙주 세포의 적합한 선도체는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 에놀라아제 (ENO-1), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 3-포스포글리세르에이트 키나아제, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알파-인자, 및 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 알콜 디하이드로지나아제/글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로지나아제 (ADH2/GAP)의 유전자로부터 획득한다.
- <137> 상기 조절 서열은 폴리아데닐화 서열, 즉 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단에 작동가능하게 결합된 서열일 수 있으며, 상기 서열은 전사시 숙주 세포에 의하여 폴리아데노신 잔기에 전사된 mRNA를 부가하라는 신호로 인식된다. 선택된 숙주 세포에서 기능을 하는 모든 폴리아데닐화 서열이 본 발명에 사용될 수 있다.
- <138> 사상진균 숙주 세포를 위한 양호한 폴리아데닐화 서열은 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀

라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제, 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*) 안트라닐염 합성효소, 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 티로신-유사 프로테아제, 및 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 알파-글루코시다아제의 유전자로부터 획득한다.

- <139> 효모 숙주 세포를 위한 유용한 폴리아데닐화 서열은 문헌 Guo and Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990에 기재되어 있다.
- <140> 상기 조절 서열은 폴리펩타이드의 아미노 말단에 결합된 아미노산 서열의 암호이며, 암호화된 폴리펩타이드를 세포의 분비 경로로 향하게 하는 신호 펩타이드 암호화 영역일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열의 암호화 서열의 5' 말단은 번역 해독틀 내에서 분비되는 폴리펩타이드를 암호화한 암호화 영역의 일부와 자연적으로 결합된 신호 펩타이드 암호화 영역을 생래적으로 함유한다. 또한, 상기 암호화 서열의 5' 말단은 암호화 서열에 외래의 것인 신호 펩타이드 암호화 영역을 함유할 수 있다. 상기 외래 신호 펩타이드 암호화 영역은 암호화 서열이 신호 펩타이드 암호화 영역을 원래 함유하지 않았던 경우에 필요할 수 있다. 또한, 상기 외래 신호 펩타이드 암호화 영역은 신호 펩타이드 암호화 영역과 단순히 치환됨으로써 상기 폴리펩타이드의 분비를 증진하게 된다. 그러나, 상기 발현된 폴리펩타이드를 선택된 숙주 세포의 분비 경로로 향하게 하는 모든 신호 펩타이드 암호화 영역은 본 발명에 사용될 수 있다.
- <141> 박테리아 숙주 세포의 효과적인 신호 펩타이드 암호화 영역은 바실루스(*Bacillus*) NCIB 11837 말토오스생성 아밀라아제,
- <142> 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) 알파-아밀라아제, 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 서브틸리신(서브틸리신), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 베타-락타마아제, 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) 뉴트럴 프로테아제 (nprT, nprS, nprM), 및 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) prsA의 유전자로부터 획득한 신호 펩타이드 암호화 영역이다. 추가의 신호 펩타이드는 문헌 Simonen and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137에 기재되어 있다.
- <143> 사상진균 숙주 세포의 효과적인 신호 펩타이드 암호화 영역은 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) TAKA 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 뉴트럴 아밀라아제, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제, 리조뮤코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 아스파라긴산 프로테이나아제, 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) 셀룰라아제, 및 휴미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*) 라파아제의 유전자로부터 획득한 신호 펩타이드 암호화 영역이다.
- <144> 본 발명의 양호한 실시상태에서, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 19로 구성되어 있거나 또는 이들을 포함한다 본 발명의 또다른 양호한 실시상태에서, 신호 펩타이드 암호화 영역은 SEQ ID NO:1의 뉴클레오타이드 20 내지 76으로 구성되거나 또는 이들을 포함한다.
- <145> 효모 숙주 세포에 유용한 신호 펩타이드는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알파-인자 및 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 인버타아제의 유전자로부터 획득한다. 다른 유용한 신호 펩타이드 암호화 영역은 전술한 문헌 Romanos *et al.*, 1992에 기재되어 있다.
- <146> 상기 조절 서열은 폴리펩타이드의 아미노 말단에 위치한 아미노산 서열을 암호화하는 펩타이드전구체 암호화 영역일 수 있다. 결과 폴리펩타이드는 효소전구체 또는 폴리펩타이드전구체 (또는 어떠한 경우에는 효소원)로 알려져 있다. 폴리펩타이드전구체는 일반적으로 불활성이며, 폴리펩타이드전구체로부터 펩타이드전구체를 효소적 또는 자가효소 절단에 의하여 성숙 활성 폴리펩타이드로 전환된다. 상기 펩타이드전구체 암호화 영역은 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 염기성 프로테아제(aprE), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 뉴트럴 프로테아제(nprf), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 알파-인자, 리조뮤코르 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 아스파라긴산 프로테이나아제, 및 마이셀리오파토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*) 락카아제(WO 95/33836)의 유전자로부터 획득한다.
- <147> 신호 펩타이드 및 펩타이드전구체 영역이 둘 다 폴리펩타이드의 아미노 말단에 존재하는 경우, 상기 펩타이드전구체 영역은 폴리펩타이드의 아미노 말단의 옆에 위치하며, 상기 신호 펩타이드 영역은 펩타이드전구체 영역의 아미노 말단의 옆에 위치하게 된다. 숙주 세포의 성장에 관한 폴리펩타이드의 발현을 조절하게 하는 조절 서열을 부가하는 것이 바람직하다. 조절 시스템의 예는 화학적 또는 물리적 자극에 반응하여 유전자 발현을 작동하게 하거나 또는 중단시키는 것들로서, 조절 화합물의 존재를 포함한다. 원핵 시스템 내의 조절 시스템은 *lac*, *tac*, 및 *trp* 작동자 시스템을 포함한다. 효모에 있어서, ADH2 시스템 또는 GAL1 시스템이 사용된다. 사상진균

의 경우, TAKA 알파-아밀라아제 프로모터, 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 글루코아밀라아제 프로모터, 및 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 글루코아밀라아제 프로모터가 조절 서열로서 사용된다. 조절 서열의 다른 예는 유전자 증폭을 가능하게 하는 것들이다. 원핵 시스템에서, 이들은 메토티렉세이트의 존재 하에 증폭되는 이수소폴산 환원효소 유전자, 및 중금속과 함께 증폭되는 금속티오네인 유전자를 포함한다. 이러한 경우, 상기 폴리펩타이드를 암호화한 뉴클레오타이드 서열은 상기 조절 서열과 작동가능하게 결합할 수 있다.

<148> 발현 벡터

<149> 본 명세서에서 설명한 다양한 핵산 및 조절 서열은 함께 결합되어 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드, 프로모터, 및 전사 및 번역 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 생산한다. 발현 벡터는 하나 이상의 편리한 제한 효소 부위를 포함하여 이 부위에 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 삽입 또는 치환을 가능하게 한다. 또한,

<150> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화한 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드 서열 또는 이 서열을 포함하는 핵산 구조체를 발현을 위한 적절한 벡터로 삽입함으로써 발현될 수 있다. 발현 벡터의 생성에 있어서, 암호화 서열을 벡터 내로 위치시켜, 암호화 서열이 발현을 위한 적절한 조절 서열과 작동가능하게 결합된다.

<151> 재조합 발현 벡터는 간편하게 재조합 DNA 방법을 가할 수 있으며, 뉴클레오타이드 서열의 발현을 발생시키는 모든 벡터(예컨대, 플라스미드 또는 바이러스)일 수 있다. 벡터의 선택은 일반적으로 벡터와 벡터가 도입될 숙주 세포의 적합성에 의존한다. 벡터는 선형 또는 폐쇄 고리형 플라스미드일 수 있다.

<152> 벡터는 자동 복제 벡터, 즉, 염색체 복제, 예컨대, 플라스미드, 염색체외 성분, 미니염색체, 또는 인공 염색체 등과 독립된 복제인 염색체외 본체(entity)로서 존재하는 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 자가-복제를 확실하게 하는 모든 수단을 함유한다. 또한, 상기 벡터는 숙주 세포로 도입되면, 그 게놈으로 통합되어, 통합된 염색체(들)과 함께 복제되는 것일 수 있다. 또한, 숙주 세포의 게놈에 도입되는 총 DNA를 함께 함유하는 단일 벡터 또는 플라스미드 또는 이 이상의 벡터 또는 플라스미드, 또는 트랜스포손이 사용될 수 있다.

<153> 벡터는 바람직하게는 형질전환, 전달감염, 형질도입된 세포의 간편한 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 선택가능한 마커(marker)를 포함한다. 선택가능한 마커는 그 생산물이 살균 또는 바이러스 내성, 중금속 내성, 영양 요구균주에 대한 기본영양성을 제공하는 유전자이다.

<154> 박테리아의 선택가능한 마커는 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*)의 *dal* 유전자, 또는 항생제 내성, 예컨대 앰피실린, 카나마이신, 클로람페니콜, 또는 테트라사이클린 내성을 부여하는 마커이다. 효모 숙주 세포의 적합한 마커는 ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, 및 URA3이다. 사상진균 숙주 세포에 사용되는 선택가능한 마커는 *amdS*(아세트아미다아제), *argB*(오르니틴 카바모일트랜스퍼라아제), *bar*(포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라아제), *hph*(하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제), *niaD*(질산염 환원효소), *pyrG*(오르티딘-5'-포스페이트 디카르복실라아제), *sC*(황산염 아데닐트랜스퍼라아제), 및 *trpC*(안트라닐염 합성효소), 및 이들과 등가의 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 세포에는 아스퍼길루스 니들란스(*Aspergillus nidulans*) 또는 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*)의 *amdS* 및 *pyrG* 유전자 및 스트렙토마이세스 하이그로스코피우스(*Streptomyces hygroscopicus*)의 *bar* 유전자를 사용하는 것이 양호하다.

<155> 본 발명의 벡터에는 바람직하게는 벡터를 숙주 세포의 게놈 내로 통합하게 하거나 또는 세포 비의존성 게놈 내의 벡터의 자가 복제를 하게 하는 성분(들)을 포함한다.

<156> 숙주 세포 게놈으로의 통합을 위하여, 상기 벡터는 상기 폴리펩타이드를 암호화한 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 상동 또는 비상동 재조합에 의하여 게놈 내로 통합되기 위한 벡터의 다른 모든 성분에 의존한다. 또한, 상기 벡터는 염색체(들) 내에서 상동 재조합에 의하여 숙주 세포의 게놈 내의 정확한 위치(들)로 통합시키기 위한 추가적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 정확한 위치로 통합할 가능성을 증가시키기 위하여, 통합 성분은 바람직하게는 충분한 수의 핵산, 예컨대 100 내지 10,000 bp, 바람직하게는 400 내지 10,000 bp, 및 가장 바람직하게는 800 내지 10,000 bp를 함유하여야하며, 상응하는 표적 서열과 고도로 일치하여 상동 재조합의 가능성을 증진시킨다. 상기 통합 성분은 숙주 세포의 게놈 내의 표적 서열과 상동인 모든 서열일 수 있다. 또한, 상기 통합 성분은 뉴클레오타이드 서열을 비암호화 또는 암호화할 수 있다. 한편, 상기 벡터는 비-상동 재조합에 의하여 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.

- <157> 자동 복제를 위하여, 상기 벡터는 문제의 숙주 세포 내에서 상기 벡터가 자동 복제할 수 있도록 하는 복제 원점을 추가로 포함할 수 있다. 복제 원점은 세포 내에서 기능하는 플라스미드 복제자 매개 자동 복제일 수 있다. 본 명세서에서 "복제 원점" 또는 "플라스미드 복제자"라는 용어는 플라스미드 또는 벡터를 생체 내에서 복제하게 만드는 뉴클레오타이드 서열로 정의된다.
- <158> 박테리아 복제 원점의 예는 대장균(*E. coli*) 내에서 복제가능한 플라스미드 pBR322, pUC19, pACYC177, 및 pACYC184의 복제 원점, 및 바실루스(*Bacillus*) 내에서 복제가능한 pUB110, pE194, pTA1060, 및 pAM β 1의 복제 원점이다.
- <159> 효모 숙주 세포에 사용되는 복제 원점의 예는 2 미크론 복제 원점, ARS1, ARS4, ARS1 및 CEN3의 조합, 및 ARS4 및 CEN6의 조합이다.
- <160> 사상진균 세포에 유용한 복제 원점은 AMA1 및 ANS1이다(Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98:61-67; Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163- 9175; WO 00/24883). AMA1 유전자의 분리 및 상기 유전자를 포함한 플라스미드 또는 벡터의 제조는 WO 00/24883에 개시된 방법에 의하여 달성할 수 있다.
- <161> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 카피가 숙주 세포 내로 삽입되어 폴리펩타이드의 생성을 증가시킬 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 카피 수의 증가는 선택가능한 마커 유전자의 증폭된 카피를 포함하는 세포의 경우, 적어도 하나의 추가적인 카피 서열을 숙주 세포 계통으로 통합하거나 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 지닌 증폭가능한 선택가능한 마커 유전자를 포함함으로써 획득할 수 있으며, 이로써 폴리뉴클레오타이드의 추가적인 카피는 적절한 선택가능한 약제의 존재하에 세포를 배양하여 선택할 수 있다.
- <162> 전술한 성분을 결합하는데 사용하여 본 발명의 재조합 발현 벡터를 제조하는 방법은 당해 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다(예컨대, Sambrook *et al.*, 1989, 전제서 참조).
- <163> **숙주 세포**
- <164> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 숙주 세포는 폴리펩타이드의 재조합 생산에 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 숙주 세포 내로 도입되어 벡터가 전술한 염색체 성분 또는 자가-복제 추가-염색체 벡터로 으로 유지된다. 용어 "숙주 세포"는 복제시 발생하는 돌연변이에 기인하여 모세포와 일치하지 않는 모세포의 자손을 포괄한다. 숙주 세포의 선택은 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자 및 이들의 공급원에 따라 광범위하게 달라질 수 있다.
- <165> 숙주 세포는 단세포 미생물, 예컨대, 원핵생물, 또는 다세포 미생물, 예컨대, 진핵생물일 수 있다.
- <166> 박테리아 숙주 세포는 모든 그람 양성 박테리아 또는 그람 음성 박테리아가 될 수 있다. 그람 양성 박테리아는 바실루스, 스트렙토코커스, 스트렙토마이세스, 스탕필로코커스, 엔테로코커스, 락토바실루스, 락토코커스, 클로스트리듐, 지오바실루스, 및 오시아노바실루스를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그람 음성 박테리아는 대장균, 슈도모나스, 살모넬라, 캄필로박터, 헬리코박터, 플라보박테리움, 푸소박테리움, 리요박터, 네이세리아, 및 우레아플라스마를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <167> 박테리아 숙주 세포는 모든 바실루스(*Bacillus*) 세포가 될 수 있다, 본 발명의 실시예에 유용한 바실루스(*Bacillus*) 세포에는 바실루스 알칼로필루스(*Bacillus alkalophilus*), 바실루스 아밀로리큐에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실루스 브레비스(*Bacillus brevis*), 바실루스 서큘란스(*Bacillus Circulans*), 바실루스 클라우시(*Bacillus clausii*), 바실루스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실루스 피르미스(*Bacillus firmus*), 바실루스 라우투스(*Bacillus lautus*), 바실루스 렌투스(*Bacillus lentus*), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실루스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*), 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 바실루스 투링지엔시스(*Bacillus thuringiensis*) 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <168> 본 발명에서 양호한 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 바실루스 아밀로리큐에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실루스 렌투스(*Bacillus lentus*), 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 또는 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 세포이다. 본 발명의 보다 양호한 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 바실루스
- <169> 아밀로리큐에파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 세포이다. 본 발명의 보다 양호한 다른 특징으로서, 박테리

아 숙주 세포는 바실루스 클라우시(*Bacillus clausii*) 세포이다. 본 발명의 보다 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 세포이다.

<170> 박테리아 숙주 세포는 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 세포가 될 수 있다. 본 발명의 실시예에 유용한 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 세포는 스트렙토코커스 에퀴시밀리스(*Streptococcus equisimilis*), 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 유베리스(*Streptococcus uberis*), 및 스트렙토코커스 에퀴니아종. 주에피데미쿠스(*Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<171> 본 발명의 양호한 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토코커스 에퀴시밀리스(*Streptococcus equisimilis*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토코커스 유베리스(*Streptococcus uberis*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토코커스 에퀴니아종. 주에피데미쿠스(*Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*)이다.

<172> 박테리아 숙주 세포는 모든 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)가 될 수 있다. 본 발명의 실시예에 유용한 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 세포는, 스트렙토마이세스 아크로모제네스(*Streptomyces achromogenes*), 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*), 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*), 및 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<173> 본 발명의 양호한 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토마이세스 아크로모제네스(*Streptomyces achromogenes*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 세포이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 박테리아 숙주 세포는 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*) 세포이다.

<174> 벡터의 박테리아 숙주 세포로의 도입은, 예컨대 원형질체 형질전환에 의한 결과이며(예컨대, Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 1 11-1 15), 적격 세포 (예컨대, Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81 : 823-829, 또는 Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), 전기천공 (예컨대, Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechnics* 6: 742-751), 또는 컨주게이션(예컨대, Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278)를 사용한다. DNA를 대장균에 도입하는 것은, 예를 들면, 원형질체 형질전환(예컨대, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) 또는 전기천공 (예컨대, Dower et al., 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145)에 의한 결과이다. DNA를 스트렙토마이세스 세포에 도입하는 것은, 예를 들면, 원형질체 형질전환 및 전기천공 (예컨대, Gong et al., 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), 컨주게이션 (예컨대, Mazodier et al., 1989, *J. Bacteriol.* 171 : 3583-3585), 또는 형질도입 (예컨대, Burke et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6289-6294)에 의한 결과이다. DNA를 슈도모나스 세포에 도입하는 것은, 예를 들면, 전기천공 (예컨대, Choi et al., 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) 또는 컨주게이션 (예컨대, Pinedo and Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 51-57)에 의한 결과이다. DNA를 스트렙토코커스 세포에 도입하는 것은 천연 적격성 (예컨대, Perry and Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32: 1295-1297), 원형질체 형질전환 (예컨대, Catt and Jollick, 1991, *Microbios.* 68: 189-2070, 전기천공 (예컨대, Buckley et al., 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) 또는 컨주게이션 (예컨대, Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436)에 의한 결과이다. 그러나, DNA를 숙주 세포로 도입하는 공지의 모든 방법을 사용할 수 있다.

<175> 상기 숙주 세포는 진핵생물, 예컨대 포유류, 곤충, 식물, 또는 진균 세포일 수 있다.

<176> 본 발명의 양호한 실시상태에서, 상기 숙주 세포는 진균 세포이다. 본 명세서에서 "진균"은 필라 아스코마이크로타(*phyla Ascomycota*), 바시디오마이크로타(*Basidiomycota*), 치트리디오마이크로타(*Chytridiomycota*), 및 자이코마이크로타(*Zygomycota*) (Hawksworth et al., *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK에서 정의)와 오마이크로타(*Oomycota*) (Hawksworth et al., 1995, 전제서, 171p. 인용) 및 모든 미토스포리(*mitosporic*) 진균 (Hawksworth et al., 1995, 전제서)를 포함한다. 더 양호한 실시 상태에서, 상기 진균 숙주 세포는 효모 세포이다. 본 명세서에서 사용된 "효모"는 유포자 효모(*ascosporogenous yeast*)(엔도마이세탈레스(*Endomycetales*)), 담자균 효모(*basidiosporogenous yeast*), 및 불완전 균류(*Fungi Imperfecti*)에 속하는 효모(블라스토마이세테스

(*Blastomycetes*))를 포함한다. 효모의 분류군은 향후 변화할 수 있기 때문에, 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 효모는 문헌 *Biology and Activities of Yeast*(Skinner, F.A., Passmore, S. M., and Davenport, R. R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9*, 1980)에 기술한 바에 따라 정의될 것이다.

- <177> 보다 더 양호한 실시 상태에서, 상기 효모 숙주 세포는 칸디다(*Candida*), 한센룰라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 스킴조사카로마이세스(*SchizoSaccharomyces*), 또는 야로위아(*Yarrowia*) 세포이다.
- <178> 가장 양호한 실시 상태에서, 상기 효모 숙주 세포는 사카로마이세스 칼스베르겐시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 디아스타티쿠스(*Saccharomyces diastaticus*), 사카로마이세스 도우그라시(*Saccharomyces douglasii*), 사카로마이세스 클루이베리(*Saccharomyces kluyveri*), 사카로마이세스 노르벤시스(*Saccharomyces norbensis*) 또는 사카로마이세스 오비포르미스(*Saccharomyces oviformis*) 세포이다. 또 다른 가장 양호한 실시 상태에서, 상기 효모 숙주 세포는 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 세포이다. 또 다른 가장 양호한 실시상태에서, 상기 효모 숙주 세포는 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lypolitica*) 세포이다.
- <179> 또 다른 더 양호한 실시 상태에서, 상기 진균 숙주 세포는 사상 진균 세포이다. "사상 진균"은 모든 필라멘트 형태의 세분류인 유마이코타(*Eumycota*) 및 오마이코타(*Oomycota*)를 포함한다(Hawksworth *et al.*, 1995, 전제서에서 정의). 상기 사상 진균은 일반적으로 키틴, 셀룰로오스, 글루칸, 키토산, 만난, 및 그 밖의 복합 다당류로 구성된 마이셀 세포벽에 특징이 있다. 증식 성장은 균사 신장에 의한 것이며, 탄소 이화는 필수적으로 유산소 과정이다. 이와 대조적으로, 효모 예컨대 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)에 의한 증식 성장은 단세포 엽상체(thallus)의 발아이며, 탄소 이화는 발효이다.
- <180> 보다 더 양호한 실시 상태에서, 상기 사상 진균 숙주 세포는 아크레모니움(*Acremonium*), 아스퍼길루스(*Aspergillus*), 아우레오바시디움(*Aureobasidium*), 비에르칸테라(*Bjerkandera*), 세리포리옵시스(*Ceriporiopsis*), 코프리누스(*Coprinus*), 코리올루스(*Coriolus*), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 필라바시디움(*Filibasidium*), 푸사리움(*Fusarium*), 휴미콜라(*Humicola*), 마그나포르테(*Magnaporthe*), 뮤코르(*Mucor*), 마이셀리오파토라(*Myceliophthora*), 네오칼리마스틱스(*Neocallimastix*), 뉴로스포라(*Neurospora*), 파에실로마이세스(*Paecilomyces*), 페니실리움(*Penicillium*), 파네로차에테(*Phanerochaete*), 플레비아(*Phlebia*), 피로마이세스(*Piromyces*), 플레우로투스(*Pleurotus*), 스킴조필룸(*Schizophyllum*), 타라로마이세스(*Talaromyces*), 더모아스쿠스(*Thermoascus*), 티에라비아(*Thielavia*), 톨리포칼라디움(*Tolypocladium*), 트라메테스(*Trametes*), 또는 트리코테르마(*Trichoderma*) 세포이다.
- <181> 가장 양호한 실시 상태에서, 상기 사상 진균 숙주 세포는 아스퍼길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼길루스 포에티두스(*Aspergillus foetidus*), 아스퍼길루스 자포니쿠스(*Aspergillus japonicus*), 아스퍼길루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 또는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 세포이다. 또 다른 가장 양호한 실시 상태에서, 상기 사상 진균 숙주 세포는 푸사리움 박트리디오이데스(*Fusarium bactridioides*), 푸사리움 세레알리스(*Fusarium cerealis*), 푸사리움 크룩웰렌스(*Fusarium crookwellense*), 푸사리움 쿨모룸(*Fusarium culmorum*), 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminum*), 푸사리움 그라미눔(*Fusarium graminum*), 푸사리움 헤테로스포룸(*Fusarium heterosporum*), 푸사리움 네군디(*Fusarium negundi*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 레티클라툼(*Fusarium reticulatum*), 푸사리움 로세움(*Fusarium roseum*), 푸사리움 삼부시눔(*Fusarium sambucinum*), 푸사리움 사르코크로움(*Fusarium sarcochroum*), 푸사리움 스포로트리키오이데스(*Fusarium sporotrichioides*), 푸사리움 숄푸레움(*Fusarium sulphureum*), 푸사리움 토루로숨(*Fusarium torulosum*), 푸사리움 트리코테시오이데스(*Fusarium trichotheloides*), 또는 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*) 세포이다. 또 다른 가장 양호한 실시 상태에서, 상기 사상 진균 숙주 세포는 비에르칸테라 아두스타(*Bjerkandera adusta*), 세리포리옵시스 아네리나(*Ceriporiopsis aneirina*), 세리포리옵시스 아네리나(*Ceriporiopsis aneirina*), 세리포리옵시스 카레기아(*Ceriporiopsis caregiea*), 세리포리옵시스 길베스센스(*Ceriporiopsis gilvescens*), 세리포리옵시스 판노신타(*Ceriporiopsis pannocinta*), 세리포리옵시스 리볼로사(*Ceriporiopsis rivulosa*), 세리포리옵시스 서브루파(*Ceriporiopsis subrufa*), 또는 세리포리옵시스 서브베르미스포라(*Ceriporiopsis subvermispora*), 코프리누스 시네레우스(*Coprinus cinereus*), 코리올루스 히르수투스(*Coriolus hirsutus*), 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 휴미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*), 뮤코르 미에헤이(*Mucor miehei*), 마이셀리오파토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*), 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*), 페니실리움 푸르푸로제눔(*Penicillium purpurogenum*), 파네로차에테 치르이소스포리움

(*Phanerochaete chrysosporium*), 플레비아 라디아타(*Phlebia radiata*), 플레우로투스 에르인기(*Pleurotus eryngii*), 티에라비아 테르에스트리스(*Thielavia terrestris*), 트라메테스 빌로사(*Trametes villosa*), 트라메테스 베르시콜로르(*Trametes versicolor*), 트리코테르마 하르지아눔(*Trichoderma harzianum*), 트리코테르마 코닝기(*Trichoderma koningii*), 트리코테르마 롱기브라치아툼(*Trichoderma longibrachiatum*), 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*), 또는 트리코테르마 비리데(*Trichoderma viride*) 균주 세포이다.

<182> 진균 세포는 알려진 원형질체 형성, 원형질체의 형질전환, 및 세포벽의 재생성에 관계된 공정에 의하여 형질전환될 수 있다. 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 및 트리코테르마(*Trichoderma*) 숙주 세포의 형질전환에 적합한 방법은 EP 238 023 및 Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81 : 1470-1474에 개시되어 있다. 적합한 푸사리움(*Fusarium*) 종의 형질전환 방법은 문헌 Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156, 및 WO 96/00787에 기재되어 있다. 효모는 문헌 Becker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M. I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182- 187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; 및 Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920에 기술된 방법을 사용하여 형질전환할 수 있다.

<183> 생산 방법

<184> 본 발명은 또한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것으로서, (a) 폴리펩타이드의 생산에 유리한 조건 하에서, 이들의 야생형이 폴리펩타이드를 생산할 수 있는 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 세포는 트리코테르마 속이며, 더 바람직하게는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*)이고, 가장 바람직하게는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) RutC30이다.

<185> 본 발명은 또한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것이며, (a) 폴리펩타이드 생산에 유리한 조건 하에서 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함한다.

<186> 본 발명은 또한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것이며, (a) 폴리펩타이드 생산에 유리한 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 숙주 세포는 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 영역 내에 최소한 하나의 돌연변이를 보유한 돌연변이 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 돌연변이 뉴클레오타이드 서열이 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드로 구성된 폴리펩타이드를 암호화하는 단계, 및 (b) 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함한다. 본 발명의 양호한 특징으로서, SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 20 내지 249이다.

<187> 생산 방법에서, 상기 세포는 당해 기술 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 상기 폴리펩타이드를 생산하기 위한 적합한 영양 배지 내에서 배양된다. 예를 들어, 세포는 적합한 배지 및 상기 폴리펩타이드를 발현 및/또는 분리할 수 있는 조건 하에서 진탕 플라스크 배양, 및 작은-스케일 또는 큰-스케일의 발효 (계속적, 배치, 페드-배치, 또는 고체상 발효를 포함)에 의하여 실험실 또는 공업용 발효기에서 배양된다. 상기 배양은 당해 기술 분야에 알려진 절차를 사용하여 탄소, 질소원 및 무기염류를 포함하는 적합한 영양 배지 내에서 발생한다. 적합한 배지는 판매 업자에게 구득하거나 또는 공지된 조성물로 생산할 수 있다(예컨대, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션의 카탈로그). 상기 폴리펩타이드가 영양 배지 내로 분비되는 경우, 상기 폴리펩타이드를 배지로부터 직접 회수할 수 있다. 상기 폴리펩타이드가 분비되지 않는 경우, 세포를 용해시켜 회수할 수 있다.

<188> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 본 명세서에서 설명한 방법에 의하여 검출된다.

<189> 결과 폴리펩타이드는 당해 기술 분야에 알려진 방법을 사용하여 회수할 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리펩타이드는 원심분리, 여과, 추출, 분무-건조, 증발, 또는 침전을 포함하나 이에 한정되지 않는 종래의 방법에 의하여 영양 배지로부터 회수할 수 있다.

<190> 본 발명의 폴리펩타이드는 실질적으로 순수한 폴리펩타이드를 획득하기 위하여 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환, 친화도, 소수성, 크로마토포커싱, 및 크기 배제), 전기영동법(예컨대, 예비 등전 집속), 용해도차(예컨대, 황산 암모늄 침전), SDS-PAGE, 또는 추출(예컨대, *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989 참조)를 포함하나 이에 한정되지 않는 당해 기술 분야에 알려진 다양한 절차에 의하여 분리 정제할 수 있다.

<191> 셀룰로오스가수분해 단백질

<192> 본 발명의 방법에 있어서, 셀룰로오스가수분해 단백질은 셀룰로오스성 물질을 글루코스로, 또는 헤미셀룰로오스를 자일로오스, 만노스, 갈락토오스, 및 아라비노스로 처리하는 모든 단백질, 이들의 중합체, 또는 하기하는 바와 같은 이들로부터 유도된 산물이 될 수 있다. 셀룰로오스가수분해 단백질은 하기하는 단일성분 제조품, 예컨대, 셀룰라아제, 다성분 제조품, 예컨대, 엔도글루카나아제, 셀로바이오가수분해효소, 글루코가수분해효소, 베타-글루코시다아제, 또는 다성분 및 단일성분 단백질 제조품의 조합이 될 수 있다. 셀룰로오스가수분해 단백질은 활성, 즉, 셀룰로오스를 산성, 중성, 또는 염기성 pH-범위에서 가수분해할 수 있다. 셀룰로오스가수분해 단백질은 진균성 또는 박테리아 기원의 것일 수 있으며, 이는 셀룰로오스가수분해 효소를 생산할 수 있다고 알려진 미생물, 예컨대, 바실루스, 슈도모나스, 휴미콜라, 코프리누스, 티에라비아, 푸사리움, 마이셀리오프토라, 아크레모니움, 세팔로스포리움, 쉬탈리디움, 페니실리움 또는 아스퍼길루스 (예를 들면, EP 458162) 중, 특히 균주 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*, 신탈리디움 더모필룸(*Scytalidium thermophilum*)로 재분류됨, 예를 들면, 미국 등록 특허 번호 4,435,307), 코프리누스 시네레우스(*Coprinus cinereus*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 마이셀리오프토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*), 메리필루스 기간테우스(*Meripilus giganteus*), 티에라비아 테르에스트리스(*Thielavia terrestris*), 아크레모니움 종(*Acremonium* sp.), 아크레모니움 페르시시눔(*Acremonium persicinum*), 아크레모니움 아크레모니움(*Acremonium acremonium*), 아크레모니움 브라체페니움(*Acremonium brachypenium*), 아크레모니움 디크로모스포룸(*Acremonium dichromosporum*), 아크레모니움 오브클라바툼(*Acremonium obclavatum*), 아크레모니움 핑케르토니아에(*Acremonium pinkertoniae*), 아크레모니움 로세오그리세움(*Acremonium roseogriseum*), 아크레모니움 인콜로라툼(*Acremonium incoloratum*), 및 아크레모니움 푸라툼(*Acremonium furatum*)으로부터 선택된 균주에 의하여 생산된 것; 바람직하게는 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) DSM 1800, 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) DSM 2672, 마이셀리오프토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*) CBS 117.65, 세팔로스포리움 종(*Cephalosporium* sp.) RYM-202, 아크레모니움 종(*Acremonium* sp.) CBS 478.94, 아크레모니움 종(*Acremonium* sp.) CBS 265.95, 아크레모니움 페르시시눔(*Acremonium persicinum*) CBS 169.65, 아크레모니움 아크레모니움(*Acremonium acremonium*) AHU 9519, 세팔로스포리움 종(*Cephalosporium* sp.) CBS 535.71, 아크레모니움 브라체페니움(*Acremonium brachypenium*) CBS 866.73, 아크레모니움 디크로모스포룸(*Acremonium dichromosporum*) CBS 683.73, 아크레모니움 오브클라바툼(*Acremonium obclavatum*) CBS 311.74, 아크레모니움 핑케르토니아에(*Acremonium pinkertoniae*) CBS 157.70, 아크레모니움 로세오그리세움(*Acremonium roseogriseum*) CBS 134.56, 아크레모니움 인콜로라툼(*Acremonium incoloratum*) CBS 146.62, 및 아크레모니움 푸라툼(*Acremonium furatum*) CBS 299.70H로부터 선택된 균주에 의하여 생산된 미생물로부터 분리 또는 정제될 수 있는 것이다. 셀룰로오스가수분해 단백질은 트리코테르마 (특히 트리코테르마 비리데(*Trichoderma viride*), 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*), 및 트리코테르마 코닝기(*Trichoderma koningii*)), 호염기성 바실루스 (예를 들면, 미국 등록 특허 번호 3,844,890 및 EP 458162), 및 스트렙토마이세스 (예를 들면, EP 458162)로부터 획득할 수 있다. 화학적으로 변형된 또는 셀룰로오스가수분해 단백질의 돌연변이로 조작된 단백질을 사용할 수도 있다.

<193> 특히 적합한 셀룰로오스가수분해 단백질은 염기성 또는 중성 셀룰라아제이다. 이러한 셀룰라아제의 예는 EP 495,257, EP 531,372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940에 설명된 셀룰로오스이다. 그 밖의 실시예는 셀룰라아제 변이체 예컨대, WO 94/07998, EP 531,315, 미국 등록 특허 번호 4,435,307, 미국 등록 특허 번호 5,457,046, 미국 등록 특허 번호 5,648,263, 미국 등록 특허 번호 5,686,593, 미국 등록 특허 번호 5,691,178, 미국 등록 특허 번호 5,763,254, 미국 등록 특허 번호 5,776,757, WO 89/09259, WO 95/24471, WO 98/12307, 및 PCT/DK98/00299에서 설명된 것이다.

<194> 본 발명의 방법에서 사용된 셀룰로오스가수분해 단백질은 공지된 방법에 사용되는 적합한 탄소 및 질소 공급원, 및 무기염을 함유하는 영양 배지 상의 전술한 미생물 균주의 발효에 의하여 생산할 수 있다(예컨대, Bennett, J.W. and LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). 적합한 배지는 판매업자에게 구두하거나 또는 공지된 조성물로 생산할 수 있다(예컨대, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션의 카탈로그). 셀룰로오스가수분해 단백질 생산 및 성장에 적합한 온도 범위 및 다른 조건은 당해 기술 분야에 공지되어 있다(예컨대, Bailey, J. E., and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

<195> 발효는 세포를 배양하여 셀룰로오스가수분해 단백질의 발현 또는 분리되는 모든 방법을 사용할 수 있다. 발효는, 따라서, 실험실 또는 공업용 발효기의 적합한 배지 내에서 셀룰로오스가수분해 단백질 또는 셀룰로오스가수분해 증진 단백질을 발현 및/또는 분리할 수 있는 조건 하에서 진탕 플라스크 배양, 및 작은-스케일 또는

큰-스케일의 발효 (계속적, 배치, 페드-배치, 또는 고체상 발효를 포함)를 포함하는 것으로 이해하여야 한다.

- <196> 전술한 방법에 의하여 생산된 결과 셀룰로오스가수분해 단백질은 발효 배지로부터 회수되고, 본 명세서에서 설명한 종래의 방법에 의하여 정제될 수 있다.
- <197> 셀룰로오스가수분해 단백질은 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC)를 가수분해하여, 배양 혼합물의 점도를 감소시키게 된다. 점도 감소의 결과는 진동 점도계 (예컨대, MIVI 3000, Sofraser, France)로 측정하였다. Determination of , measured in terms of 셀룰라아제 점도 유닛 (CEVU)으로 측정된 셀룰라아제 활성의 결정은 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC) 용액의 점도를 감소시키는 시료의 능력을 측정함으로써 시료 내의 촉매 활성량을 정량하였다. 셀룰로오스가수분해 단백질 및 기질에 적합한 온도 및 pH에서 분석을 수행하였다. 셀룰클라스트™ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)에 있어서, 분석을 40℃에서 0.1 M 포스페이트 pH 9.0 완충제 내에서 30 분 동안 기질로서 CMC(33.3 g/L 카르복시메틸 셀룰로오스 헤르쿨레스 7 LFD)를 포함하고, 효소 농도가 약 3.3-4.2 CEVU/ml로 수행하였다. CEVU 활성은 표시된 효소 표준, 예컨대, CELLUZYME™ 표준 17-1194 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)과 비교하여 계산되었다.
- <198> 본 발명에 적합한 셀룰로오스가수분해 제조품의 예는 예를 들면, CELLUCLAST™ (Novozymes A/S) 및 NOVOZYM™ 188 (Novozymes A/S)를 포함한다. 사용되는 셀룰라아제를 포함하여 구득이 가능한 다른 제조품은 셀루자임™, 세레플로™ 및 울트라플로™ (Novozymes A/S), 라미넥스™ 및 스페자임™ CP (Genencor Int.), 및 로하멘트™ 7069 W (Rohm GmbH)를 포함한다. 셀룰라아제 효소는 약 0.001% 내지 약 5.0 % wt의 고체, 더 바람직하게는 약 0.025% 내지 약 4.0% wt의 고체, 및 가장 바람직하게는 약 0.005% 내지 약 2.0% wt의 고체 유효량으로 첨가된다.
- <199> 전술한 바와 같이, 본 발명의 방법에서 사용된 셀룰로오스가수분해 단백질 또는 셀룰로오스가수분해 증진 단백질은 단일성분 제조품, 즉, 필수적으로 다른 셀룰로오스가수분해 성분이 결핍된 성분이 될 수 있다. 단일 성분은 재조합 성분, 즉, 단일 성분 및 DNA 서열로 형질전환되고 숙주에서 발현된 이후의 세포를 암호화하는 DNA 서열의 클로닝으로 생산된 것일 수 있다(예를 들면, WO 91/17243 및 WO 91/17244). 단일성분 셀룰로오스가수분해 단백질의 다른 예는 JP-07203960-A 및 WO-9206209에서 설명한 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 숙주는 바람직하게는 이중 숙주 (효소는 숙주에 대하여 외래의 것이다)이나, 숙주는 특정 조건 하에서 상동 숙주일 수 있다(효소는 숙주에 대하여 천연의 것이다). 단일성분 셀룰로오스가수분해 단백질은 이러한 발효 액체 배지의 단백질을 정제하여 제조할 수 있다.
- <200> 본 발명의 방법을 수행하기에 유용한 단일성분 셀룰로오스가수분해 단백질, 엔도글루카나아제, 셀로바이오가수분해효소, 글루코가수분해효소, 및 베타-글루코시다아제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <201> 용어 "엔도글루카나아제"는 본원에서 엔도-1,4-(1,3;1,4)-베타-D-글루칸 4-글루카노가수분해효소(E.C.No. 3.2.1.4)로 정의되며, 이는 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체 (예컨대, 카르복시메틸 셀룰로오스 및 히드록시메틸 셀룰로오스), 리체닌 내의 1,4- 베타-D-글루코시드 결합, 혼합 베타-1,3 글루칸 예컨대, 시리얼 베타-D-글루칸 또는 자일로글루칸, 및 셀룰로오스성 성분을 함유한 그 밖의 식물 물질 내의 베타-1,4 결합의 내부 가수분해를 촉매한다. 본 발명의 목적을 위하여, 엔도글루카나아제 활성은 Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268의 절차를 따라 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC) 가수분해를 사용하여 측정된다. 엑소-1,4-베타-D-글루카나아제는 셀로바이오하이드롤라아제 및 글루코가수분해효소를 모두 포함한다. 본 발명의 목적을 위하여, 엑소글루카나아제 활성은 Himmel et al., 1986, J. Biol. Chem. 261 : 12948-12955에 개시된 방법에 의하여 측정하였다.
- <202> 용어 "셀로바이오가수분해효소"는 본원에서 1,4-베타-D-글루칸 셀로바이오가수분해효소(E.C. 3.2.1.91)로 정의되며, 이는 셀룰로오스, 셀룰로리고사카라이드 내의 1,4-베타-D-글루코스 결합, 또는 중합체를 함유하며, 사슬의 감소 또는 비-감쇄 말단으로부터 셀로바이오스를 방출하는 모든 베타-1,4-결합 글루코스의 가수분해를 촉매한다. 본 발명의 목적을 위하여, 셀로바이오가수분해효소 활성은 Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273- 279 및 van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeysens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288에 설명된 절차에 따라 측정된다. 본 발명에 있어서, Lever et al.의 방법이 옥수수 대 내의 셀룰로오스 가수분해를 사정하기 위하여 사용되었으며, 반면, van Tilbeurgh et al.의 방법이 형광 이당류 유도체 상의 셀로바이오가수분해효소 활성을 측정하기 위하여 사용되었다.
- <203> 용어 "글루코가수분해효소"는 본원에서 1,4-베타-D-글루칸 글루코가수분해효소(E.C. 3.2.1.74)로 정의되었으며, 이는 1,4-베타-D-글루칸 내의 1,4-결합 (O-글리코실 결합)의 가수분해를 촉매하여 연속적인 글루코스 유닛을 제

거한다.

- <204> 용어 "베타-글루코시다아제"는 본원에서 베타-D-글루코사이드 글루코가수분해효소(E.C. 3.2.1.21)로 정의되며, 이는 베타-D-글루코스를 방출하는 말단 비-감쇄 베타-D-글루코스 잔기의 가수분해를 촉매한다. 본 발명의 목적을 위하여, 베타-글루코시다아제 활성은 본원에서 사용한 바와 같은 다른조건을 사용하는 것을 제외하고 Venturi et al., 2002, J. Basic Microbiol. 42: 55-66에 설명된 기본 절차를 따라 측정되었다. 베타-글루코시다아제 활성의 일 유닛은 50℃, pH 5에서 기질로서 4 mM p-니트로페닐-베타-D-글루코피라노사이드의 100 mM 시트르산 나트륨, 0.01% 트윈-20 용액으로부터 제조된 1.0 μ 몰의 p-니트로페놀/분으로 정의된다.
- <205> **셀룰로오스성 물질의 가공**
- <206> 본 발명의 방법은 셀룰로오스성 물질을 다수의 유용한 물질, 예컨대, 화학물질 및 연료로 가공하기 위하여 사용할 수 있다. 에탄올에 첨가하여, 셀룰로오스로부터 생산되는 상품 및 전문 화학물질은 자일로오스, 아세톤, 아세테이트, 글리신, 라이신, 유기산 (예컨대, 락트산), 1,3-프로판디올, 부탄디올, 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 푸르푸랄, 폴리히드록시알카노에이트, 및 시스,시스-뮤콘산(Lynd, L. R., Wyman, C. E., and Gemgross, T. U., 1999, Biocommodity Engineering, Biotechnol. Prog., 15: 777-793; Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; and Ryu, D. D. Y., and Mandels, M., 1980, Cellulases: biosynthesis and applications, Enz. Microb. Technol., 2: 91-102). 잠재적인 공동생산 이점은 발효가능한 탄화수소의 다중 유기 산물의 합성이상으로 확대되었다. 생물학적 처리 후 잔존한 리그닌-풍부 잔기는 리그닌-유도성 화학물질로 전환될 수 있으며, 또는 발전에 사용될 수 있다.
- <207> 본 발명의 방법을 따라 셀룰로오스성 물질을 가공하는 종래의 방법은 당해 기술 분야의 숙련자가 잘 이해할 수 있다. 본 방법의 방법은 본 발명에 따라 작동하도록 구성된 모든 종래의 바이오매스 가공 장치를 사용하여 수행될 수 있다.
- <208> 이러한 장치에는 배치(batch)-교반 반응기, 초원심분리를 하는 연속 유동 교반 반응기, 연속 플러그-유동 컬럼 반응기 (Gusakov, A. V., and Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic Hydrolysis of Cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, Enz. Microb. Technol. 7: 346-352), 마찰 반응기 (Ryu, S. K., and Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 25: 53-65), 또는 전자기장에 의한 집중 교반을 하는 반응기 (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic Cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, Appl. Biochem. Biotechnol. 56: 141-153)를 포함한다.
- <209> 종래의 방법에는 당화(saccharification), 발효, 분리 가수분해 및 발효(SHF), 동시 당화 및 발효(SSF), 동시 당화 및 공동발효(SSCF), 혼성 가수분해 및 발효(HHF), 및 직접 미생물적 전환(DMC)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- <210> SHF는 별도의 가공 단계로서 우선 셀룰로오스를 글루코스로 효소적으로 가수분해하고, 그 다음 글루코스를 에탄올로 발효한다. SSF에서는, 셀룰로오스의 효소적 가수분해 및 글루코스의 에탄올 발효가 하나의 단계로 결합된다 (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). SSCF는 여러 종의 당류를 공동발효하는 것을 포함한다 (Sheehan, J., and Himmel, M., 1999, Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for Bioethanol, Biotechnol. Prog. 15: 817-827). HHF는 분리된 두 단계가 동일한 반응기 내에서 수행되, 다른 온도에서 수행된다. 즉, 고온 효소 당화 후에 발효 균주가 견딜 수 있는 저온의 SSF가 수행된다. DMC는 3 단계(셀룰라아제 생산, 셀룰로오스 가수분해, 및 발효) 모두를 한 단계로 결합한다 (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S., 2002, Microbial Cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Reviews 66: 506-577).
- <211> "발효" 또는 "발효 공정"은 모든 발효 공정 또는 발효 단계를 포함하는 모든 공정을 말한다. 발효 공정은 알콜 (예컨대, 아라비니톨, 부타놀, 에탄올, 글리세롤, 메탄올, 1,3-프로판디올, 소르비톨, 및 자일리톨); 유기산 (예컨대, 아세트산, 아세톤산, 아디프산, 아스코르브산, 시트르산, 2,5-디케토-D-글루콘산, 포름산, 푸마르산, 글루케르산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루타르산, 3-히드록시프로피온산, 이타콘산, 락트산, 말산, 말론산, 옥살

산, 프로피온산, 숙신산, 및 자일론산); 케톤 (예컨대, 아세톤); 아미노산 (예컨대, 아스파라긴산, 글루탐산, 글리신, 라이신, 세린, 및 트레오닌); 기체 (예컨대, 메탄, 수소(H₂), 이산화탄소(CO₂), 및 일산화탄소(CO))를 포함하는 발효 산물을 생산하는 발효 공정을 제한없이 포함한다. 발효 공정은 소모성 알콜 산업 (예컨대, 맥주 및 와인), 낙공 산업 (예컨대, 발효 낙공 산물), 가죽 산업, 및 담배 산업에 사용되는 발효 공정을 포함한다.

<212> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 세포를 포함하거나 포함하지 않는 미정제 발효 액체 배지의 형태 또는 반-정제 또는 정제 효소 제조품의 형태가 될 수 있다. 셀룰로오스가수분해 증진 단백질은 단일 성분 제조품, 예컨대, 패밀리 61 단백질, 다성분 단백질 제조품, 예컨대, 다수의 패밀리 61 단백질, 또는 다성분 및 단일성분 단백질 제조품의 조합이 될 수 있다.

<213> 물질은 발효에서 유도된 모든 물질일 수 있다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 물질은 알콜이다. 용어 "알콜"은 하나 이상의 히드록실 모이어티를 포함하는 물질을 포괄하는 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 더욱 바람직한 특징으로서, 알콜은 아라비니톨이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 부타놀이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 에탄올이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 글리세롤이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 메탄올이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 1,3-프로판디올이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 소르비톨이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 알콜은 자일리톨이다. 예를 들면, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol Production from renewable resource, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241 ; Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., and Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol-a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603을 참조한다.

<214> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 물질은 유기산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 아세트산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 아세톤산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 아디프산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 아스코르브산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 시트르산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 2,5-디케토-D-글루콘산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 포름산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 푸마르산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 글루케르산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 글루콘산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 글루쿠론산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 글루타르산이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 유기산은 3-히드록시프로피온산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 이타콘산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 락트산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 말산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 말론산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 옥살산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 프로피온산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 숙신산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 자일론산이다. 예를 들면, Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated Extractive fermentation for lactic production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448를 참조한다.

<215> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 물질은 케톤이다. 용어 "케톤"은 하나 이상의 케톤 모이어티를 함유하는 물질을 포괄하는 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 케톤은 아세톤이다. 예를 들면, Qureshi and Blaschek, 2003, 전제서를 참고한다.

<216> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 물질은 아미노산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 유기산은 아스파라긴산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 아미노산은 글루탐산이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 아미노산은 글리신이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 아미노산은 라이신이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 아미노산은 세린이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 아미노산은 트레오닌이다. 예를 들면, Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for 폴리(glutamic acid) production and other microbial biopolymers,

Biotechnology and Bioengineering 87 (4): 501-515를 참조한다.

- <217> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 물질은 기체이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 기체는 메탄. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 기체는 H_2 이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 기체는 CO_2 이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 기체는 CO이다. 예를 들면, Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, Water Science and Technology 36 (6-7): 41-47; and Gunaseelan V.N. in Biomass and Bioenergy, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review를 참조한다.
- <218> 셀룰로오스성 물질로부터 물질을 생산하는 것은 일반적으로 4 개의 주요 단계를 필요로 한다. 이러한 4 단계는 선처리, 효소적 가수분해, 발효, 및 회수이다. 이하의 예시는 에탄올 생산 공정이며 유사한 공정을 다른 물질, 예컨대, 전술한 물질의 생산에 사용할 수 있음을 이해하여야한다.
- <219> 선처리. 선처리 또는 전-가수분해 단계에서, 셀룰로오스성 물질은 리그닌과 탄수화물 구조를 붕괴시키기 위하여 가열되고, 헤미셀룰로오스의 대부분은 가용화되며, 셀룰로오스 분획이 셀룰로오스가수분해 효소에 접근 가능하게 만든다. 가열은 스팀으로 직접 수행되거나 또는 반응을 가속하는 촉매가 물질에 첨가되도록 슬러리 상에서 수행될 수도 있다. 촉매는 강산, 예컨대, 황산 및 SO_2 , 또는 염기, 예컨대, 수산화 나트륨을 포함한다. 선처리 단계의 목적은 효소와 미생물의 침투를 촉진하는 것이다.
- <220> 셀룰로오스성 바이오매스는 열수 스팀 폭발 선-처리를 가할 수 있다(미국 특허 출원 번호 20020164730).
- <221> 당화. 당화로 알려진 효소적 가수분해 단계에서, 전술한 효소는 선처리된 물질에 첨가되어 셀룰로오스 분획을 글루코스 및/또는 다른 당으로 전환시킨다. 당화는 일반적으로 제어되는 pH, 온도, 및 혼합 조건 하의 교반-탱크 반응기 또는 발효기 내에서 수행된다. 당화 단계는 200 시간까지 지속될 수 있다. 당화는 약 $30^{\circ}C$ 내지 약 $65^{\circ}C$, 특히 약 $50^{\circ}C$ 의 온도에서, 약 4 내지 약 5의 pH 범위, 특히 약 pH 4.5에서 수행된다. 효모에 의하여 대사되는 글루코스를 생산하기 위하여, 가수분해는 일반적으로 베타-글루코시다아제의 존재 하에 수행된다.
- <222> 발효. 발효 단계에서, 선처리 및 효소적 가수분해 단계의 결과로서 셀룰로오스성 물질로부터 생성된 당은 발효 유기체, 예컨대, 효모에 의하여 에탄올로 발효된다. 발효는 제어되는 pH, 온도, 및 혼합 조건 하의 동일한 용기 내에서 효소적 가수분해와 동시에 수행될 수 있다. 당화 및 발효가 동일한 용기 내에서 동시에 수행되는 경우, 공정은 일반적으로 동시 당화 및 발효 또는 SSF라는 용어를 사용한다.
- <223> 모든 적합한 셀룰로오스성 기질 또는 원료 물질은 본 발명을 수행하는 발효 공정에 사용될 수 있다. 기질은 일반적으로 소망하는 발효 산물, 즉, 발효에서 얻고자 하는 물질, 및 사용된 공정에 기초하여 선택되며, 이들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 본 발명에 사용되기에 적합한 기질의 예는 셀룰로오스-함유 물질, 예컨대, 목재 또는 식물 부산물 또는 발효 미생물에 의하여 대사될 수 있는 가공된 셀룰로오스성 물질로부터 획득한 저분자 당 DP1-3을 포함하며, 이는 직접 첨가에 의하여 발효 배지에 공급될 수 있다.
- <224> 용어 "발효 배지"는 발효 미생물(들)이 첨가되기 전의 배지, 예컨대, 당화 공정의 결과인 배지, 및 동시 당화 및 발효 공정(SSF)에 사용된 배지를 의미한다.
- <225> "발효 미생물"은 소망하는 발효 공정에 사용되기 적합한 모든 미생물을 말한다. 본 발명에 적합한 발효 미생물은 당분, 예컨대, 글루코스, 자일로오스, 아라비노스, 만노스, 갈락토오스, 또는 올리고싸카라이드를 직접 또는 간접적으로 소망하는 발효 산물로 발효, 즉, 전환 가능한 것이다. 발효 미생물의 예는 진균 유기체, 예컨대, 효모를 포함한다. 양호한 효모에는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces spp.*)의 균주, 특히, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)가 포함된다. 구득할 수 있는 효모에는, 예컨대, RED STAR®/TM/레사프레 에탄올 레드(Red Star/Lesaffre, USA) FALI (플레쉬만 효모, a division of Burns Philp Food Inc., USA), SUPERSTART (Alltech), GERT STRAND (Gert Strand AB, Sweden) 및 FERMIOL (DSM Specialties)가 포함된다.
- <226> 본 발명의 양호한 특징으로서, 효모는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces spp.*)이다. 본 발명의 더욱 바람직한 특징으로서, 효모는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 사카로마이세스 디스타티쿠스(*Saccharomyces distaticus*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 사카로마이세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*)이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 효모는 클루베로마이세스(*Kluyveromyces*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 클루베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 클루베로마이세스

스 프라질리스(*Kluyveromyces fragilis*)이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 효모는 칸디다(*Candida*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 칸디다 슈도트로피칼리스(*Candida pseudotropicalis*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 칸디다 브라시카에(*Candida brassicae*)이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 효모는 클라비스포라(*Clavispora*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 클라비스포라 루시타니아에(*Clavispora lusitaniae*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 클라비스포라 오펜티아에(*Clavispora opuntiae*)이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 효모는 파키솔렌(*Pachysolen*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 파키솔렌 탄노필루스(*Pachysolen tannophilus*)이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 효모는 브레타노마이세스(*Bretannomyces*)이다. 본 발명의 또 다른 바람직한 특징으로서, 효모는 브레타노마이세스 클라우세니(*Bretannomyces clausenii*)이다 (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

<227> 글루코스를 에탄올로 효과적으로 발효할 수 있는 박테리아는, 예를 들면, 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*) 및 클로스트리듐 더모셀룸(*Clostridium thermocellum*)을 포함한다 (Philippidis, 1996, 전제서).

<228> 전술한 유기체는 전술한 바와 같이 다른 물질을 생산하기 위하여 사용할 수도 있다는 사실이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다.

<229> 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) (Chen, Z., Ho, N. W. Y., 1993, Cloning and improving the Expression of Pichia stipitis Xylose reductase gene in Saccharomyces cerevisiae, Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147; Ho, N. W. Y., Chen, Z., Brainard, A. P., 1998, Genetically engineered Saccharomyces yeast capable of effectively cofermentation glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol. 64: 1852-1859), 또는 박테리아, 예컨대, 대장균 (Beall, D. S., Ohta, K., Ingram, L. O., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant Escherichia coli, Biotech. Bioeng. 38: 296-303), 클레브시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*) (Ingram, L. O., Gomes, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214), 및 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*) (Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., and Picataggio, S., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis, Science 267: 240-243; Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., and Picataggio, S., 1996, Development of an arabinose-fermentation Zymomonas mobilis 균주 by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470)내의 이중 유전자의 클로닝은 헥소스 및 펜토스를 에탄올 전환 (공동발효)할 수 있는 유기체의 구축을 가능하게 한다. 효모 또는 다른 미생물은 일반적으로 분해된 셀룰로오스 또는 가수분해산물에 첨가되며, 발효는 약 24 내지 약 96 시간, 예컨대, 약 35 내지 약 60 시간 동안 수행된다. 온도는 일반적으로 약 26℃ 내지 약 40℃ 사이, 특히 약 32℃이고, pH는 약 pH 3 내지 약 pH 6, 특히 약 pH 4-5이다.

<230> 본 발명의 양호한 특징으로서, 효모 또는 다른 미생물은 분해된 셀룰로오스 또는 가수분해산물에 적용되며 발효는 약 24 내지 약 96 시간 동안, 예컨대, 일반적으로 35-60 시간 동안 수행된다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 온도는 일반적으로 약 26 내지 약 40℃ 사이, 특히 약 32℃, pH는 일반적으로 약 pH 3 내지 약 pH 6, 바람직하게는 약 pH 4-5이다. 효모 또는 다른 미생물은 바람직하게는 대략 10^5 내지 10^{12} 의 양으로, 바람직하게는 대략 10^7 내지 10^{10} , 특히 대략 5×10^7 생존 계수/ml의 발효 액체 배지의 양으로 적용한다. 에탄올 생산기에서, 효모 세포는 바람직하게는 대략 10^7 내지 10^{10} 의 범위로, 특히 대략 2×10^8 의 범위로 계수된다. 발효를 위한 효모 사용에 관한 추가의 지침은, 예컨대, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D. R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999)에서 찾을 수 있으며, 이는 본원에서 참고자료로서 포함되었다.

<231> 기술 분야에서 가장 널리 사용되는 공정은 동시 당화 및 발효 (SSF) 공정이며, 여기서는 당화를 위한 고정 단계가 없으며, 이는 효모 및 효소가 함께 첨가되었음을 의미한다.

<232> 발효에 따르는 에탄올 생산을 위하여, 메쉬(mash)를 증류하여 에탄올을 추출한다. 본 발명의 공정에 따라 획득한 에탄올은, 예컨대, 연료 에탄올, 음용 에탄올, 즉, 음용 중성 주정, 또는 공업용 에탄올에 사용될 수 있다. 발효 시뮬레이터는 발효 공정을 추가로 개선하기 위하여 본 발명의 모든 효소 공정의 조합으로 사용할 수도 있으며, 특히, 발효 미생물의 성능, 예컨대, 증진을 및 에탄올 수득률이다. "발효 시뮬레이터"는 발효 미생물,

특히, 효모의 성장을 위한 시물레이터를 말한다. 성장을 위한 양호한 발효 시물레이터는 비타민 및 미네랄을 포함한다. 비타민의 예는 멀티비타민, 바이오틴, 판토텐산염, 니코틴산, 메소-이노시톨, 티아민, 피리독신, 파라-아미노벤조산, 폴산, 리보플라빈, 및 비타민 A, B, C, D, 및 E를 포함한다. 예컨대, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002)를 참조하며, 이는 본 명세서에 참고 자료로서 포함되어 있다. 미네랄의 예는 미네랄 및 P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, 및 Cu를 포함하는 양분을 공급하는 미네랄 염을 포함한다.

<233> 회수. 알콜은 발효된 셀룰로오스성 물질로부터 분리되고, 종래의 증류 방법에 의하여 정제된다. 약 96 부피%까지의 순도를 지닌 에탄올을 획득할 수 있으며, 이는 예를 들면, 연료 에탄올, 음용 에탄올, 즉, 음용 증성주정, 또는 공업용 에탄올로 사용할 수 있다.

<234> 다른 물질에 있어서, 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환, 친화도, 소수성, 크로마토포커싱, 및 크기 배제), 전기영동법(예컨대, 예비 등전점 포커싱), 용해도차(예컨대, 황산 암모늄 침전), SDS-PAGE, 증류, 또는 추출을 포함하나 이에 한정되지 않는 알려진 모든 방법이 사용될 수 있다.

<235> 본 발명의 방법에 있어서, 셀룰로오스가수분해 단백질(들) 및 셀룰로오스가수분해 증진 폴리펩타이드(들)은 셀룰로오스성 물질의 분해를 향상시키는 하나 이상의 추가적 효소 활성에 의하여 보충될 수 있다. 양호한 추가의 효소는 헤미셀룰라아제, 에스테라아제(예컨대, 리파아제, 포스포리파아제, 및/또는 큐티나아제), 프로테아제, 락카아제, 퍼옥시다아제, 또는 이들의 혼합물이다.

<236> 본 발명의 방법에 있어서, 추가의 효소(들)은 발효 전 또는 도중에 첨가될 수 있으며, 발효 미생물(들)의 증식과정 또는 이후를 포함한다.

<237> 본원에서 참고한 효소는 박테리아, 진균, 효모 또는 포유류 기원을 포함하는 모든 적합한 기원으로부터 유도되거나 또는 획득할 수 있다. "획득한"이라는 용어는 본원에서 효소가 천연 효소로서 효소를 자연적으로 생산하는 유기체로부터 분리될 수 있다는 것을 의미한다. 용어 "획득한"은 또한 숙주 유기체에서 재조합하여 생산되는 효소를 의미하며, 여기서, 재조합하여 생산된 효소는 숙주 세포에 대하여 천연의 또는 외래의 것이거나 또는 변형된 아미노산 서열, 예컨대, 결실, 삽입 및/또는 치환된 하나 이상의 아미노산을 보유하며, 즉, 공지된 핵산 서열 서플링 공정에 의하여 생산된 천연 아미노산 서열 또는 효소의 돌연변이 및/또는 절편인 재조합하여 생산된 효소이다. 천연 효소의 의미는 천연 변이체를 포괄하며, 외래 효소는 예컨대, 부위-지향성 돌연변이유발 또는 서플링에 의하여 재조합적으로 획득한 변이체를 포괄한다.

<238> 효소는 정제될 수 있다. 본원에서 용어 "정제된"은 이들이 유도된 유기체의 다른 성분이 부재한 효소를 포함한다. 용어 "정제된"은 또한 이들을 획득한 천연 유기체의 성분이 부재한 효소를 포함한다. 효소는 단지 소량으로 존재하는 다른 단백질과 함께 정제된다. "다른 단백질"이라는 표현은 특히, 다른 효소에 관한 것이다. 본원에서 사용된 용어 "정제된"은 또한 성분, 특히 다른 단백질, 더 상세히는 본 발명의 효소 기원 세포에 존재하는 다른 효소의 제거를 의미한다. 효소는 "실질적으로 순수 폴리펩타이드"이며 예를 들면, 재조합하여 생산된 효소를 위한 숙주 유기체인 생산되는 유기체의 다른 성분이 부재한다.

<239> 본 발명에 사용된 효소는 본 명세서에서 설명한 공정에 사용되기 적합한 모든 형태, 예컨대, 세포를 포함하거나 포함하지 않은 미정제 발효 액체 배지, 건조 분말 또는 과립, 무-비산 과립, 액체, 안정화 액체, 또는 보호된 효소가 될 수 있다. 과립이 사용될 수도 있으며, 예컨대, 미국 등록 특허 번호 4,106,991 및 4,661,452에 설명되어 있고, 공지의 절차에 따라 선택적으로 피복될 수도 있다. 액체 효소 제조품은, 예를 들면, 확립된 공정에 따라 안정화제 예컨대, 당, 당 알콜 또는 다른 폴리올, 및/또는 락트산 또는 다른 유기산을 첨가하여 안정화될 수 있다. 보호된 효소는 EP 238,216에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다

<240> 헤미셀룰라아제

<241> 헤미셀룰로오스의 효소적 가수분해는 다양한 진균 및 박테리아에 의하여 수행될 수 있다. 셀룰로오스 분해와 유사하게, 헤미셀룰로오스 가수분해도 많은 효소의 조합 반응을 필요로 한다. 헤미셀룰라아제는 3 종의 일반적인 범주에 포함될 수 있다: 다당류 사슬 내의 내부 결합을 공격하는 내부-활성 효소, 다당류 사슬의 감쇄 또는 비감쇄 말단으로부터 순서대로 작용하는 외부-활성 효소, 및 리그닌 글리코사이드 결합을 가수분해하는 보조 효소, 아세틸에스테라아제 및 에스테라아제, 예컨대, 코우마르산 에스테라아제 및 페룰린산 에스테라아제(Wong, K.K.Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N., 1988, Multiplicity of β -1,4-Xylanase in microorganisms: Functions and applications, Microbiol. Rev. 52: 305-317; Tenkanen, M., and Poutanen,

K., 1992, Significance of esterases in the degradation of xylans, in Xylans and Xylanases, Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., eds., Elsevier, New York, NY, 203-212; Coughlan, M. P., and Hazlewood, G. P., 1993, Hemicellulose and Hemicellulase, Portland, London, UK; Brigham, J. S., Adney, W. S., and Himmel, M. E., 1996, Hemicellulases: Diversity and applications, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 119- 141).

<242> 헤미셀룰라아제는 자일라나아제, 아라비노퓨라노시다아제, 아세틸 자일란 에스테라아제, 글루쿠로니다아제, 엔도-갈락타나아제, 만난나아제, 엔도 또는 엑소 아라비나아제, 엑소-갈락타나아제, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 내부-활성 헤미셀룰라아제 및 보조 효소의 예는 엔도아라비나나아제, 엔도아라비노갈락타나아제, 엔도글루카나아제, 엔도만난나아제, 엔도자일라나아제, 및 펙타산 엔도자일라나아제를 포함한다. 외부-활성 헤미셀룰라아제 및 보조 효소의 예는 α -L-아라비노시다아제, β -L-아라비노시다아제, α -1,2-L-푸코시다아제, α -D-갈락토시다아제, β -D-갈락토시다아제, β -D-글루코시다아제, β -D-글루쿠로니다아제, β -D-만노시다아제, β -D-자일로시다아제, 엑소글루코시다아제, 엑소셀로바이오가수분해효소, 엑소만노바이오가수분해효소, 엑소만난나아제, 엑소자일라나아제, 자일란 α -글루쿠로니다아제, 및 코니페린 β -글루코시다아제를 포함한다. 에스테라아제의 예는 아세틸 에스테라아제 (아세틸갈락탄 에스테라아제, 아세틸만난 에스테라아제, 및 아세틸자일란 에스테라아제) 및 아릴 에스테라아제 (코우마르산 에스테라아제 및 페룰린산 에스테라아제)를 포함한다.

<243> 바람직하게는, 헤미셀룰라아제는 외부-활성 헤미셀룰라아제이며, 더 바람직하게는, pH 7 이하의 산성 조건 하에서 헤미셀룰로오스의 가수분해능을 보유한 외부-활성 헤미셀룰라아제이다. 본 발명에 사용하기 적합한 헤미셀룰라아제의 예는 VISCOZYME™ (Novozymes A/S, Denmark)이다. 헤미셀룰라아제는 약 0.001% 내지 약 5.0% wt의 고체, 더 바람직하게는 약 0.025% 내지 약 4.0% wt의 고체, 및 가장 바람직하게는 약 0.005% 내지 약 2.0% wt의 고체인 유효량으로 첨가된다.

<244> 자일라나아제(E.C. 3.2.1.8)는 진균 및 박테리아 유기체, 예컨대, 아스퍼길루스, 디스포트리콰, 페니실륨, 뉴로스포라, 푸사리움, 트리코테르마, 휴미콜라, 더모마이세스, 및 바실루스를 포함하는 적합한 모든 공급원으로부터 획득할 수 있다. 자일라나아제를 포함하는 양호한 구득 가능한 제조품은 SHEARZYME®, BIOFEED WHEAT®, BIO_FEED Plus® L, CELLULAST®, ULTRAFLO®, VISCOZYME®, PENTOPAN MONO® BG, 및 PULPZYME® HC (Novozymes A/S); 및 LAMINEX® 및 SPEZYME® CP (Genencor Int.)를 포함한다.

<245> 에스테라아제

<246> 셀룰로오스의 생물전환에 사용될 수 있는 에스테라아제는 아세틸 에스테라아제 예컨대, 아세틸갈락탄 에스테라아제, 아세틸만난 에스테라아제, 및 아세틸자일란 에스테라아제, 및 리그닌 글리코사이드 결합을 가수분해하는 에스테라아제, 예컨대, 코우마르산 에스테라아제 및 페룰린산 에스테라아제를 포함한다. 본원에서 사용하는 바와 같이, "에스테라아제"는 또한 카르복실 에스테르 가수분해효소로 알려져 있으며, 이는 에스테르 결합에 작용하는 효소를 말하며, 효소 명명법에 따라 EC 3.1.1 카르복실 에스테르 가수분해효소로 분류된 효소를 포함한다(Enzyme Nomenclature, 1992, Academic Press, San Diego, California, with Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) and Supplement 5, in Eur. J. Biochem. 223: 1-5, 1994; Eur. J. Biochem. 232: 1-6, 1995; Eur. J. Biochem. 237: 1-5, 1996; Eur. J. Biochem. 250: 1-6, 1997, and Eur. J. Biochem. 264: 610-650, 1999; 각각). 에스테라아제의 비-제한적 예는 아릴에스테라아제, 트리아실글리세롤 리파아제, 아세틸에스테라아제, 아세틸콜린에스테라아제, 콜린에스테라아제, 트로핀에스테라아제, 펙틴에스테라아제, 스테롤 에스테라아제, 클로로필라아제, L-아라비노노락토나아제, 글루코노락토나아제, 우로노락토나아제, 탄나아제, 레티닐-팔미테이트 에스테라아제, 히드록시부티레이트-이량체 가수분해효소, 아실글리세롤 리파아제, 3-옥소아디페이트 에놀-락토나아제, 1,4-락토나아제, 갈락토리파아제, 4-피리독소락토나아제, 아실카미틴 가수분해효소, 아미노아실-tRNA 가수분해효소, D-아라비노노락토나아제, 6-포스포글루코노락토나아제, 포스포리파아제 A1, 6-아세틸글루코스 테아세틸라아제, 리포프로테인 리파아제, 디하이드로코우마린 리파아제, 리모닌-D-링-락토나아제, 스테로이드-락토나아제, 트리아세테이트-락토나아제, 악티노마이신 락토나아제, 오르셀리네이트-탐시드 가수분해효소, 세팔로스포린-C 테아세틸라아제, 클로로제네이트 가수분해효소, 알파-아미노산 에스테라아제, 4-메틸옥살로아세테이트 에스테라아제, 카르복시메틸에네부테놀리다아제, 테옥시리모네이트 A-링-락토나아제, 2-아세틸-1-알킬글리세로포스포콜린 에스테라아제, 푸사리닌-C 오미틴 에스테라아제, 시나핀 에스테라아제, 왁스-에스테르 가수분해효소, 포르볼-디에스테르 가수분해효소, 포스포티딜리노시톨 테아실라아제, 시아레이트 O-아세틸에스테라아제, 아세톡시부티닐비티오펜 테아세틸라아제, 아세틸살리실레이트 테아세틸라아제, 메틸움벨리페릴-아세테이트 테아세틸라아제, 2-피론-4,6-디카르복실레이트 락토

나아제, N- 아세틸갈락토스아미노글리칸 데아세틸라아제, 쥬베닐-호르몬 에스테라아제, 비스(2-에틸헥실)프탈레이트 에스테라아제, 단백질-글루타메이트 메틸에스테라아제, 11-시스-레티닐-팔미테이트 가수분해효소, 올-트랜스-레티닐-팔미테이트 가수분해효소, L-람노노-1,4-락토나아제, 5-(3,4-디아세톡시부트-1-티닐)-2,2'-비티오펜 데아세틸라아제, 페티-아실-에틸-에스테르 합성효소, 자일로노-1,4-락토나아제, N-아세틸글루코사미닐포스포타일리노시톨 데아세틸라아제, 세트락세이트 벤질에스테라아제, 아세틸알킬글리세롤 아세틸가수분해효소, 및 아세틸자일란 에스테라아제를 포함한다.

<247> 본 발명에 사용하기에 양호한 에스테라아제는 지방분해 효소, 예컨대, 리파아제 (EC 3.1.1.3, EC 3.1.1.23, 및/또는 EC 3.1.1.26로 분류) 및 포스포리파아제 (EC 3.1.1.4 및/또는 EC 3.1.1.32로 분류, EC 3.1.1.5로 분류된 라이소포스포리파아제를 포함)이다. 다른 양호한 에스테라아제는 큐티나아제 (EC 3.1.1.74로 분류)이다.

<248> 에스테라아제는 발효 미생물의 성능을 개선하여 소망하는 이득을 얻기 위하여, 예를 들면, 내부 및/또는 외부 발효 미생물 또는 발효 미생물의 세포막 내에서 지질 조성/농도를 변화시켜 발효시 발효 미생물 내로 및/또는 밖으로 용질의 이동을 개선시키거나 및/또는 (예컨대, 예를 들면, 성분, 예컨대, 옥수수 기질의 오일을, 발효 미생물에 유용한 성분, 예컨대, 불포화 지방산 및 글리세롤로 전환함으로써) 더 많은 대사가능한 에너지를 제공하여 에탄올 수율을 증가시키기 위하여 유효량으로 첨가된다. 에스테라아제의 유효량의 예는 약 0.01 내지 약 400 LU/g DS (건조 고체량)이다. 바람직하게는, 에스테라아제는 약 0.1 내지 약 100 LU/g DS, 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 50 LU/g DS, 및 더욱 더 바람직하게는 약 1 내지 약 20 LU/g DS의 유효량으로 사용된다. 에스테라아제 양의 추가의 최적화는 이후 당해 기술 분야에 알려진 표준 절차를 사용하여 획득할 수 있다.

<249> 일 리파아제 유닛(LU)은 30℃, pH 7.0 (포스페이트 완충제)에서 1.0 μmol의 적정가능한 지방산/분을 기질인 트리부틸린 및 에틸전화제인 검 아라빅(gum arabic)과 함께 유리시키는 효소량이다.

<250> 본 발명의 양호한 특징으로서, 에스테라아제는 지방분해 효소, 더 바람직하게는, 리파아제이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "지방분해 효소"는 리파아제 및 포스포리파아제 (라이소-포스포리파아제를 포함)를 말한다. 지방분해 효소는 바람직하게는 미생물 기원, 특히 박테리아, 진균 또는 효모 기원의 것이다. 사용된 지방분해 효소는 모든 공급원으로부터 유도된 것이며, 이는, 예를 들면, 아비시디아(*Absidia*)의 균주, 특히 아비시디아 블라케슬레나(*Absidia blakesleena*) 및 아비시디아 코람비페라(*Absidia corymbifera*), 아크로모박터(*Achromobacter*)의 균주, 특히 아크로모박터 아이오파구스(*Achromobacter iophagus*), 아에로모나스(*Aeromonas*)의 균주, 알테르나리아(*Alternaria*)의 균주, 특히 알테르나리아 브라시시올라(*Alternaria brassiciola*), 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 균주, 특히 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*), 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 및 아스퍼길루스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아크로모박터(*Achromobacter*)의 균주, 특히 아크로모박터 아이오파구스(*Achromobacter iophagus*), 아우레오바시디움(*Aureobasidium*)의 균주, 특히 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*), 바실루스(*Bacillus*)의 균주, 특히 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*), 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*), 및 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 베우베리아(*Beauveria*)의 균주, 브로코트릭스(*Brochothrix*)의 균주, 특히 브로코트릭스 더모소하타(*Brochothrix thermosohata*), 칸디다(*Candida*)의 균주, 특히 칸디다 실린드라세아(*Candida cylindracea* (칸디다 루고사, *Candida rugosa*)), 칸디다 파라리폴리티카(*Candida paralipolytica*), 및 칸디다 안타르티카(*Candida antarctica*), 크로모박터(*Chromobacter*)의 균주, 특히 크로모박터 비스코숨(*Chromobacter viscosum*), 코프린누스(*Coprinus*)의 균주, 특히 코프린누스 시네레우스(*Coprinus cinereus*), 푸사리움(*Fusarium*)의 균주, 특히 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 푸사리움 솔라니 피시(*Fusarium solani pisi*), 푸사리움 로세움 쿨모룸(*Fusarium roseum culmorum*), 및 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*), 지오텐리움(*Geotricum*)의 균주, 특히 지오텐리움 페니실라툼(*Geotricum penicillatum*), 한세눌라(*Hansenula*)의 균주, 특히 한세눌라 아노말라(*Hansenula anomala*), 휴미콜라(*Humicola*)의 균주, 특히 휴미콜라 브레비스포라(*Humicola brevispora*), 휴미콜라 브레비스 변종 더모이데아(*Humicola brevis var. thermoidea*), 및 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 히포지마(*Hyphozyma*)의 균주, 락토바실루스(*LactoBacillus*)의 균주, 특히 락토바실루스 큐르바투스(*LactoBacillus curvatus*), 메타리지움(*Metarhizium*)의 균주, 뮤코르(*Mucor*)의 균주, 파에실로마이세스(*Paecilomyces*)의 균주, 페니실리움(*Penicillium*)의 균주, 특히 페니실리움 시클로피움(*Penicillium cyclopium*), 페니실리움 크루스토숨(*Penicillium crustosum*) 및 페니실리움 엑스펜숨(*Penicillium expansum*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)의 균주 특히 슈도모나스 아에루기로사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 알칼리제네스(*Pseudomonas alcaligenes*), 슈도모나스 세파시아(*Pseudomonas cepacia*, 부르크홀데리아 세파시아 (*holderia cepacia*)와 동일), 슈도모나스

플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 트라지(*Pseudomonas tragi*), 슈도모나스 말토피라(*Pseudomonas maltophilia*), 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*), 슈도모나스 메피티카 리폴리티카(*Pseudomonas mephitica lipolytica*), 슈도모나스 알칼리제네스(*Pseudomonas alcaligenes*), 슈도모나스 프렌타리(*Pseudomonas Plantari*), 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈슈도모나스 스투트제리(*Pseudomonas stutzeri*), 및 슈도모나스 위스콘신렌시스(*Pseudomonas wisconsinensis*), 리조옥토니아(*Rhizooctonia*)의 균주, 특히 리조옥토니아 솔라니(*Rhizooctonia solani*), 리조뮤코르(*Rhizomucor*)의 균주, 특히 리조뮤코르 메이헤이(*Rhizomucor miehei*), 리조푸스(*Rhizopus*)의 균주, 특히 리조푸스 야포니쿠스(*Rhizopus japonicus*), 리조푸스 미크로스포르투스(*Rhizopus microsporus*), 및 리조푸스 노도수스(*Rhizopus nodosus*), 로도스포디움(*Rhodospohdium*)의 균주, 특히 로도스포리움 토루로이데스(*Rhodosporeidium toruloides*), 로도톨루라(*Rhodotorula*)의 균주, 특히 로도톨루라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 스포로볼로마이세스(*Sporobolomyces*)의 균주, 특히 스포로볼로마이세스 시바타누스(*Sporobolomyces shibatanus*), 더모마이세스(*Thermomyces*)의 균주, 특히 더모마이세스 라누기노수스(*Thermomyces lanuginosus*) (이전에 휴미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*)), 티아로스포렐라(*Thiarosporella*)의 균주, 특히 티아로스 포렐라 파세올리나(*Thiarosporella phaseolina*), 트리코테르마(*Trichoderma*)의 균주, 특히, 트리코테르마 하르지아눔(*Trichoderma harzianum*) 및 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*), 및/또는 베르티실룸(*Verticillium*)의 균주를 포함한다.

<251> 본 발명의 양호한 특징으로서, 지방분해 효소는 아스퍼길루스, 아크로모박터, 바실루스, 칸디다, 크로모박터, 푸사리움, 휴미콜라, 히포지마, 슈도모나스, 리조뮤코르, 리조푸스, 또는 더모마이세스의 균주로부터 유도된다.

<252> 본 발명의 더 양호한 특징으로서, 지방분해 효소는 리파아제이다. 리파아제는 본 명세서에서 발효 배지(발효 효모 포함), 예를 들면, 옥수수 기질의 트리글리세라이드 오일 및 지방의 구조 및 조성을 개질시키는 능력으로서 적용된다. 리파아제는 다른 유형의 트리글리세라이드 전환, 예컨대, 가수분해, 에스테르화, 및 트랜스에스테르화를 촉매한다. 적합한 리파아제는 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이 산성, 중성, 및 염기성 리파아제를 포함하며, 산성 리파아제 (예컨대, 리파아제 G AMANO 50, Amano)가 중성 또는 염기성 리파아제에 비하여 저농도의 리파아제에서 더욱 효과적인 것으로 보인다. 본 발명에 사용되기에 양호한 리파아제는 칸디다 안타르시티카(*Candida antarctica*) 리파아제 및 칸디다 실린드라세아(*Candida cylindracea*) 리파아제를 포함한다. 더욱 양호한 리파아제는 정제된 리파아제 예컨대, 칸디다 안타르시티카(*Candida antarctica*) 리파아제 (리파아제 A), 칸디다 안타르시티카(*Candida antarctica*) 리파아제 (리파아제 B), 칸디다 실린드라세아(*Candida cylindracea*) 리파아제, 및 페니실리움 카렘베르티(*Penicillium camembertii*) 리파아제이다.

<253> 리파아제는 EP 258,068-A에 개시된 것이거나 또는 리파아제 변이체 예컨대, 본 명세서에서 참고자료로서 포함된 WO 00/60063 또는 WO 00/32758에서 개시된 변이체가 될 수 있다.

<254> 리파아제는 바람직하게는 약 1 내지 약 400 LU/g DS, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 LU/g DS, 및 더 바람직하게는 약 1 내지 약 5 LU/g DS의 양으로 첨가된다.

<255> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 에스테라아제는 큐티나아제이다. 큐티나아제는 큐틴을 분해할 수 있는 효소이다. 큐티나아제는 모든 공급원으로부터 유도될 수 있다. 본 발명의 양호한 특징으로서, 큐티나아제는 아스퍼길루스의 균주, 특히 아스퍼르길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*), 알테르나리아(*Alternaria*)의 균주, 특히 알테르나리아 브라시시올라(*Alternaria brassiciola*), 푸사리움의 균주, 특히 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 푸사리움 솔라니 피시(*Fusarium solani pisi*), 푸사리움 로세움 클로룸(*Fusarium roseum culmorum*), 또는 푸사리움 로세움 삼부시눔(*Fusarium roseum sambuClum*), 헬민토스포룸(*Helminthosporum*)의 균주, 특히 헬민토스포룸 사티붐(*Helminthosporum sativum*), 휴미콜라의 균주, 특히 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 슈도모나스의 균주, 특히 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 리조옥토니아의 균주, 특히 리조옥토니아 솔라니(*Rhizooctonia solani*), 스트렙토마이세스의 균주, 특히 스트렙토마이세스 스카비에스(*Streptomyces scabies*), 또는 울로클라디움(*Ulocladium*)의 균주, 특히 울로클라디움 콘소르티알레(*Ulocladium consortiale*)로부터 유도된다. 본 발명의 가장 양호한 특징으로서 큐티나아제는 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 특히 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) DSM 1800으로부터 유도된다. 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) 큐티나아제는 WO 96/13580에서 설명하였으며, 이는 본원에 참고자료로 포함되었다. 큐티나아제는 변이체, 예컨대, WO 00/34450 및 WO 01/92502에서 개시된 변이체의 하나일 수 있으며, 이들은 본원에 참고자료로 포함되었다. 양호한 큐티나아제 변이체는 본원에 참고자료로 포함된 WO 01/92502의 실시예 2에서 열거한 변이체를 포함한다. 유효량의 큐티나아제는 약 0.01 내지 약 400 LU/g DS, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 100 LU/g DS, 및 더 바람직하게는 약 1 내지 약 50 LU/g DS이다. 큐티나아제 양에

대한 추가의 최적화는 이후 당해 기술 분야에 알려진 표준 절차를 사용하여 획득할 수 있다.

<256> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 에스테라아제는 포스포리파아제이다. 본원에서 사용된 용어 "포스포리파아제"는 포스포리피드에 대한 활성을 지닌 효소이며, 예컨대, 가수분해 활성이다. 포스포리피드, 예컨대, 레시틴 또는 포스파티딜콜린은 외부 (sn-1) 및 중간 (sn-2) 위치에서 2개의 지방산으로 에스테르화되고, 제3의 위치에서 인산으로 에스테르화된 글리세롤로 구성되어 있다. 인산은 아미노-알콜로 에스테르화될 수 있다. 각 유형의 포스포리파아제 활성은 식별될 수 있으며, 하나의 페티 아실 그룹 (sn-1 및 sn-2 위치, 각각)을 가수분해하여 라이소포스포리피드를 형성하는 포스포리파아제 A1 및 A2; 라이소포스포리피드 내의 잔존 페티 아실 그룹을 가수분해하는 라이소포스포리파아제 (또는 포스포리파아제 B)를 포함한다. 포스포리파아제 C 및 포스포리파아제 D (포스포디에스테라아제)는 디아실 글리세롤 또는 포스파타이드산을 각각 방출한다.

<257> 용어 "포스포리파아제"는 포스포리파아제 활성을 지닌 효소, 예컨대, 포스포리파아제 A (A1 또는 A2), 포스포리파아제 B 활성, 포스포리파아제 C 활성, 또는 포스포리파아제 D 활성을 지닌 효소를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "포스포리파아제 A"는 포스포리파아제 A1 및/또는 포스포리파아제 A2 활성을 지닌 효소를 포함하는 것을 의도한다. 포스포리파아제 활성은 다른 활성을 지닌 효소, 예컨대, 포스포리파아제 활성을 지닌 리파아제 등에 의하여 제공된다. 포스포리파아제 활성은, 예를 들면, 포스포리파아제 불활성을 지닌 리파아제에 의한 것이 될 수 있다. 본 발명의 다른 특징으로서, 포스포리파아제 효소 활성은 필수적으로 포스포리파아제 활성만을 보유한 효소에 의하여 제공되며, 여기서 포스포리파아제 효소 활성은 불활성이 아니다.

<258> 포스포리파아제는 모든 기원의 것이 될 수 있으며, 예를 들면, 동물 기원(예컨대, 포유류, 예를 들면, 소 또는 돼지의 채장), 또는 뱀 독소 또는 벌 독소의 것이다. 다른 실시 상태로서, 포스포리파아제는 미생물 기원의 것이 될 수 있으며, 예를 들면, 사상 진균, 효모 또는 박테리아, 예컨대, 아스퍼길루스, 예컨대, 아스퍼길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼길루스 포에티두스(*Aspergillus foetidus*), 아스퍼길루스 자포니쿠스(*Aspergillus japonicus*), 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) 또는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*), 딕티오스텔리움(*Dictyostelium*), 예컨대, 딕티오스텔리움 디스코이데움(*D. discoideum*); 푸사리움, 예컨대, 푸사리움 쿨모룸(*Fusarium culmorum*), 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*), 푸사리움 헤테로스포룸(*Fusarium heterosporum*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 베네나툼(*Fusarium venenatum*); 뮤코르, 예컨대, 뮤코르 야바니쿠스(*M. javanicus*), 뮤코르 무세도(*M. mucedo*), 또는 뮤코르 서브티리시무스(*M. subtilissimus*); 뉴로스포라, 예컨대, 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*); 리조뮤코르, 예컨대, 리조뮤코르 푸실루스(*R. pusillus*); 리조푸스, 예컨대, 리조푸스 아르히주스(*R. arrhizus*), 리조푸스 자포니쿠스(*R. japonicus*), 또는 리조푸스 스톨로니퍼(*R. stolonifer*); 스클레로티니아(*Sclerotinia*), 예컨대, 스클레로티니아 리베르티아나(*S. libertiana*); 트리코피톤(*Trichophyton*), 예컨대, 트리코피톤 루브룸(*T. rubrum*); 웨첼리나(*Whetzelinia*), 예컨대, 웨첼리나 스클레로티오룸(*W. sclerotiorum*); 바실루스, 예컨대, 바실루스 메가테리움(*B. megaterium*) 또는 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*); 시트로박터(*Citrobacter*), 예컨대, 시트로박터 프레운디(*C. freundii*); 엔테로박터(*Enterobacter*), 예컨대, 엔테로박터 아에로제네스(*E. aerogenes*) 또는 엔테로박터 클로아카에(*E. cloacae*); 에드워드시엘라(*Edwardsiella*), 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*); 에르위니아(*Erwinia*), 예컨대, 에르위니아 헤르비콜라(*E. herbicola*); 에셔리시아(*Escherichia*), 예컨대, 에셔리시아 콜리(*E. coli*); 클레브시엘라(*Klebsiella*), 예컨대, 클레브시엘라 뉴모니아에(*K. pneumoniae*); 프로테우스(*Proteus*), 예컨대, 프로테우스 불가리스(*P. vulgaris*); 프로비덴시아(*Providencia*), 예컨대, 프로비덴시아 스투아르티(*P. stuartii*); 살모넬라(*Salmonella*), 예컨대, 살모넬라 티피뮤리움(*S. typhimurium*); 세르라티아(*Serratia*), 예컨대, 세르라티아 리퀴에파시엔스(*S. liquefasciens*), 세르라티아 마르세스센스(*S. marcescens*); 쉬겔라(*Shigella*), 예컨대, 쉬겔라 플렉스네리(*S. flexneri*); 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 예컨대, 스트렙토마이세스 비올레세올루버(*S. violeceoruber*); 또는 여르시니아(*Yersinia*), 예컨대, 여르시니아 엔테로콜리티아(*Y. enterocolitica*)의 것이다.

<259> 양호한 상용 포스포리파아제는 LECITASE™ 및 LECITASE™ ULTRA (Novozymes A/S, Denmark)를 포함한다.

<260> 포스포리파아제의 유효량은 약 0.01 내지 약 400 LU/g DS, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 100 LU/g DS, 및 더 바람직하게는 약 1 내지 약 50 LU/g DS이다. 포스포리파아제의 양에 대한 추가의 최적화는 이후 당해 기술 분야에 알려진 표준 절차를 사용하여 획득할 수 있다.

<261> 프로테아제

<262> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 최소한 하나의 계면활성제 및 최소한 하나의 탄수화물 생성 효소가 최소한

하나의 프로테아제와 조합하여 사용된다. 프로테아제는, 예컨대, 단백질을 분해하여 유리 아미노 질소(FAN)를 생산하기 위하여 사용된다. 이러한 유리 아미노산은 효모 양분으로서 기능하며, 효모 성장을 증진시키며, 결과적으로 에탄올 생산을 촉진한다.

<263> 발효 공정에 사용된 발효 미생물은 최소한 하나의 프로테아제의 존재 하에 발효 미생물의 증식에 의하여 생산된다. 어떠한 작업 이론에도 제한되지 않음에도, 프로테아제의 첨가가 없는 동일한 조건 하에서 발효 미생물이 증식되는 것과 비교하면 발효 미생물이 이후 발효 공정에 사용되는 경우, 유효량의 최소한 하나의 프로테아제를 지닌 발효 미생물의 증식은 발효 미생물의 지체 시간을 감소시킨다고 알려져 있다. 증식 공정에서의 프로테아제의 작용은 발효시 발효 미생물에 각각 결정적이거나 또는 유리한 유전자의 억제 또는 발현에 직접 또는 간접적으로 영향을 주어 지연시간을 감소시키고, 발효 주기를 빠르게 한다.

<264> 프로테아제는 잘 알려져 있으며, 펩타이드 본드의 분해를 촉매하는 효소를 말한다. 적합한 프로테아제는 진균 및 박테리아 프로테아제를 포함한다. 양호한 프로테아제는 산성 프로테아제, 즉, pH 7 이하의 산성 조건 하에서 단백질을 가수분해하는 능력으로 특성화된 프로테아제이다. 적합한 산성 진균 프로테아제는 진균 프로테아제는 아스퍼길루스, 뮤코르, 리조푸스, 칸디다, 코리올루스, 엔도시아, 엔도모프테라, 이르팩스, 페니실리움, 스크레오티움(균핵, Sclerotium), 및 토루롭시스(Torulopsis)로부터 유도된다. 특히, 프로테아제로서 고려되는 것은 아스퍼길루스 니게르(*Aspergillus niger*) (예컨대, Koaze et al., 1964, Agr. Biol. Chem. Japan 28: 216), 아스퍼길루스 사이토이(*Aspergillus saitoi*) (예컨대, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japan 28: 66), 아스퍼길루스 아와모리(*Aspergillus awamori*) (Hayashida et al., 1977, Agric. Biol. Chem. 42: 927-933), 아스퍼길루스 아쿨레아투스(*Aspergillus aculeatus*) (WO 95/02044), 또는 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)로부터 유도된 프로테아제; 및 뮤코르 푸실루스(*Mucor pusillus*) 또는 뮤코르 미에헤이(*Mucor miehei*)로부터 유도된 산성 프로테아제이다. 산성 프로테아제가 아닌 박테리아 프로테아제는 상품인 ALCALASE™ 및 NEUTRASE™ (Novozymes A/S)이다. 그 밖의 프로테아제는 GC106(Genencor International, Inc., USA) 및 NOVOZYME™ 50006 (Novozymes A/S)을 포함한다.

<265> 바람직하게는, 프로테아제는 아스파라긴산 프로테아제이며, 예를 들면, Handbook of Proteolytic Enzyme(Edited by A.J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Chapter 270)에 설명되어 있다. 아스파라긴산 프로테아제의 적합한 예는, 예컨대, Berka et al., 1990, Gene 96: 313; Berka et al., 1993, Gene 125: 195-198; 및 Gomi et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100에서 게시한 것들을 포함한다.

<266> 퍼옥시다아제

<267> 다른 화합물 처리용 퍼옥시다아제 활성은 모든 퍼옥시다아제(EC 1.11.1.7)이거나, 또는 이들로부터 유도된 퍼옥시다아제 활성을 지니고 퍼옥시다아제 활성을 발휘하는 모든 절편이 될 수 있다.

<268> 바람직하게는, 퍼옥시다아제는 식물 (예컨대, 겨자무 또는 대두 퍼옥시다아제) 또는 미생물 예컨대, 진균 또는 박테리아에 의하여 생산된다.

<269> 일부 양호한 진균은 불완전균(Deuteromycotina) 아문, 불완전균(Hyphomycetes)에 속하는 균주, 예컨대, 푸사리움, 휴미콜라, 트리코테르마, 미로테시움, 베르티실룸, 아르트로마이세스, 칼다리오마이세스, 울로클라디움, 엠벨리시아, 클라도스포리움, 또는 드레쉬레라, 특히, 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) (DSM 2672), 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*), 미로테시움 베르루카리아(*Myrothecium verrucaria*) (IFO 6113), 베르티실룸 알보아트룸(*Verticillium alboatrum*), 베르티실룸 다흐리에(*Verticillium dahliae*), 엔트로마이세스 라모숨(*Arthromyces ramosus*) (FERM P-7754), 칼다리오마이세스 푸마고(*Caldariomyces fumago*), 울로클라디움 카르타리움(*Ulocladium chartarum*), 엠벨리시아 알리(*Embellisia alii*), 또는 드레쉬레라 할로데스(*Dreschlera halodes*)를 포함한다.

<270> 그 밖의 양호한 진균은 담자균(Basidiomycotina) 아문, 담자균(Basidiomycetes) 강에 속하는 균주, 예컨대, 코프리누스, 파네로차에테, 코리올루스, 또는 트레메테스, 특히 코프리누스 시네레우스 f. 미크로스포르투스(IFO 8371), 코프리누스 마크로리주스(*Coprinus macrorhizus*), 파네로차에테 체리소스포리움(*Phanerochaete chrysosporium*) (예컨대 NA-12), 또는 트라메테스(이전에 폴리포르투스), 예컨대, 트라메테스 베르시콜로르(*T. versicolor*) (예컨대, PR4 28-A)를 포함한다.

<271> 추가의 양호한 진균은 접합균(Zygomycotina) 아문, 진균(Mycoraceae) 강에 속하는 진균, 예컨대, 리조푸스 또는 뮤코르, 특히 뮤코르 히에말리스(*Mucor hiemalis*)를 포함한다. 일부 양호한 박테리아는 방선균

(Actinomycetales) 목에 속하는 균주, 예컨대 스트렙토마이세스 스페로이데스(*Streptomyces spheroides*) (ATCC 23965), 스트렙토마이세스 테르모비오라세우스(*Streptomyces thermoviolaceus*) (IFO 12382), 또는 스트렙토베르티실룸 베르티실룸 종 베르티실룸(*StreptoVerticillum verticillium ssp. verticillium*)을 포함한다.

- <272> 그 밖의 양호한 박테리아는 로도박터 스파에로이데스, 로도모나스 팔루스트리(*Rhodomonas palustri*), 스트렙토코커스 락티스(*Streptococcus lactis*), 슈도모나스 푸르로시니아(*Pseudomonas purrocinia*) (ATCC 15958), 슈도모나스 플루오르센스(*Pseudomonas fluorescens*) (NRRL B-11), 및 바실루스 균주, 예컨대, 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*) (ATCC 12905) 및 바실루스 스테아로더모필루스(*Bacillus stearothermophilus*)를 포함한다.
- <273> 추가의 양호한 박테리아는 마이소코쿠스(*Myxococcus*)에 속하는 균주, 예컨대, 마이소코쿠스 비레시엔스(*M. virescens*)를 포함한다.
- <274> 퍼옥시다아제는 퍼옥시다아제의 발현을 허용하는 조건 하의 배양 배지에서 퍼옥시다아제를 암호화하는 DNA 서열 및 퍼옥시다아제를 암호화하는 DNA 서열을 발현하기 위한 DNA 서열을 담지한 재조합 DNA 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 배양물로부터 퍼옥시다아제를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 생산되는 것이 될 수 있다.
- <275> 본 발명의 양호한 특징으로서, 재조합하여 생산된 퍼옥시다아제는 WO 92/16634에 따라 코프리누스 종(*Coprinus sp.*), 특히 코프리누스 마크로리주스(*C. macrorrhizus*) 또는 코프리누스 시네레우스(*C. cinereus*)에서 유도된 퍼옥시다아제이다.
- <276> 본 발명에서, 화합물 처리 퍼옥시다아제 활성화에는 퍼옥시다아제 효소 및 시토크롬, 헤모글로빈, 또는 퍼옥시다아제 효소에서 유도된 퍼옥시다아제 활성화 절편을 포함한다.
- <277> 일 퍼옥시다아제 유닛(POXU)은 0.1 M 포스페이트 완충제(pH 7.0), 0.88 mM 수소 퍼옥사이드, 및 1.67 mM 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설포네이트) (ABTS) 용액 내에서 30℃의 조건 하에서 분당 1 μ mole의 수소 퍼옥사이드로 전환하는 것을 촉매하는 효소의 양이다. 반응은 418 nm의 부재 하의 변화에 의하여 60 초간(혼합 후 15 초) 진행하였으며, 이는 0.15 내지 0.30의 범위에 있었다. 활성의 계산을 위하여, 36 mM-1 cm-1의 산화된 ABTS의 흡수를 및 2 μ mole 산화된 ABTS당 1 μ mole의 전환된 H₂O₂의 화학량이 사용되었다.
- <278> 락카아제
- <279> 본 발명에 있어서, 락카아제 및 락카아제 유관 효소는 EC 1.10.3.2로 분류된 모든 락카아제 효소, EC 1.10.3.1로 분류된 모든 카테콜 산화효소, EC 1.3.3.5로 분류된 모든 빌리루빈 산화효소, 또는 EC 1.14.18.1로 분류된 모든 모노페놀 모노옥시게나아제 효소를 포함한다.
- <280> 진술한 효소는 미생물, 즉, 박테리아 또는 진균(사상 진균 및 효모를 포함)으로부터 획득한 미생물이거나, 또는 이들은 식물에서 유도된 것일 수 있다.
- <281> 진균의 적합한 예는 아스퍼길루스의 균주, 뉴로스포라, 예컨대, 뉴로스포라 크라싸(*N. crassa*), 포도스포라, 보트리티스, 콜리비아, 포메스, 란티누스, 플레우로테우스, 트라메테스, 예컨대, 트라메테스 빌로사(*T. villosa*) 및 트라메테스 베르시콜로르(*T. versicolor*), 리조옥토니아, 예컨대, 리조옥토니아 솔라니(*R. solani*), 코프리누스, 예컨대, 코프리누스 시네리우스(*C. cinereus*), 코프리누스 코마투스(*C. comatus*), 코프리누스 프리에시(*C. friesii*), 및 코프리누스 플리카틸리스(*C. plicatilis*), 사티렐라, 예컨대, 사티렐라 콘델레아나(*P. condelleana*, *Panaeolus*), 예컨대, 사티렐라 파필리온아세우스(*P. papilionaceus*), 마이셀리오프토라, 예컨대, 마이셀리오프토라 더모필라(*M. thermophila*), 시탈리디움, 예컨대, 시탈리디움 더모필룸(*S. thermophilum*), 폴리포르투스, 예컨대, 폴리포르투스 핀시투스(*P. pinsitus*), 피크노포르투스, 예컨대, 피크노포르투스 시나바리누스(*P. cinnabarinus*), 플레비아, 예컨대, 플레비아 라디타(*P. radita*) (WO 92/01046), 또는 코리올루스, 예컨대, 코리올루스 히르수투스(*C. hirsutus*) (JP 2-238885)에서 획득한 락카아제를 포함한다.
- <282> 박테리아의 적합한 예는 바실루스 균주에서 획득한 락카아제를 포함한다. 코프리누스, 마이셀리오프토라, 폴리포르투스, 피크노포르투스, 시탈리디움 또는 리족토니아에서 획득한 락카아제가 양호하다; 특히 코프리누스 시네레우스(*Coprinus cinereus*), 마이셀리오프토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*), 폴리포르투스 핀시투스(*Polyporus pinsitus*), 피크노포르투스 신나바리누스(*Pycnoporus cinnabarinus*), 시탈리디움 더모필룸(*Scytalidium thermophilum*), 또는 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)에서 획득한 락카아제이다.
- <283> 상용 락카아제는 NS51001 (폴리포르투스 핀시티우스(*Polyporus pinsitius*) 락카아제, Novozymes A/S, Denmark)

및 NS51002 (마이셀리오프토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*) 락카아제, Novozymes A/S, Denmark)이다.

- <284> 락카아제 또는 락카아제 유관 효소는 락카아제의 발현을 허용하는 조건 하의 배양 배지에서 락카아제를 암호화하는 DNA 서열 및 락카아제를 암호화하는 DNA 서열을 발현하기 위한 DNA 서열을 담지한 재조합 DNA 벡터로 형질 전환된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 배양물로부터 락카아제를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 생산되는 것이 될 수 있다.
- <285> 락카아제 활성 (LACU)은 pH 5.5의 유산소 조건하의 실린갈다진(syringa ldazine)의 산화에 의하여 측정된다. 생성된 보라색은 530 nm로 측정되었다. 분석 조건은 19 mM 실린갈다진, 23 mM 아세테이트 완충제, pH 5.5, 30℃, 1 분의 반응 시간이다. 일 락카아제 유닛 (LACU)은 전술한 조건 하에서 분당 1.0 μ mole의 실린갈다진의 전환을 촉매하는 효소의 양이다.
- <286> 락카아제 활성(LAMU)은 pH 7.5의 유산소 조건 하에서 실린갈다진의 산화에 의하여 측정된다. 생성된 보라색은 530 nm로 측정되었다. 분석 조건은 19 mM 실린갈다진, 23 mM 트리스/말레이트, pH 7.5, 30℃, 1 분의 반응 시간이다. 일 락카아제 유닛 (LAMU)은 전술한 조건 하에서 분당 1.0 μ mole의 실린갈다진의 전환을 촉매하는 효소의 양이다.
- <287> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 전술한 효소 및/또는 셀룰로오스가수분해 단백질과 함께 사용되어 바이오매스 기질의 셀룰로오스 성분을 추가로 분해한다(예를 들면, Brigham et al., 1995, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp.119-141, Taylor & Francis, Washington D. C; Lee, 1997, Journal of Biotechnology 56: 1-24).
- <288> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드 및 셀룰로오스가수분해 단백질의 최적량은 성분 셀룰로오스가수분해 단백질의 혼합물, 셀룰로오스성 기질, 셀룰로오스성 기질의 농도, 셀룰로오스성 기질의 선처리(들), 온도, 시간, pH, 및 발효 유기체의 함유물 (예컨대, 동시 당화 및 발효용 효모)를 포함하나 이에 한정되지 않는 몇 종의 인자에 따라 달라진다.
- <289> 본 발명의 양호한 특징으로서, 셀룰로오스성 물질에 대한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드(들)의 유효량은 1 g의 셀룰로오스성 물질당 약 0.01 내지 약 2.0 mg, 바람직하게는 약 0.025 내지 약 1.5 mg, 더 바람직하게는 약 0.05 내지 약 1.25 mg, 더 바람직하게는 약 0.075 내지 약 1.25 mg, 더 바람직하게는 약 0.1 내지 약 1.25 mg, 더욱 더 바람직하게는 약 0.15 내지 약 1.25 mg, 및 가장 바람직하게는 약 0.25 내지 약 1.0 mg이다.
- <290> 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 셀룰로오스성 물질에 대한 셀룰로오스가수분해 단백질(들)의 유효량은 1 g의 셀룰로오스성 물질당 약 0.5 내지 약 50 mg, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 40 mg, 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 25 mg, 더 바람직하게는 약 0.75 내지 약 20 mg, 더 바람직하게는 약 0.75 내지 약 15 mg, 더욱 더 바람직하게는 약 0.5 내지 약 10 mg, 및 가장 바람직하게는 약 2.5 내지 약 10 mg이다.
- <291> 본 발명의 양호한 특징으로서, 셀룰로오스가수분해 단백질(들)에 대한 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 지닌 폴리펩타이드(들)의 유효량은 1 g의 셀룰로오스가수분해 단백질(들)당 약 0.005 내지 약 1.0 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 1.0 g, 더 바람직하게는 약 0.15 내지 약 0.75 g, 더 바람직하게는 약 0.15 내지 약 0.5 g, 더 바람직하게는 약 0.1 내지 약 0.5 g, 더욱 더 바람직하게는 약 0.1 내지 약 0.5 g, 및 가장 바람직하게는 약 0.05 내지 약 0.2 g이다.
- <292> **세정제 조성물**
- <293> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드가 첨가되어, 따라서 세정제 조성물의 성분이 될 수도 있다.
- <294> 본 발명의 세정제 조성물은, 예를 들면, 손세탁 또는 세탁기용 세정제 조성물로서 오염된 섬유의 선처리에 적합한 세탁 첨가제 조성물 및 섬유 유연제 조성물에 첨가되는 린스로 제형화되거나, 또는 일반적인 가정용 바닥 세척 작업용 세정제 조성물로 제형화되거나, 또는 손 또는 기계 식기세척 작업용으로 제형화될 수 있다.
- <295> 본 발명의 특정 실시 상태에서, 본 발명은 전술한 바와 같은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 포함하는 세정제 첨가제를 제공한다.
- <296> 세정제 첨가제 및 세정제 조성물은 하나 이상의 효소 예컨대, 프로테아제, 리파아제, 큐티나아제, 아밀라아제, 카보하이드라아제, 셀룰라아제, 펙티나아제, 만난나아제, 아라비나아제, 갈락타나아제, 자일라나아제,

산화효소, 예컨대, 락카아제, 및/또는 퍼옥시다아제를 포함할 수 있다.

- <297> 일반적으로 선택된 효소(들)의 특성은 선택된 세정제와 용화할 수 있어야 하며, (즉, 최적 pH, 효소 및 비효소 성분과의 용화성, 등.), 효소(들)은 유효량으로 존재하여야 한다.
- <298> 셀룰라아제: 적합한 셀룰라아제는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형된 또는 돌연변이 조작된 단백질이 포함된다. 적합한 셀룰라아제는 바실루스, 슈도모나스, 휴미콜라, 푸사리움, 티에라비아, 아크레모니움 속(genera)의 셀룰라아제, 예컨대, 휴미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*), 미셀리오프토라 더모필라(*Myceliophthora thermophila*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)에서 생산된 진균성 셀룰라아제를 포함한다(미국 등록 특허 번호 4,435,307, 미국 등록 특허 번호 5,648,263, 미국 등록 특허 번호 5,691,178, 미국 등록 특허 번호 5,776,757 및 WO 89/09259).
- <299> 특히 적합한 셀룰라아제는 색상 보호 장점이 있는 염기성 또는 중성 셀룰라아제이다. 이러한 셀룰라아제의 예는 EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, 및 WO 98/08940에 설명된 셀룰라아제이다. 다른 예는 셀룰라아제 변이체로서, 예컨대, WO 94/07998, EP 0 531 315, 미국 등록 특허 번호 5,457,046, 미국 등록 특허 번호 5,686,593, 미국 등록 특허 번호 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 및 PCT/DK98/00299에 설명된 것이다.
- <300> 상용 셀룰라아제는 Celluzyme™, and Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™, 및 Puradax HA™ (Genencor International Inc.), 및 KAC-500(B)™ (Kao Corporation)를 포함한다.
- <301> 프로테아제: 적합한 프로테아제는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것을 포함한다. 미생물 기원이 양호하다. 화학적으로 변형된 또는 돌연변이 조작된 단백질이 포함된다. 프로테아제는 세린 프로테아제 또는 메탈로프로테아제, 바람직하게는 염기성 미생물성 프로테아제 또는 트립신-유사 프로테아제일 수 있다. 염기성 프로테아제의 예는 특히 바실루스로부터 유도된 서브틸리신스(subtilisins), 예컨대, 서브틸리신 노보, 서브틸리신 칼스버그(Carlsberg), 서브틸리신 309, 서브틸리신 147 및 서브틸리신 168 (WO 89/06279)이다. 트립신-유사 프로테아제의 예는 트립신 (예컨대, 돼지 또는 소 기원) 및 푸사리움 프로테아제(WO 89/06270 및 WO 94/25583)이다.
- <302> 유용한 프로테아제의 예는 WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, 및 WO 98/34946에서 설명된 변이체이며, 특히 하나 이상의 다음의 위치: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, 및 274에서 치환된 변이체이다.
- <303> 양호한 상용 프로테아제 효소는 Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, 및 Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™, 및 FN3™ (Genencor International Inc.)를 포함한다.
- <304> 리파아제: 적합한 리파아제는 박테리아 또는 진균 기원의 것이 포함된다. 화학적으로 변형된 또는 돌연변이 조작된 단백질이 포함된다. 유용한 리파아제의 예는 휴미콜라(더모마이세스와 같다)의 리파아제, 예컨대, 휴미콜라 라누기로사(*H. lanuginosa*, *T. lanuginosus*)(EP 258 068 및 EP 305 216) 또는 휴미콜라 인솔렌스(*H. insolens*)(WO 96/13580)의 리파아제, 슈도모나스 리파아제, 예컨대, 슈도모나스 알칼리제네스(*P. alcaligenes*) 또는 슈도모나스 슈도알칼리제네스(*P. pseudoalcaligenes*) (EP 218 272), 슈도모나스 세파시아(*P. cepacia*) (EP 331 376), 슈도모나스 스투체리(*P. stutzeri*) (GB 1,372,034), 슈도모나스 플루오르센스(*P. fluorescens*), 슈도모나스 종 균주 SD 705 (WO 95/06720 및 WO 96/27002), 슈도모나스 위스콘시엔시스(*P. wisconsinensis*) (WO 96/12012)의 리파아제, 바실루스 리파아제, 예컨대, 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*) (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), 바실루스 스테아로더모필루스(*B. stearothermophilus*) (JP 64/744992) 또는 바실루스 푸밀루스(*B. pumilus*) (WO 91/16422)의 리파아제를 포함한다.
- <305> 다른 예는 리파아제 변이체로서 예컨대, WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 및 WO 97/07202에서 설명된 것이다.
- <306> 양호한 상용 리파아제 효소는 Lipolase™, Lipex™, 및 Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S)를 포함한다.
- <307> 아밀라아제: 적합한 아밀라아제 (알파 및/또는 베타) 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형된 또는 돌연변이 조작된 단백질이 포함된다. 아밀라아제는, 예를 들면, 바실루스에서 획득한 α-아밀라아제, 예컨대, GB 1,296,839에서 상세히 설명된 바실루스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*)의 특별 균주를 포

함한다. 유용한 아밀라아제의 예는 WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, 및 WO 97/43424에서 설명된 변이체, 특히 하나 이상의 다음의 위치: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, 및 444에서 치환된 변이체이다.

- <308> 상용 아밀라아제는 Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ 및 BAN™ (Novozymes A/S), 및 Rapidase™ 및 Purastar™ (Genencor International Inc.)이다.
- <309> 퍼옥시다아제/산화효소: 적합한 퍼옥시다아제/산화효소는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형된 또는 돌연변이 조작된 단백질이 포함된다. 유용한 퍼옥시다아제의 예는 코프리누스의 퍼옥시다아제, 예컨대, 코프리누스 시네레우스(C. cinereus), 및 이들의 변이체(WO 93/24618, WO 95/10602, 및 WO 98/15257)의 퍼옥시다아제를 포함한다.
- <310> 상용 퍼옥시다아제는 Guardzyme™ (Novozymes A/S)를 포함한다.
- <311> 세정제 효소(들)은 하나 이상의 효소를 함유하는 분리 첨가제를 첨가하거나, 또는 이러한 효소를 모두 포함하는 결합 첨가제를 첨가함으로써 세정제 조성물에 포함될 수 있다. 본 발명의 세정제 첨가제, 즉, 분리 첨가제 또는 결합 첨가제는, 예를 들면, 과립, 액체, 슬러리, 등으로서 제형화될 수 있다. 양호한 세정제 첨가제 제형은 과립, 특히 무-비산 과립, 액체, 특히 안정화 액체, 또는 슬러리이다.
- <312> 무-비산 과립은, 예컨대, 미국 등록 특허 번호 4,106,991 및 4,661,452에 기재된 바에 따라 제조될 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 방법에 의하여 선택적으로 피복될 수 있다. 왁스 피복 물질의 예는 평균 몰 분자량이 1000 내지 20000인 고분자(산화 에틸렌) 산물(폴리에틸렌글리콜, PEG); 16 내지 50 산화 에틸렌 유닛을 지닌 에톡시화 노닐페놀; 15 내지 80 산화 에틸렌 유닛을 보유하고 12 내지 20 탄소 원자를 함유한 알콜인 에톡시화 페티 알콜; 페티 알콜; 지방산; 및 지방산의 모노- 및 디- 및 트리글리세라이드이다. 필름-형성 피복 물질을 유체 베드 기술에 응용하기 적합한 예는 GB 1483591에 나타나 있다. 액체 효소 제조품은, 예를 들어, 확립된 방법에 의하여 폴리올 예컨대, 프로필렌 글리콜, 당 또는 당 알콜, 락탄 또는 붕산을 첨가함으로써 안정화될 수 있다. 보호된 효소는 EP 238,216에서 개시된 방법에 의하여 제조될 수 있다.
- <313> 본 발명의 세정제 조성물은 모든 편리한 형태, 예컨대, 바(bar), 정제(tablet), 분말(powder), 과립(granule), 페이스트(paste) 또는 액체가 될 수 있다. 액체 세정제는 수성이 될 수 있으며, 일반적으로 70% 까지의 수분과 0-30% 유기 용매를 포함하거나, 또는 비수성이 될 수 있다.
- <314> 세정제 조성물은 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수 있으며, 비극성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 양쪽성 이온을 포함하는 비이온성이 될 수 있다. 계면활성제는 일반적으로 중량부로 0.1 % 내지 60%의 수준으로 제공된다.
- <315> 세정제가 포함되는 경우 일반적으로 약 1 % 내지 약 40%의 음이온성 계면활성제 예컨대, 선형 알킬벤젠설포네이트, 알파-올레핀설포네이트, 알킬 설페이트 (페티 알콜 설페이트), 알콜 에톡시설페이트, 2차 알칸설포네이트, 알파-설포 지방산 메틸 에스테르, 알킬- 또는 알케닐숙신산, 또는 비누를 함유하게 된다.
- <316> 세정제가 포함되는 경우 일반적으로 약 0.2% 내지 약 40%의 비이온성 계면활성제 예컨대, 알콜 에톡시레이트, 노닐페놀 에톡시레이트, 알킬폴리글리코사이드, 알킬디메틸아민옥사이드, 에톡시화 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 폴리히드록시 알킬 지방산 아미드, 또는 글루코사민의 N-아실 N-알킬 유도체 ("글루카미드")를 함유하게 된다.
- <317> 세정제에는 0-65%의 세정제 증진제 또는 착화제 예컨대, 제오라이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스포네이트, 탄산염, 시트르산염, 니트릴로트리아세트산, 에틸렌디아민테트라아세트산, 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 알킬- 또는 알케닐숙신산, 가용성 규산염, 또는 층상 규산염 (예컨대, SKS-6, Hoechst)을 함유할 수 있다.
- <318> 세정제는 하나 이상의 고분자를 포함할 수 있다. 그 예는 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐 피리딘-N-옥사이드), 폴리(비닐이미다졸), 폴리카르복시레이트 예컨대, 폴리아크릴레이트, 말산/아크릴산 공중합체, 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체이다.
- <319> 세정제는 H₂O₂ 공급원 예컨대, 퍼보레이트 또는 퍼카보네이트를 포함하는 표백 시스템을 함유할 수 있으며, 이들은 과산-형성 표백 활성제 예컨대, 테트라아세틸에틸렌디아민 또는 노나노일옥시벤젠설포네이트와 결합할 수 있다. 다른 실시 상태로서, 표백 시스템은, 예를 들면, 아미드, 이미드, 또는 설폰 형태의 과산화산을 포함할 수

있다.

- <320> 본 발명의 세정제 조성물의 효소(들)은 종래의 안정화제, 예컨대, 폴리올 예컨대, 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 당 또는 당 알콜, 락트산, 붕산, 또는 붕산 유도체, 예컨대, 방향성 보레이트 에스테르, 또는 페닐 붕소산 유도체 예컨대, 4-포밀페닐 붕소산을 사용하여 안정화될 수 있으며, 조성물은, 예를 들면, WO 92/19709 및 WO 92/19708에 기재된 바와 같이 제형화될 수 있다.
- <321> 세정제는 다른 종래의 세정제 성분 예컨대, 점토, 포말 증진제, 포말 억제제, 부식방지제, 토양-부유제, 토양 재침전 방지제, 염료, 항박테리아제, 형광 발광제, 향수제, 오염 억제제, 또는 향수를 포함하는 섬유 컨디셔너를 포함할 수 있다.
- <322> 세정제 조성물에 있어서, 모든 효소는 0.01-100 mg의 효소 단백질/1 리터의 세척수, 바람직하게는 0.05-5 mg의 효소 단백질/1 리터의 세척수, 특히 0.1-1 mg의 효소 단백질/1 리터의 세척수에 상응하는 양으로 첨가될 수 있다.
- <323> 세정제 조성물에 있어서, 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 0.001-100 mg의 단백질, 바람직하게는 0.005-50 mg의 단백질, 더 바람직하게는 0.01-25 mg의 단백질, 더욱 더 바람직하게는 0.05-10 mg의 단백질, 가장 바람직하게는 0.05-5 mg의 단백질, 및 가장 더 바람직하게는 0.01-1 mg의 단백질/1 리터의 세척수에 상응하는 양으로 첨가될 수 있다.
- <324> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 본 발명의 폴리펩타이드는 WO 97/07202에 개시된 세정제 제형에 포함될 수도 있으며, 이는 참고자료로서 본 명세서에 포함되어 있다.
- <325> 본 발명은 다음의 실시예에 의하여 추가로 설명되나, 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

실시예

- <326> **재료**
- <327> 완충제 및 기질로 사용된 화학 물질은 최소한 시약 등급의 상용 제품이다.
- <328> **균주**
- <329> 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) RutC30 (ATCC 56765; Montenecourt and Eveleigh, 1979, Adv. Chem. Ser. 181 : 289-301)가 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 패밀리 61 폴리펩타이드를 암호화하는 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 유전자의 공급원으로서 사용되었다. 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) Jai_250 균주 (WO 99/61651)가 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 패밀리 61 폴리펩타이드의 발현을 위하여 사용되었다.
- <330> **배지**
- <331> PDA 플레이트는 리터당 39 g의 감자 텍스트로스 한천으로 구성되었다. MDU2BP 배지는 리터당 45 g의 말토오스, 1 g의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g의 NaCl, 2 g의 K_2SO_4 , 12 g의 KH_2PO_4 , 7 g의 효모 추출물, 2 g의 요소, 및 0.5 ml의 AMG 미량 금속 용액, pH 5.0으로 구성되었다.
- <332> AMG 미량 금속 용액은 리터당 14.3 g의 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g의 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5 g의 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 13.8 g의 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8.5 g의 $MnSO_4 \cdot H_2O$, and 3 g의 시트르산으로 구성되어 있다.
- <333> LB 플레이트는 리터당 10 g의 트립톤, 5 g의 효모 추출물, 5 g의 염화 나트륨, 및 15 g의 박토(Bacto) 한천으로 구성된다.
- <334> SOC 배지는 2% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 및 10 mM $MgSO_4$, 및 고압 멸균 후 20 mM 까지 첨가된 여과-멸균 글루코스로 구성된다.
- <335> **실시예 1 : 발효 및 균사 조직**
- <336> 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 균주 RutC30는 파일럿 규모의 발효 탱크의 복합 탄소 공급원을 함유하는 성장 배지 내에서 배양되었다. 탄소 공급원에는 글루코스, 셀룰로오스, 또는 선처리되고, 세척된 옥수수

대를 포함된다. 진균 균사를 1 리터 시료로부터 수거하여, 액체 질소 N₂ 로 냉동시키고 -80℃로 저장하였다

<337> 선처리된 옥수수대 (PCS)를 미국 에너지성의 국립 재생 에너지 연구소(NREL)에서 입수하였다. PCS 내의 수-불용성 고체는 56.5% 셀룰로오스, 4.6% 헤미셀룰로오스, 및 28.4% 리그닌이다. 선처리 조건은 옥수수대, 1.4%(wt/vol) 황산, 165℃, 107 psi, 8 분간이다. 측정 전에, PCS를 대량의 증류 탈이온화수로 유리 필터 상에서 세척하였다. PCS는 그 다음 커피 분쇄기로 분쇄하여 입자를 줄이고, 22 μm 밀리포어 필터(6P Express Membrane, Stericup, Millipore, Billerica, MA)상에서 물로 추가의 세척을 한다. 세척된 PCS는 탈이온수에 재현탁하여 20 mg/ml의 현탁액으로 제조하여, 4℃로 저장하였다.

<338> **실시예 2: 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 방향성 cDNA 라이브러리 구축**

<339> 총 RNA는 실시예 1에 기재한 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 균사 시료로 구아니디늄 티오시아네이트로 추출하고 다음의 변형을 사용한 5.7 M CsCl 쿠션(Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18: 5294-5299)을 통한 초원심분리를 하여 제조하였다. 냉동 균사를 막자와 사발로 액체 N₂ 상에서 분쇄하여 미세 분말화시키고, 선냉각된 커피 분쇄기로 분쇄한 뒤, 즉시 5 부피의 RNA 추출 완충제 (4 M 구아니디늄 티오시아네이트, 0.5% 라우릴사르코신 나트륨, 25 mM 시트르산 나트륨 pH 7.0, 0.1 M β-머캅토에탄올)에 현탁하였다. 혼합물을 30 분간 실온에서 교반하고, 원심분리(20 분, 12,000 x g)하여 세포 잔해를 펠렛화시켰다. 상청액을 수거하여, 조심스럽게 5.7 M CsCl 쿠션 (5.7 M CsCl, 10 mM EDTA, pH 7.5, 0.1% 디에틸피로카보네이트 (DEPC); 사용 전 가압멸균)상에 층을 형성(26.5 ml의 상청액/12.0 ml의 CsCl 쿠션을 사용)하였으며, 원심분리하여 총 DNA를 획득하였다(Beckman SW 28 rotor, 25,000 rpm, 실온, 24 시간). 원심분리 후, 상청액을 조심스럽게 제거하고 RNA 펠렛을 함유한 시험관 하부를 절취하여 70% 에탄올로 행구었다. 총 RNA 펠렛을 에펜도르프 시험관으로 이동하여 500 μl의 TE (10 mM Tris-0.1 mM EDTA)에, pH 7.6 (다를 경우, 경우에 따라 5 분간 65℃로 가열)으로 현탁되었으며, 페놀을 추출물하고, 에탄올로 12 시간 동안 -20℃ 침전시켰다 (2.5 부피의 에탄올, 0.1 부피의 3M 아세트이트 나트륨 pH 5.2). RNA를 원심분리에 의하여 수거하였으며(30 분, 12,000 x g), 70% 에탄올로 세척하고, 최소 부피의 DEPC-처리수에 재현탁하였다. 총 RNA 농도는 260 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 결정되었다.

<340> Poly(A)⁺ RNA를 올리고(dT)-셀룰로오스 친화도 크로마토그래피에 의하여 분리하였다(Aviv & Leder, 1972, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 69: 1408-1412). 모든 0.2 g의 올리고(dT) 셀룰로오스 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)를 10 ml의 1 X 컬럼 탑재 완충제 (20 mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)내에서 미리 팽창시키고, DEPC-처리, 플러그드 플라스틱 컬럼 (Poly Prep Chromatography column, BioRad, Hercules, CA)에 탑재시켜, 20 ml의 1X 탑재 완충제로 평형을 유지시켰다. 총 RNA (1-2 mg)를 65℃로 8 분간 가열하고, 얼음으로 5분간 쿨링시켰으며, 1 부피의 2X 컬럼 탑재 완충제를 부가한 후 컬럼에 탑재하였다. 용출액을 수거하여 전술한 바와 같이 가열함으로써 2-3 회 재탑재하고 각 탑재 전에 얼음으로 쿨링하였다. 올리고(dT) 컬럼을 10 부피의 1X 탑재 완충제로 세척하고, 그 다음 3 부피의 배지 염 완충제 (20 mM Tris-Cl, pH 7.6, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)로 세척하였으며, 폴리(A)⁺ RNA를 3 부피의 용리 완충제 (10 mM Tris-Cl pH 7.6, 1 mM EDTA, 0.05% SDS)로 용리하고, 65℃로 선가열하고, 500 μl 분획을 수거하였다. 각 분획의 260 nm의 흡광도를 읽었으며, 분획을 함유한 mRNA를 모아 -20℃에서 12 시간 동안 에탄올 침전시켰다. 폴리(A)⁺ RNA를 원심분리에 의하여 수거하였으며, DEPC-처리수 상에서 재현탁하고, 5-10 μg의 분취물을 -80℃로 저장하였다.

<341> 이중-가닥 Eco RI-Not I-방향성 cDNA를 5 μg의 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) RutC30 폴리(A)⁺ RNA로부터 헤어-핀 변형을 사용한 RNase H 방법을 사용하여 합성하였다(Gubler and Hoffman 1983, Gene 25: 263-270; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). 폴리(A)⁺ RNA (5 μl의 DEPC-처리수의 5 μg)를 선-실리콘화된 RNase가 없는 에펜도르프 시험관 내에서 70℃로 8 분간 가열하고 얼음 상에서 쿨링시키고, 최종 부피인 50 μl 내에서 1 mM의 dATP, dGTP 및 dTTP, 0.5 mM의 5-메틸-dCTP, 40 유닛의 인간 태반 리보뉴클레아제 억제제 (Promega, Madison, WI), 4.81 μg의 올리고(dT)₁₈-NOT I 프라이머, 및 1000 유닛의 수퍼스크립트(Superscript) II RNase H-역전사 효소 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD)를 함유한 역전사 완충제 (50 mM Tris-Cl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT)와 결합하였다. 제1-가닥 cDNA는 반응 혼합물을 45℃ 1 시간 동안 배양하여 합성하였다. 합성 후, mRNA:cDNA 혼성 혼합물을 제조사 메뉴얼에 따라 MicroSpin S-400 HR spin 컬럼

(Amersham BioSciences, Piscataway, NJ)을 통하여 겔 여과하였다.

- <342> 여과 후, 혼성체를 200 mM의 각 dNTP, 60 유닛의 대장균(*E. coli*) DNA 폴리머라아제 I (Amersham BioSciences, Piscataway, NJ), 5.25 유닛의 RNase H, 및 15 유닛의 대장균(*E. coli*) DNA 리가아제 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)를 함유하는 250 μ l의 제2 가닥 완충제 (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 90 mM KCl, 4.6 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.16 mM NAD⁺)로 희석하였다. 제2 가닥 cDNA 합성은 반응 시험관을 16℃로 2 시간 동안 배양함으로써 수행하였으며, 추가의 15 분간 25℃로 배양하였다. 반응은 EDTA를 20 mM 최종 농도가 되도록 첨가함으로써 중단되었으며 페놀 및 클로로포름을 추출하였다.
- <343> 이중-가닥 cDNA는 2 부피의 96% 에탄올 및 0.2 부피의 10 M 암모늄 아세테이트의 첨가에 의하여 -20℃에서 12 시간 동안 에탄올 침전하고, 원심분리로 회수되어, 70% 에탄올로 세척하고, 건조(SpeedVac)하고, 25 유닛의 녹두 뉴클레아제를 함유하는 30 μ l의 녹두 뉴클레아제 완충제(30 mM 아세테이트 나트륨 pH 4.6, 300 mM NaCl, 1 mM ZnSO₄, 0.35 mM 디티오프레이톨, 2% 글리세롤)에 재현탁하였다. 단일-가닥 헤어-핀 DNA를 30℃에서 30 분간 반응을 배양함으로써 고정하고, 70 μ l의 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA의 첨가하고, 페놀 추출, 및 2 부피의 96% 에탄올 및 0.1 부피 3 M 아세테이트 나트륨 pH 5.2으로 얼음 상에서 30 분간 에탄올 침전하였다. 이중-가닥 cDNA를 원심분리로 회수하였으며(30,000 x g, 30 분간), 0.5 mM의 각 dNTP, 및 5 유닛의 T4 DNA 폴리머라아제를 함유한 30 μ l의 T4 DNA 폴리머라아제 완충제 (20 mM Tris-아세테이트, pH 7.9, 10 mM 마그네슘 아세테이트, 50 mM 칼륨 아세테이트, 1 mM 디티오프레이톨) 내에서 반응 혼합물을 16℃에서 1 시간 동안 배양함으로써 T4 DNA 폴리머라아제로 블린트-말단을 만들었다. 반응은 EDTA를 20 mM 최종 농도가 되도록 첨가함으로써 중단되었으며 페놀 및 클로로포름을 추출하였으며, 96% 에탄올 및 0.1 부피 3 M 아세테이트 나트륨(pH 5.2)으로 12 시간 동안 -20℃에서 에탄올 침전하였다.
- <344> 증진 반응 후에, cDNA를 상기한 바와 같이 원심분리로 회수하였으며, 70% 에탄올로 세척하였고, DNA 펠렛을 SpeedVac에서 건조하였다. cDNA 펠렛을 2 μ g의 Eco RI 어댑터 (0.2 μ g/ μ l, Amersham BioSciences, Piscataway, NJ) 및 20 유닛의 T4 리가아제 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)를 함유하는 25 μ l의 절찰 완충제 (30 mM Tris-Cl, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM 디티오프레이톨, 0.5 mM ATP) 내에서 반응 혼합물을 16℃에서 12 시간 동안 배양하여 재현탁시켰다. 반응을 65℃로 20 분간 가열하여 중단시키고, 그 다음 얼음 위에 5 분간 방치 한다. 적응된 cDNA를 20 μ l의 가압멸균수, 5 μ l의 10X *Not* I 제한 효소 완충제, 및 50 유닛의 *Not* I를 첨가하여 *Not* I로 분해시키고, 3 시간 동안 37℃에서 배양하였다. 반응을 65℃로 15 분간 가열하여 중단시켰다. cDNA를 0.8% SeaPlaque GTG 저 용융 온도 아가로스 겔 (FMC, Rockland, ME)의 44 mM Tris Base, 44 mM 붕산, 0.5 mM EDTA (TBE) 완충제 (가압멸균수) 용액 상에서 아가로스 겔 전기영동에 의하여 크기-분획하여 미결찰 어댑터와 소형 cDNA를 분리하였다. 겔은 12 시간 동안 15 V로 흐르고, cDNA는 아가로스 겔의 하부를 절취함으로써 0.7 kb에서 차단되도록 크기-선택된다. 1.5% 아가로스 겔은 cDNA-함유 겔 전면에 추가되며, 이중-가닥 cDNA는 겔 상의 압축 밴드로 나타날때까지 반대로 흐르게하여 농축된다. cDNA-함유 겔 조각을 겔로부터 절취하고, cDNA는 다음과 같이 GFX 겔 밴드 정제 키트 (Amersham, Arlington Heights, IL)를 사용하여 겔로부터 추출되었다. 절단된 겔 절편을 2 ml 뉴클레아제가 없는 마이크로원심분리 시험관(ISC BioExpress, Kaysville, UT)으로 무게를 측정하였다. 그 다음 10 ml의 포획 완충제 (Amersham, Arlington Heights, IL)에 각각 10 mg의 겔 절편을 첨가하였다.
- <345> 겔 절편을 60℃에서 10 분간 배양하여, 아가로스가 완전하게 가용화될 때까지 용해시켰으며, 그 뒤 시료를 간단한 원심분리에 의하여 펠렛화 시켰다(2 분, 8,000 x g). 용융된 시료를 수거 시험관 내에 배치된 GFX 스핀 컬럼으로 이동하고, 25℃에서 1 분간 배양한 뒤, 마이크로원심분리기에서 30초간 전속으로 원심분리(15,000 x g)하였다. 통과-유체는 버려지고, 컬럼은 500 μ l의 세척 완충제 (GFX Gel Band Purification Kit, Amersham, Arlington Heights, IL)로 세척되었으며, 30초간 전속으로 원심분리하였다. 수거 시험관은 폐기되었으며, 컬럼은 1.5 ml의 에펜도르프 시험관에 위치되고, 50 μ l의 TE(pH 7.5)를 컬럼의 중앙부에 첨가함으로써 cDNA를 용리시키고, 25℃에서 1 분간 배양하였으며, 마지막으로 1 분간 최대 속도로(15,000 x g) 원심분리 하였다. 용출된 cDNA는 -20℃에서 라이브러리 구축시까지 저장되었다.
- <346> Eco RI-*Not* I 삽입-함유 pYES2.0 cDNA 클론을 위한 플라스미드 DNA 제조품을 제조사 메뉴얼에 따라 QIAGEN Tip-100 (QIAGEN, Valencia, CA)를 사용하여 정제하였다. 10 μ g의 정제된 플라스미드 DNA 모두를 6 μ l의 10X Eco RI용 NE 완충제(New England Biolabs, Beverly, MA), 40 유닛의 *Not* I, 및 20 유닛의 Eco RI를 첨가하여 총 부피 60 μ l에서 *Not* I 및 Eco RI으로 완결하기위하여 분해하였으며, 6 시간 동안 37℃로 배양하였다. 반응은 시료를 65℃로 20 분간 가열하여 중단시켰다. 분해된 플라스미드 DNA를 즉시 페놀-클로로포름으로 추출하고, 그

뒤 클로로포름으로 추출하였으며, 2 부피의 96% 에탄올 및 0.1 부피의 3 M 아세트이트 나트륨(pH 5.2)를 첨가함으로써 12 시간 동안 -20℃로 에탄올 침전시켰다. 침전된 DNA를 25 μ l의 TE(pH 7.5)에 재현탁시키고, 0.8% SeaKem 아가로스 겔의 TBE 완충제 용액에 탑재하였고, 3 시간 동안 60 V로 흐르게 하였다. 분해된 벡터를 겔로부터 절취하였으며, DNA를 제조사 메뉴얼에 따라 GFX Gel Band Purification Kit를 사용하여 겔로부터 추출하였다. 260 nm의 흡광도에 의하여 DNA 농도를 측정된 뒤, 용출된 벡터를 라이브러리 구축시까지 -20℃로 저장하였다.

<347> cDNA 라이브러리에 대한 최적의 절찰 조건을 확립하기 위하여, 4 개의 시험 절찰을 7 μ l의 이중-가닥 cDNA (cDNA 시료 내의 대략 1/10의 총 부피에 상응함), 2 유닛의 T4 리가아제, 및 각각 25 ng, 50 ng 및 75 ng의 Eco RI-Not I 분해 pYES2.0 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 함유한 10 μ l의 절찰 완충제 (30 mM Tris-Cl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP) 내에서 수행하였다. 벡터 배경 조절 절찰 반응은 cDNA가 부재한 75 ng의 Eco RI-Not I 분해 pYES.0 벡터를 함유한다. 절찰 반응은 16℃로 12 시간 배양되고, 65℃로 20 분간 가열되어 수행되고, 그 뒤 10 μ l의 가압멸균수를 각 시험관에 첨가한다. 1 μ l의 절찰 혼합물을 40 μ l의 전기허용 (electrocompetent) 대장균(*E. coli*) DH 10B 세포 (Life Technologies, Gaithersburg, MD)에 전기영동(200 W, 2.5 kV, 25 mF) 시킨다. 1 ml의 SOC 배지 (Birren et al., 1998. Genome Analysis, Vol. 2. Detecting Genes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)를 각 형질전환 혼합물에 첨가한 후, 세포를 37℃에서 1 시간 동안 성장시켰다. 그 뒤 각 전기천공으로부터 50 μ l 및 5 μ l를 암피실린이 100 μ g/ml로 보충되는 LB 플레이트 상에 평판하였으며, 37℃로 12 시간 동안 성장시켰다. 최적 조건을 사용하여, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) RutC30 cDNA 라이브러리 함유 1-2.5x10⁷ 독립 집락 형성 유닛을 대장균 내에서, 벡터 배경의 ca. 1%로 확립하였다. cDNA 라이브러리는 (1) 개별 풀 (25,000 c.f.u./pool)의 20% 글리세롤 용액 (-80℃); (2) 동일한 풀의 세포 펠렛(-20℃); (3) 개별 풀의 QIAGEN Tip 100 정제 플라스미드 DNA(-20℃); 및 (4) 방향성, 이중-가닥 cDNA(-20℃)로 저장된다.

<348> **실시예 3: 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) EST 템플릿 제조품**

<349> 실시예 2에 기재된 cDNA 라이브러리의 개별 대장균 집락의 플라스미드 DNA를 제조자가 공급한 설명서에 따라 96-웰 다기관 플라스미드 제조 시스템 (QIAGEN, ValenCla, CA)을 사용하여 정제하였다.

<350> **실시예 4: cDNA 클론의 DNA 서열 데이터 분석**

<351> 베이스 콜링(Base calling), 질적 가치 분석 및 벡터 절단을 PHRED/PHRAP 소프트웨어 (University of Washington, Seattle, WA)의 도움으로 수행하였다. 결집된 EST 서열과 PIR 데이터베이스의 서열 상동성 분석은 Blastx 프로그램 (Altschul et. al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)으로 32-node Linux cluster (Paracel, Inc., Pasadena, CA) 상에서 BLOSUM 62 매트릭스 (Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919)를 사용하여 수행하였다.

<352> **실시예 5: 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 패밀리 61 폴리펩타이드 (GH61B)를 암호화하는 cDNA 클론의 확인**

<353> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 패밀리 61 폴리펩타이드(GH61B)를 암호화하는 cDNA 클론은 초기에 이들의 번역 산물과 공개 데이터베이스 내에 존재하는 공지의 패밀리 61 폴리펩타이드와의 유사성에 의하여 확인되었다. 특히, 이 분석은 예상된 폴리펩타이드는 패밀리 61의 알려진 구성원인, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*)의 엔도글루카나아제 IV의 중핵 도메인과 단백질 수준에서 50% 일치한다는 것을 지적한다 (Saloheimo et al., 1997, Eur. J. Biochem. 249: 584-591). 초기의 확인 이후에, EST 클론은 원 냉동 저장 플레이트로 되돌려보내고, 암피실린이 100 μ g/ml로 보충되는 LB 플레이트 상으로 스트리킹하였다. 플레이트를 37℃로 16 시간 배양하고, 익일에 각 플레이트의 단일 집락을 사용하여 암피실린이 100 μ g/ml로 보충되는 3 ml의 LB에서 배양되었다. 액체 배양물은 16 시간 동안 37℃에서 배양되었고, 플라스미드 DNA를 BioRobot 9600 (QIAGEN Inc., ValenCla, CA)으로 제조하였다. 각 EST 클론의 플라스미드 DNA는 Big-Dye™ 종결자 화학 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)에 대하여 서열화되었으며, 이는 M13 전방 및 클론의 3' 말단의 서열을 아래에 나타낸 폴리-T 프라이머를 사용한다.

<354> 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3' (SEQ ID NO: 3)

<355> 여기서 V=G, A, 또는 C이고 N=G, A, C, 또는 T이며

<356> 일 클론, pTr3337로 할당된 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) EST Tr3337가 뉴클레오타이드 서열 분

석에 의하여 선택된다.

실시예 6: 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 트리코데르마 레에세이 (*Trichoderma reesei*) cDNA 클론의 특성화

아래 나타낸 3개의 신규 프라이머를 설계하여 EST pTr3337의 서열 정보를 제공한다(도 2).

5'-TGTCATGGCCGAGA-3' (SEQ ID NO: 4)

5'-ATACTGGTCACTTCCCAA-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-GCGCTGGGTCAAGATT-3' (SEQ ID NO: 6)

DNA 시퀀싱을 Perkin-Elmer Biosystem Model 377 XL 자동화 DNA 서열기로 염색-종결자 화학을 사용하여 수행하였다 (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology methods 38: 47-60). 1.17 kb cDNA 절편이 서열화되어 Phred 퀄리티 값이 36이 되었다. 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B cDNA 클론의 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO: 1) 및 번역 아미노산 서열(SEQ ID NO: 2)의 암호화 영역을 도 1에 나타내었다. 암호화 서열은 종결 코돈을 포함하여 750 bp이다. 암호화된 예상된 단백질은 249 아미노산이다. 암호화 영역은 56.8% G+C이다. SignalP 프로그램(Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6)를 사용하여, 19 잔기의 신호 펩타이드를 예상하였다. 예상된 성숙 단백질은 분자량이 25.1 kDa 및 등전점(pi)이 7.36인 230 아미노산을 함유한다.

Interproscan 프로그램(Zdobnov and Apweiler, 2001, Bioinformatics 17: 847-8)에 의한 성숙 펩타이드의 분석에 의하여 클론 TY3337에 의하여 암호화된 유전자는 글리코실 가수분해효소 패밀리 61 단백질의 서열 기호(signature)를 함유한다는 것을 나타낸다. Pfam 패턴 PF03443으로 알려진 이 서열 기호(Bateman et. al., 2004, Nucleic AClds Research 32: 138-141)는 잔기 20 내지 241에 위치하며, 클론 Tr3337이 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 패밀리 61 유전자를 암호화한다는 것을 확인한다.

아미노산 서열의 상대적 쌍방 글로벌 정렬은 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman and Wunsch, 1970, 전계서)을 사용하여 결정되며, 니들만(Needle) 프로그램의 EMBOS에서 갭 개방 패널티가 10, 갭 확장 패널티가 0.5이고, EBLOSUM62 매트릭스로 수행한다. 정렬은 GH61B 성숙 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 유전자의 번역 아미노산 서열이 각각, 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) (GeneSeP ADH34517) 및 차에토미움 글로보숨(*Chaetomium globosum*) (UniProt Q2GPR1)의 두 글리코실 가수분해효소 패밀리 61 단백질의 번역 아미노산 서열과 100% 및 62% 일치성(갭 배제)을 공유한다는 것을 보여준다.

플라스미드 pTr3337를 함유한 대장균 균주를 아그리컬처럴 리서치 서비스 패턴트 컬처 컬렉션, 노던 레지오널 리서치 센터(1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604)에 NRRL B-30878로서 2005. 9. 20일자로 기탁하였다.

실시예 7: 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 패밀리 GH61B 유전자용 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 발현 벡터의 구축

아래 나타낸 두 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 cDNA 클론의 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 패밀리 GH61B 유전자를 PCR 증폭하기 위하여 설계되었다.

InFusion Cloning Kit (BD BioSciences, Palo Alto, CA)는 절편을 제한 분해 및 결합의 필요 없이 발현 벡터, pAILo2로 직접 클론하기 위하여 사용된다(WO 2005/074647).

전방향 프라이머:

5'-ACTGGATTACCATGAAGTCCTGCGCCATTCTTGC-3' (SEQ ID NO: 7)

역방향 프라이머:

5'-AGTCACCTCTAGTTAGCCTTGCCACAGGGCTGG-3' (SEQ ID NO: 8)

볼드체는 암호화 서열을 나타낸다. 잔존 서열은 pAILo2의 삽입 부위와 상동이다. 상기 각 프라이머의 피코몰의 지방이 100 ng의 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) cDNA 클론 (실시예 5에서 제조), 1X Pfx 증폭 완충제(Invitrogen, Carlsbad, CA), 6 μ l의 10 mM dATP, dTTP, dGTP, 및 dCTP의 블랜드, 2.5 유닛의 백금 Pfx

DNA 폴리머라아제 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 μ l의 50 mM MgSO₄, 및 5 μ l의 10X pCRx 증진자 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 최종부피가 50 μ l 함유된 PCR 반응에 사용되었다.

- <374> 증폭 조건은 한 주기가 94℃에서 2 분이며; 30 주기가 각각 94℃ 15초, 55℃ 30초, 및 68℃ 3 분이다. 가열 블록은 그 다음에 4℃ 침지 주기로 간다.
- <375> 반응 산물을 40 mM Tris base-20 mM 아세테이트 나트륨-1 mM EDTA 디나트륨(TAE) 완충제를 사용하여 1.0% 아가로스 겔 상에서 분리하였으며, 여기서 3 kb 산물 밴드가 겔에서 제거되고 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., ValenCla, CA)를 사용하여 제조자 설명서에 따라 정제하였다.
- <376> 절편은 그 이후 InFusion Cloning Kit를 사용하여 pAILo2로 클론되었다. 벡터는 Nco I 및 Pac I으로 분해되었다(제조자에 의하여 특정된 조건). 절편은 겔 전기영동 및 QIAquick 겔 정제에 의하여 정제되었다. 유전자 절편 및 분해된 벡터는 반응에 의하여 함께 결합되어 발현 플라스미드 pTr61B이 된다(도 3). 여기서 패밀리 GH61B 유전자의 전사는 NA2-tpi 프로모터의 제어하에 있다(아스퍼길루스 니케르(*Aspergillus niger*) 중성 알파-아밀라아제 및 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 트리오스 포스페이트 이성질화효소의 유전자의 프로모터의 혼성체). 제조합 반응(20 μ l)은 1X InFusion 완충제 (BD BioSciences, Palo Alto, CA), 1X BSA (BD BioSciences, Palo Alto, CA), 1 μ l의 InFusion 효소 (diluted 1 :10) (BD BioSciences, Palo Alto, CA), 100 ng의 pAILo2(Nco I 및 Pac I로 분해), 및 100 ng의 he 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B 정제 PCR 산물로 구성된다. 반응은 실온에서 30 분간 배양된다. 1 μ l의 반응물이 대장균 XL10 Solopac Gold cells (Stratagene, La JoIIa, CA)를 형질전환시키는데 사용되었다. pTr61B (GH61B 유전자)를 함유한 대장균 형질전환체를 제한 효소 절단에 의하여 동정하였고, 플라스미드 DNA는 QIAGEN BioRobot 9600를 사용하여 제조하였다.
- <377> **실시예 8: 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) Jal250 내의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 패밀리 GH61B 폴리펩타이드를 암호화하는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) cDNA의 발현**
- <378> 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) Jal250 원형질체는 Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422의 방법에 따라 제조하였다. 5 μ g의 pTr61B (및 벡터 대조구인 pAILo2)를 사용하여 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) Jal_250를 형질전환시켰다.
- <379> pTr61B (GH61B 유전자)를 함유한 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) Jal250의 형질전환에 의하여 70 개의 형질전환체를 수득하였다. 10 개의 형질전환체를 개별 PDA 플레이트로 분리하였다.
- <380> 모든 형질전환체의 융합성 PDA 플레이트를 5 ml의 0.01 % 트윈 80으로 세척하고, 25 ml의 MDU2BP 배지의 125 ml 유리 셰이크 플라스크에서 별도로 배양하고, 34℃ 200 rpm으로 배양하였다. 배양 5일 후, 각 배양물 5 μ l의 상청액을 제조자 설명서에 따라 8-16% Tris-글리신 SDS-PAGE 겔(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 분석하였다. 배양물의 SDS-PAGE 프로파일은 수 개의 형질전환체가 대략 25 kDa의 새로운 주요 밴드를 가지는 것을 보여주었다. 일 형질전환체의 융합성 플레이트(PDA 상에서 성장)를 10 ml의 0.01% 트윈 20으로 세척하였으며 500 ml의 MDU2BP 배지를 함유한 2 리터의 Fembach 내로 접종하여 효소 특성을 위한 액체 배지를 생성하였다. 플라스크는 5일 후 수확되었으며, 0.22 μ m의 GP Express plus Membrane (Millipore, Bedford, MA)을 이용하여 여과하였다.
- <381> **실시예 9: 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제를 발현하는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 발효 액체 배지에 의한 선처리된 옥수수대의 가수분해 상의 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B의 효과**
- <382> 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B (실시예 8에서 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*)에서 제조합 생산)를 가수분해 실험 전에 Biomax-5 멤브레인 (5000 NMWL; Millipore, Bedford, MA)을 구비한 Centricon Plus-20 원심분리 필터를 사용하여 탈염하고, 50 mM 아세테이트 나트륨(pH 5.0)으로 교환하였다.
- <383> WO 2005/074647에 기재된 바에 따라 제조된 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제를 발현하는 세포-유리 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 발효 액체 배지를 탈염 또는 완충제 교환 없이 가수분해 실험에 사용하였다.
- <384> 효소 희석물은 -20℃로 저장된 저장 희석 용액으로부터 각 실험 전에 새로 제조하였다.
- <385> 환원당 (RS)은 p-히드록시벤조산 히드라지드 (PHBAH) 측정법을 사용하여 결정하였으며 (Lever, M., 1972, A new

reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal. Biochem. 47: 273-279), 이는 96-웰 마이크로플레이트 표포포맷으로 변형되고 적용되었다.

- <386> 희석된 시료의 90 μ l 분취물을 96-웰 원뿔형-하부 마이크로플레이트의 각 웰에 위치시켰다 (Corning Inc., Acton, MA, Costar, 폴리카보네이트 제거).
- <387> 각 웰에 60 μ l의 1.25% PHBAH의 2% 수산화 나트륨 용액을 첨가하여 측정을 개시하였다. 덮개를 한 플레이트를 주문형 가열 블록 상에서 95℃로 10분간 가열하였다. 마이크로플레이트를 실온으로 냉각한 후에, 35 μ l의 탈이온수를 각 웰에 첨가하였다. 100 μ l 분취물을 각 웰에서 제거하고 평판-하부 96-웰 플레이트로 이동시켰다 (Corning Inc., Acton, MA, Costar, 배지 결합 폴리스티렌). 410 nm의 흡광도 (A_{410})를 SpectraMAX Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 측정하였다. A_{410} 값은 표준 곡선을 사용하여 글루코스 증가물로 번역되었다.
- <388> 표준 곡선은 6 개의 글루코스 표준 (0.005, 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 및 0.100 mg/ml)로 획득하였으며, 이는 시료와 유사하게 처리되었다. 글루코스 표준은 탈이온수를 포함한 저장 글루코스 용액 10 mg/ml를 희석하여 제조하였다.
- <389> 셀룰로오스의 환원당으로의 전환율(전환, %)은 다음의 공식으로 계산된다:
- <390>
$$\text{전환 (\%)} = \text{RS (mg/ml)} * 100 * 162 / (\text{셀룰로오스 (mg/ml)} * 180) =$$
- <391>
$$= \text{RS (mg/ml)} * 100 / (\text{셀룰로오스 (mg/ml)} * 1.111)$$
- <392> 이 방정식에서, RS는 글루코스 증가물 (mg/ml) 내에서 측정된 용액 내의 환원당의 농도이며, 인자 1.111은 셀룰로오스의 글루코스 전환시 부가된 중량을 반영한다.
- <393> 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제를 발현하는 세포-유리 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 발효 액체 배지에 의한 분쇄된 PCS (1% w/v의 건조 중량 기준)의 가수분해는 딥웰 매트 (Deepwell Mats) 96 (Brinkmann, Westbury, NY)로 덮힌 딥웰 플레이트 96 (1.2 ml, Brinkmann, Westbury, NY) 상에서 수행하였다. 초기 부피 1 ml의 모든 반응은 50 mM 아세테이트 나트륨(pH 5.0) 상에서 간헐적으로 교반하며 50℃로 수행하였다.
- <394> 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 발효 액체 배지(2.5 mg/g PCS)를 함유한 시간-경과 반응은 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B (전술한 바와 같이 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)에서 재조합하여 생산됨)(0.625 mg/g PCS (25 %의 셀룰라아제 단백질 탐재물))가 보충되며, 결과물을 미-보충 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 액체 배지(2.5 및 3.125 mg/g PCS) 또는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B 단백질 단독(2.5 mg/g PCS)과 비교한다.
- <395> 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 발효 액체 배지(2.5 mg/g PCS)를 함유한 단백질 탐재 반응은 0.2, 0.4, 0.6 또는 1.2 mg/g PCS로 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B 단백질 (아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)에서 재조합 발현)을 보충하고 115 시간 동안 보충한다. 결과물은 미-보충 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 액체 배지(2.5 및 3.5 mg/g PCS)와 비교한다.
- <396> 20 μ l의 분취물을 8-채널 피펫터를 사용하여 PCS 가수분해 반응에서 제거하고, 멀티스크린 HV 96-웰 여과 플레이트(Millipore, Bedford, MA) 내의 180 μ l의 염기성 혼합물(102 mM Na_2CO_3 및 58 mM NaHCO_3)에 첨가하여 반응을 종결시킨다. 시료를 다른 평판-하부 마이크로플레이트로 진공 여과하여 PCS 잔기를 제거한다. 적절한 희석 후, 여과물을 하기하는 PHBAH 측정법을 사용하여 RS에 대하여 분석하였다.
- <397> 도 4에 나타난 결과는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B 단백질을 보유한 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제를 발현하는 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 발효 액체 배지의 보충으로 시험된 모든 시점에서 가수분해 수득물이 향상된다는 것을 적시한다. 이러한 향상된 점은 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 액체 배지 단독으로 동일 단백질 탐재한 경우보다 크다. 이 향상점은 GH61B 폴리펩타이드만에 의한 단지 1.2%의 양으로 115 시간의 가수분해에 의하여 설명될 수는 없으며, 2.5 mg/g PCS의 높은 단백질 탐재로도 설명할 수 없다.
- <398> 도 5에 나타난 결과물은 트리코테르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 액체 배지의 단백질 탐재의 대략 16%의 단백질 탐재에서 최대 증진을 지닌 GH61B 폴리펩타이드의 단백질 탐재 범위를 넘는 것을 보여준다는 것을 적시한

다

<399> 생물학적 물질의 기탁

<400> 다음의 생물학적 물질을 [특허절차상미생물기탁의국제적승인에관한부다페스트조약]에 의거하여 아그리컬처럴 리서치 서비스 패턴트 컬처 컬렉션, 노던 레지오널 리서치 센터(1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604)에 기탁하였으며, 다음의 승인 번호를 부여받았다:

<401> 기탁 : 대장균(*E. coli*) 균주 pTr3337

<402> 승인 번호 : NRRL B-30878

<403> 기탁 일자 : 2005. 9. 20

<404> 균주는 특허 출원이 되는 동안 37 C. F. R. § 1.14 및 35 U. S. C. § 122에 의거한 특허 및 상표의 관서장이 결정한 자가 배양물을 입수 가능한 상태로 기탁되었다. 기탁은 기탁된 균주의 실질적으로 순수한 배양물을 나타낸다. 이 기탁물은 대상 발명의 상대방 국가인 외국 법에 의하여 요구되는 바대로 사용되거나 또는 이들의 승계인도 기록된다. 그러나, 기탁물의 사용은 정부에 의하여 수여된 특허권을 훼손하기 위하여 증명서를 사용하는 것으로 활용되어서는 아니된다는 것을 이해하여야 한다.

<405> 본원에 기재되고 청구된 발명은 본 발명의 특정 특징에 의하여 범위를 제한하는 것이 아니며, 이는 본 발명의 몇몇 특징을 설명하기 위하여 의도된 것이기 때문이다. 모든 동등한 특징을 본 발명의 범위에 포함하는 것으로 의도되었다. 물론, 본원에서 기재하고 나타낸 본 발명의 다양한 변형은 전술한 설명에 의하여 당해 기술 분야의 숙련자에게 자명하다. 이러한 변형은 첨부한 청구 범위의 범위 내에 포함되는 것을 의도하였다. 분쟁이 발생하는 경우, 정의를 포함한 본 명세서를 대조한다.

<406> 다양한 참고자료를 본원에서 인용하였으며, 이 문헌들은 전체로서 본원에서 참고 자료로 포함되었다.

도면의 간단한 설명

<23> 도 1은 GH61B 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) RutC30 (ATCC 56765) 폴리펩타이드의 cDNA 서열 및 번역 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 1 및 2, 각각)을 나타낸다. 예상된 인트론은 이탤릭체로 나타내었다. 예상된 신호 펩타이드는 밑줄로 표시하였다.

<24> 도 2는 pTr3337의 제한효소 지도를 나타낸다.

<25> 도 3은 pTr61B의 제한효소 지도를 나타낸다.

<26> 도 4는 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) GH61B의 보충을 하거나 보충이 없는 상태로 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제 (CLF)를 발현하는 트리코데르마 레에세이(*Trichoderma reesei*) 액체 배지에 의한 PCS의 가수분해(P020502CS, 100 MF 가압멸균, 10 g/L)를 나타낸다. 가수분해는 지시한 시간 동안 500℃, pH 5.0에서 수행되었다. 셀룰라스트(Celluc last) 플러스 탐재물은 1 그램의 PCS당 2.5 또는 3.125 mg이며 1 그램의 PCS당 2.5 mg의 CLF 및 0.625 mg의 GH61B를 함유한 혼합물이다.

<27> 도 5는 셀룰라스트 플러스 GH61B 단백질의 보충물에 의한 PCS의 가수분해 (P020502CS, 100 MF 가압멸균, 10 g/L)를 나타낸다. 재조합 단백질 (Jal250)을 함유하지 않는 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 액체 배지를 대조구로서 첨가하였다. 115 시간동안 500℃로 배양하였다.

<28> 정의

<29> **셀룰로오스가수분해 증진 활성:** 용어 "셀룰로오스가수분해 증진 활성"은 셀룰로오스가수분해 활성을 보유한 단백질에 의하여 셀룰로오스성 물질의 가수분해를 증진시키는 생물학적 활성으로 본원에서 정의된다. 본 발명의 목적을 위하여, 셀룰로오스가수분해 증진 활성은 다음의 조건 하에서 셀룰로오스가수분해 단백질에 의한 셀룰로오스성 물질의 가수분해에 의하여 환원당의 증가를 측정함으로써 결정된다: 0.01-2.5 mg의 셀룰로오스가수분해 증진 활성/PCS 내의 셀룰로오스의 g의 존재 및 부재시 (5.01-7.5 mg의 셀룰로오스가수분해 단백질/PCS 내의 셀룰로오스의 g) 셀룰로오스가수분해 증진 활성이 없는 동등한 총 단백질을 지닌 대조구 가수분해에 비하여 5.0 mg의 셀룰로오스가수분해 단백질/g PCS 내의 셀룰로오스의 g 5-7일 동안 500℃. 본 발명의 양호한 특징으로서, 3% 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제 (WO 02/095014에 따라 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus oryzae*)에서 재조합하여 생산됨) 또는 3% 아스퍼길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 베타-글루코시다아제 (WO 02/095014의 실시예 22에 따라 아스퍼길루스 오리자(*Aspergillus*

oryzae)에서 재조합하여 생산됨)의 셀룰라아제 단백질 탑재물의 존재하에 CELLULAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)의 혼합물이 셀룰로오스가수분해 활성의 원천으로 사용된다.

- <30> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 최소한 20%, 바람직하게는 최소한 40%, 더 바람직하게는 최소한 50%, 더 바람직하게는 최소한 60%, 더 바람직하게는 최소한 70%, 더 바람직하게는 최소한 80%, 더욱 더 바람직하게는 최소한 90%, 가장 바람직하게는 최소한 95%, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 100%의 폴리펩타이드 of the SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 폴리펩타이드의 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한다.
- <31> **셀룰로오스가수분해 활성:** 용어 "셀룰로오스가수분해 활성"은 셀룰로오스성 물질을 가수분해하는 생물학적 활성으로 본원에서 정의된다. 본 발명의 목적을 위하여, 셀룰로오스가수분해 활성은 다음의 조건 하에서 셀룰로오스가수분해 혼합물에 의한 셀룰로오스성 물질의 가수분해의 증가를 측정함으로써 결정된다: 셀룰로오스가수분해 단백질의 첨가 없는 대조구 가수분해와 비교하여 1-10 mg의 셀룰로오스가수분해 단백질/PCS 내의 셀룰로오스의 g 5-7일 동안 500°C. 본 발명의 양호한 특징으로서, 3% 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*) 베타-글루코시다아제 (WO 02/095014에 따라 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)에서 재조합하여 생산됨) 또는 3% 아스퍼길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 베타-글루코시다아제 (WO 02/095014의 실시예 22에 따라 아스퍼길루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)에서 재조합하여 생산됨)의 셀룰라아제 단백질 탑재물의 존재하에 CELLULAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)의 혼합물이 셀룰로오스가수분해 활성의 원천으로 사용된다.
- <32> 선처리 옥수수대(Pre-treated corn stover): 용어 "PCS" 또는 "선처리 옥수수대"는 본원에서 열 및 회석산으로 처리되어 옥수수대로부터 유도된 셀룰로오스성 물질로 정의된다. 본 발명의 목적을 위하여, PCS는 is made by the method described in 실시예 1, 또는 이들의 시간, 온도 및 산의 양의 변형으로 설명되는 방법에 의하여 제조된다.
- <33> **패밀리(Family) 61 글리코사이드 가수분해효소:** 용어 "패밀리 61 글리코사이드 가수분해효소" 또는 "패밀리 GH61"는 본원에서 헨리셋 비(Henrissat B., 1991)에 의하여 글리코사이드 가수분해효소 패밀리 61에 할당된 폴리펩타이드로 정의되며, 이 글리코실 가수분해효소의 분류는 아미노산 서열 유사성에 기초하고(Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat B., and Bairoch A., 1996), 글리코실 가수분해효소의 서열-기초 분류로 갱신된다(Biochem. J. 316: 695-696). 현재, 헨리셋(Henrissat)은 특성들, 예컨대 기작, 촉매 친핵/염기, 촉매 양자 공여체 및 3-D 구조가 이 패밀리에 속하는 폴리펩타이드로 알려지지 않았다는 것을 지적하며 미분류된 GH61 패밀리를 열거하였다.
- <34> **셀룰로오스성 물질:** 셀룰로오스성 물질은 셀룰로오스를 함유한 모든 물질이 될 수 있다. 셀룰로오스는 예를 들면, 줄기, 잎, 외피, 껍질, 및 식물 또는 잎의 속(cob), 가지, 및 나무의 목질 등에서 일반적으로 발견된다. 셀룰로오스성 물질은 초본 물질, 농업 부산물, 임업 부산물, 고시 고체 폐기물, 폐지, 및 펄프 및 제지 부산물이 될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 셀룰로오스는 본 명세서에서 혼합 매트릭스 내의 리그닌, 셀룰로오스, 및 헤미셀룰로오스를 함유한 식물 세포벽 물질인 리그노셀룰로오스의 형태가 될 수도 있다는 것을 이해하여야 한다.
- <35> 본 발명의 양호한 특징으로서, 셀룰로오스성 물질은 옥수수대이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 셀룰로오스성 물질은 옥수수 섬유질이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 셀룰로오스성 물질은 버짚이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 셀룰로오스성 물질은 종이 및 펄프 가공 폐기물이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 셀룰로오스성 물질은 목재 또는 초본 식물이다. 본 발명의 양호한 다른 특징으로서, 셀룰로오스성 물질은 버개스(bagasse)이다.
- <36> 셀룰로오스성 물질은 그 자체로 사용되거나 또는 당해 기술 분야에 알려진 종래 기술을 사용하여 선처리를 가할 수 있다. 예를 들면, 물리적 선처리 기술에는 다양한 형태의 제분, 조사(照射), 수증기 처리(steaming)/증기 폭발, 및 열가수분해를 포함할 수 있으며; 화학적 선처리 기술 회석산, 염기성, 유기 용매, 암모니아, 이산화황, 이산화탄소, 및 pH-조절 열가수분해를 포함하며; 생물학적 선처리 기술은 리그닌-가용성 미생물에 적용하는 것에 관련 있을 수 있다(예를 들면, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., and Singh, A., 1993, Physicochemical and Biological treatments for enzymatic/microbial 전환 of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating Lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic 전환 of Biomass for Fules Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society,

Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol Production from renewable re공급원, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241 ; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, 발효 of Lignocellulosic 가수분해산물s for Ethanol Production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331 ; and Vallander, L., and Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of Ethanol from Lignocellulosic 물질: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

- <37> **분리된 폴리펩타이드:** 본 명세서에서 사용된 용어 "분리된 폴리펩타이드"는 SDS-PAGE에 의하여 측정하는 경우 최소한 20% 순수, 바람직하게는 최소한 40% 순수, 더 바람직하게는 최소한 60% 순수, 더욱 더 바람직하게는 최소한 80% 순수, 가장 바람직하게는 최소한 90% 순수, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 95% 순수한 폴리펩타이드를 말한다.
- <38> **실질적으로 순수 폴리펩타이드:** 용어 "실질적으로 순수 폴리펩타이드"는 본 명세서에서 중량부로 최대한 10%, 바람직하게는 최대한 8%, 더 바람직하게는 최대한 6%, 더 바람직하게는 최대한 5%, 더 바람직하게는 최대한 4%, 더 바람직하게는 최대한 3%, 더욱 더 바람직하게는 최대한 2%, 가장 바람직하게는 최대한 1%, 및 가장 더 바람직하게는 최대한 0.5%의 천연적으로 결합된 다른 폴리펩타이드 물질을 함유한 폴리펩타이드 제조물을 말한다. 따라서, 실질적으로 순수 폴리펩타이드는 중량부로 제조물 내에 제공되는 최소한 92% 순수, 바람직하게는 최소한 94% 순수, 더 바람직하게는 최소한 95% 순수, 더 바람직하게는 최소한 96% 순수, 더 바람직하게는 최소한 96% 순수, 더 바람직하게는 최소한 97% 순수, 더 바람직하게는 최소한 98% 순수, 더욱 더 바람직하게는 최소한 99%, 가장 바람직하게는 최소한 99.5% 순수, 가장 더 바람직하게는 100% 순수한 총 폴리펩타이드 물질인 것이 바람직하다.
- <39> 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드는 바람직하게는 실질적으로 순수 형태이다. 특히, 폴리펩타이드는 "필수적으로 순수한 형태", 즉, 폴리펩타이드 제조물이 필수적으로 천연적으로 결합된 다른 폴리펩타이드 물질이 부재한 것이 바람직하다. 이는, 예를 들면, 잘 알려진 재조합법에 의한 폴리펩타이드 제조에 의하여 수행될 수도 있거나, 또는 고전적인 정제법에 의하여 수행될 수도 있다.
- <40> 본원에서, 용어 "실질적으로 순수 폴리펩타이드"는 "분리된 폴리펩타이드" 및 "분리된 형태의 폴리펩타이드"와 동의어이다
- <41> **성숙 폴리펩타이드:** 용어 "성숙 폴리펩타이드"는 본원에서 번역에 따른 최종 형태 및 번역-후 변형, 예컨대, N-말단 처리, C-말단 절단, 글리코실화, 인산화, 등의 형태인 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드로 정의된다.
- <42> **성숙 폴리펩타이드 암호화 서열:** 용어 "성숙 폴리펩타이드 암호화 서열"은 본원에서 성숙 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 정의된다.
- <43> **일치성:** 두 아미노산 서열 간의 또는 두 뉴클레오타이드 서열 간의 연관성은 "일치성"이라는 변수로 설명된다.
- <44> 본 발명의 목적을 위하여, 두 아미노산 서열 간의 일치도는 갭 개방 패널티가 10, 갭 확장 패널티가 0.5이며, EBLOSUM62 매트릭스로 수행하는 EMBOSS사의 니들(Needle) 프로그램으로 수행하는 니들만-운쉬(Needleman-Wunsch) 알고리즘을 사용하여 측정된다(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453). 니들 표지된 "최장 일치성"의 결과물은 퍼센트 일치성으로 사용되며 다음과 같이 계산된다: (일치 잔기 x 100)/(정렬 길이 - 정렬 내 갭의 수)
- <45> **상동 서열:** 용어 "상동 서열"은 본원에서 E 값(또는 기대값)이 0.001 이하인 서열로 정의되며, 여기에는 BLOSUM62 매트릭스, 단어크기 3, 갭 존재 코스트 11, 갭 확장 코스트 1, 낮은 복잡성 여과 없음, 및 조희용으로 성숙 GH61B 단백질 서열을 보유한 blastp (단백질 데이터베이스용) 또는 tblastn (핵산 서열 데이터베이스용) 알고리즘을 사용한다. Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- <46> **폴리펩타이드 절편:** 용어 "폴리펩타이드 절편"은 본원에서 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 아미노 및/또는 카르복실 말단이 결실된 하나 이상의 아미노산을 보유한 폴리펩타이드, 또는 이들의 상동 서열로 정의되며, 여기서, 절편은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한다. 바람직하게는, SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드의 절편은 최소한 200 아미노산 잔기, 더 바람직하게는 최소한 210 아미노산 잔기, 및 가장 바람직하게는 최소한 220 아미노산 잔기를 함유한다.
- <47> **하위서열:** 용어 "하위서열"은 본원에서 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열의 5' 및/또는 3' 말단이

결실된 하나 이상의 뉴클레오타이드를 보유한 뉴클레오타이드, 또는 이들의 상동 서열로 정의되며, 여기서, 하위서열은 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드 절편을 암호화한다. 바람직하게는, SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열의 하위서열은 최소한 600 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 최소한 630 뉴클레오타이드, 및 가장 바람직하게는 최소한 660 뉴클레오타이드를 함유한다.

<48> **대립 변이체:** 용어 "대립 변이체"는 동일한 유전좌를 점유하는 모든 2 이상의 대체 형태의 유전자를 나타낸다. 대립 변이는 돌연변이를 통하여 자연적으로 발생하며, 개체집단 내의 다형성(polymorphism)이 될 수도 있다. 유전자 돌연변이는 침묵(암호화된 폴리펩타이드 내의 무변화) 될 수도 있으며 또는 아미노산 서열이 변화된 폴리펩타이드를 암호화할 수도 있다. 폴리펩타이드의 대립 변이체는 유전자의 대립 변이체에 의하여 암호화된 폴리펩타이드이다.

<49> **분리된 폴리뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 용어 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 아가로스 전기영동에 의하여 측정시 최소한 20% 순수, 바람직하게는 최소한 40% 순수, 더 바람직하게는 최소한 60% 순수, 더욱 더 바람직하게는 최소한 80% 순수, 가장 바람직하게는 최소한 90% 순수, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 95% 순수한 폴리뉴클레오타이드를 의미한다.

<50> **실질적으로 순수 폴리뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 용어 "실질적으로 순수 폴리뉴클레오타이드"는 여타의 외인성 또는 원치않는 뉴클레오타이드가 부재하며, 유전자 조작된 단백질 생산 시스템 내에서 사용되기 적합한 형태의 폴리뉴클레오타이드 제조물을 의미한다. 따라서, 실질적으로 순수 폴리뉴클레오타이드는 중량부로 최대 한 10%, 바람직하게는 최대한 8%, 더 바람직하게는 최대한 6%, 더 바람직하게는 최대한 5%, 더 바람직하게는 최대한 4%, 더 바람직하게는 최대한 3%, 더욱 더 바람직하게는 최대한 2%, 가장 바람직하게는 최대한 1%, 및 가장 더 바람직하게는 최대한 0.5%의 천연적으로 결합한 다른 폴리뉴클레오타이드 물질을 함유한다. 실질적으로 순수 폴리뉴클레오타이드는, 그러나, 자연 발생적 5' 및 3' 비번역 영역, 예컨대, 프로모터 및 종결자를 포함한다. 실질적으로 순수 폴리뉴클레오타이드는 중량부로 최소한 90% 순수, 바람직하게는 최소한 92% 순수, 더 바람직하게는 최소한 94% 순수, 더 바람직하게는 최소한 95% 순수, 더 바람직하게는 최소한 96% 순수, 더 바람직하게는 최소한 97% 순수, 더욱 더 바람직하게는 최소한 98% 순수, 가장 바람직하게는 최소한 99%, 및 가장 더 바람직하게는 최소한 99.5% 순수한 것이 바람직하다. 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로 순수한 형태인 것이 바람직하다. 특히, 본원에서 개시하는 폴리뉴클레오타이드는 "필수적으로 순수한 형태", 즉, 천연적으로 결합한 다른 폴리뉴클레오타이드 물질이 필수적으로 부재한 폴리뉴클레오타이드 제조물인 것이 바람직하다. 본원에서, 용어 "실질적으로 순수 폴리뉴클레오타이드"는 용어 "분리된 폴리뉴클레오타이드" 및 "분리된 형태의 폴리뉴클레오타이드"와 동의어이다. 폴리뉴클레오타이드는 게놈, cDNA, RNA, 반합성, 합성 기원(origin)의 것일 수 있으며, 또는 이들의 모든 조합일 수 있다.

<51> **cDNA:** 용어 "cDNA"는 본원에서 원핵 세포로부터 획득한 성숙하고, 스플라이싱된 mRNA 분자로부터 역전사하여 제조될 수 있는 DNA 분자로 정의된다. cDNA는 상응하는 게놈 DNA에 일반적으로 존재하는 인트론 서열이 결핍되어 있다. 초기, 1차 RNA 전사체는 성숙 스플라이싱된 mRNA로 나타나기 전에 일련의 단계를 거쳐 가공된 mRNA의 전구체이다. 이러한 단계에는 스플라이싱이라는 과정에 의하여 인트론 서열의 제거를 포함한다. mRNA로부터 유도된 cDNA는 따라서, 모든 인트론 서열이 결핍된다.

<52> **핵산 서열 구조체:** 본원에서 사용된 용어 "핵산 서열 구조체"는 자연 발생적 유전자로부터 분리되거나 그렇지 않고서는 자연 상에 존재할 수 없는 핵산 서열의 부분을 함유하도록 변형된 단일- 또는 이중-가닥의 핵산 서열 분자를 말한다. 용어 핵산 서열 구조체는 핵산 서열 구조체가 암호화 서열의 발현에 필요한 조절 서열을 함유하는 경우, 용어 "발현 카세트"와 동의어이다.

<53> **조절 서열:** 용어 "조절 서열"는 본원에서 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현에 필수적이거나 또는 유리한 모든 성분을 포함한다. 각 조절 서열은 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 생래적이거나 또는 외래적인 것이거나 또는 서로에 대하여 생래적이거나 또는 외래적인 것일 수 있다. 이러한 조절 서열은 선도체, 폴리아데닐화 서열, 프로펩타이드 서열, 프로모터, 신호 펩타이드 서열, 및 전사 종결자를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 최소한, 조절 서열은 프로모터, 및 전사 및 번역 종결 신호를 포함한다. 조절 서열은 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 암호화 영역을 지닌 조절 서열의 결찰을 촉진하는 특정 제한 부위를 도입하기 위한 링커를 제공할 수 있다.

<54> **작동가능하게 결합:** 본원에서 "작동가능하게 결합"한다는 용어는 조절 서열이 폴리뉴클레오타이드 서열의 암호화 서열에 상대적으로 적절한 위치에 배치되어 조절 서열이 폴리펩타이드의 암호화 서열의 발현을 조절하게 되는 배치 구성을 나타낸다.

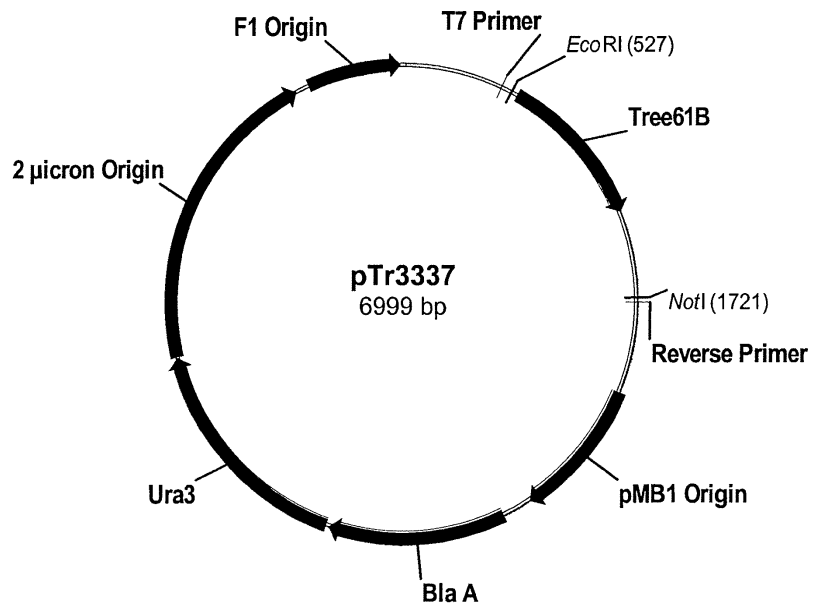
- <55> 암호화 서열: 본원에서 용어 "암호화 서열"을 사용하는 경우 이들의 단백질 산물의 아미노산 서열을 직접 특정하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- <56> 암호화 서열의 경계는 개방 리딩 프레임에 의하여 일반적으로 결정되며, 대체로 ATG 개시 코돈 또는 대체 개시 코돈 예컨대, GTG 및 TTG로 시작하고, 종결 코돈 예컨대, TAA, TAG 및 TGA로 종결된다. 암호화 서열은 DNA, cDNA, 또는 재조합 뉴클레오타이드 서열이 될 수 있다.
- <57> 발현: 용어 "발현"은 전사, 전사-후 변형, 번역, 번역-후 변형, 및 분비를 포함하나 이에 한정되지 않는 폴리펩타이드의 생산에 관여하는 모든 단계를 포함한다.
- <58> 발현 벡터: 용어 "발현 벡터"는 본원에서 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 선형 또는 원형 DNA 분자로 정의되며, 이들의 발현을 위하여 제공되는 추가의 뉴클레오타이드에 작동 가능하게 결합된다.
- <59> 숙주 세포: 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열 구조체 또는 발현 벡터에 의한 형질전환, 전달감염, 형질도입, 등에 영향받기 쉬운 모든 세포 유형을 포함한다.
- <60> 변형: 용어 "변형"은 본원에서 SEQ ID NO: 2의 성숙 폴리펩타이드를 구성하는 폴리펩타이드 또는 이들의 상동 서열의 화학적 변형; 및 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA의 유전자 조작을 의미한다. 변형은 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 삽입뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 측쇄의 대체가 될 수 있다.
- <61> 인공 변이체: 본원에서 사용하는 용어 "인공 변이체"는 SEQ ID NO: 1의 성숙 폴리펩타이드 암호화 서열의 변형된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 상동 서열을 발현하는 유기체에 의하여 생산되는 셀룰로오스가수분해 증진 활성을 보유한 폴리펩타이드를 의미한다. 변형된 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 1에 개시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 상동 서열의 변형에 의한 인간의 개입을 통하여 획득한 것이다.

도면

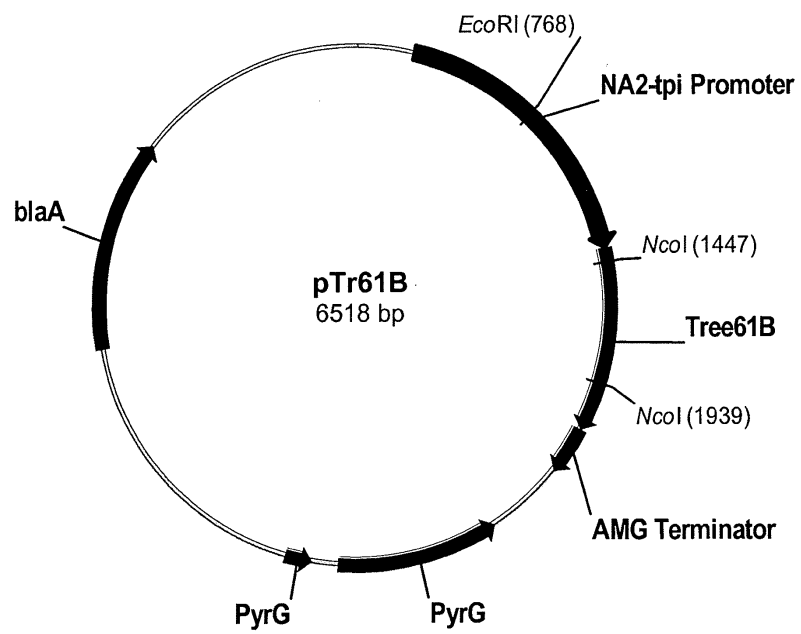
도면1

GGATCTAAGCCCCATCGATATGAAGTCCTGGGCCATTCTTGCAGCCCTTGGCTGCTTCCGGGAGCGTTCTCGGCCCATG
M K S C A I L A A L G C L A G S V L G H
GACAGTCCAAAACTTACGATCAATGGACAATACAATCAGGGTTTCATTCTCGATTACTACTCAGAAGCAGATACT
G Q V Q N F T I N G Q Y N Q G F I L D Y Y Q K Q N T
GGTCACTTCCCAACGTTGCTGGTGGTACGCCGAGGACCTAGACCTGGGCTTCATCTCCCTACCAATACACCACGCC
G H F P N V A G W Y A E D L D L G F I S P D Q Y T T P
CGACATTGCTGTCAAGAAGCGGCCCGGCTGCCATTCTGCCACTGCGAGCGGCCGAGCAACATCGTCTTCCAAT
D I V C H K N A A P A P G A I S A T A A A G S N I V F Q
GGGGCCCTGGCGTCTGGCCTACCCCTACGGTCCCATCGTTACCTAGTGGCTGAGTGCAGCGGATCGTGCACGACCGTG
W G P G V W P H P Y G P I V T Y V V E C S G S C T T V
AACAGAACAACCTGGCTGGGTCAAGATTCAGGAGGCCGGCATCAACTATAACACCCCAAGTCTGGGCCGAGCAGGATCT
N K N N L R W V K I Q E A G I N Y N T Q V W A Q D L
GATCAACAGGGCAACAAGTGGACTGTGAAGATCCCGTCGAGCCCTCAGGCCCGGAACTATGTCTTCCGCCATGAATTG
I N Q G N K W T V K I P S S L R P G N Y V F R H E L
TTGCTGCCCATGGTGCTCTAGTGCAGAACGGCATGCAGAACTATCCTCAGTGCCTGAACATCGCGTCAAGGCTCGGGC
L A A H G A S A N G M Q N Y P Q C V N I A V T G S G
ACGAAAGCGTCCCTGCCGGAACCTCTGCAACTCAGCTCTACAAGCCCACTGACCCCTGGCATCTTGTTCACCCCTTACAC
T K A L P A G T P A T Q L Y K P T D P G I L F N P Y T
AACATCACGAGCTACACCCATCCCTGGCCGAGCCCTGTGGCAAGCTAGATCCAGGGGTACGGTGTGGCGTTTCGTGAAG
T I T S Y T I P G P A L W Q G
TCGGAGCTGTTGACAAGGATATCTGATGATGAACGGAGAGGACTGATGGGCGTGACTGAGTGTATATATTTTGTGATGACC
AAATTGTATACGAAATCCGAACGCATGGTGATCAATTGTTTATCCCTGTAGTATATTTGTCTCCAGGCTGCTAAGAGCCAC
CGGGTGATATTACGGCAACAAAGTCAGGAATTTGGGTGGCAATGAACGCAGGCTCTCCATGAATGTATATGTGAAGAGGCAT
CGGCTGGCATGGGCATTACCAGATATAGGCCCTGTGAACACATATAGTACTTGAACGTGCTACTGGAACCGGATCATAGCA
AGTCATCAACATGTGAAAAAACACTACATGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA

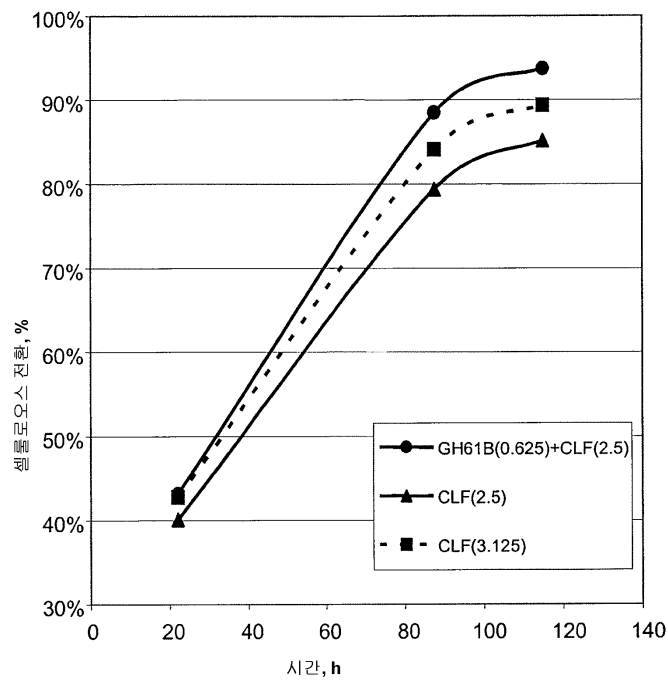
도면2



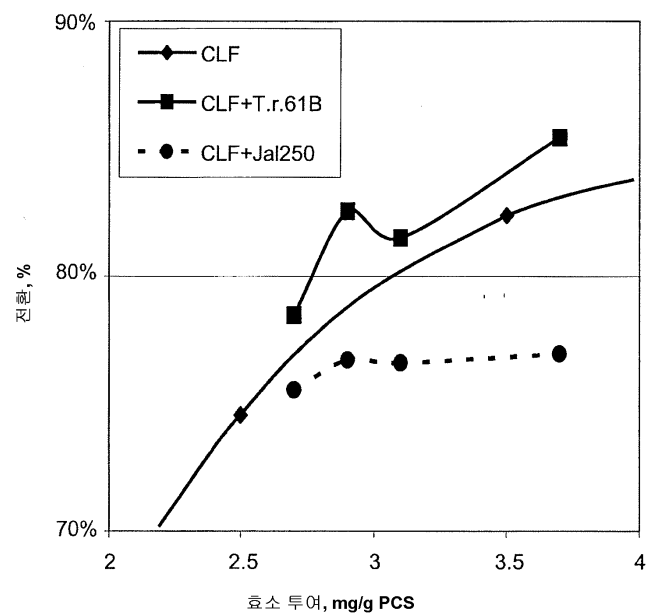
도면3



도면4



도면5



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Novozymes, Inc.

<120> Methods for Enhancing the Degradation or Conversion of Cellulosic

Material

<130> 10825.204-WO

<150> 60/722,579

<151> 2006-09-30

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1172

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 1

ggatctaagc cccatcgata tgaagtcctg cgccattctt gcagcccttg gctgtcttgc 60

cgggagcggtt ctcgccatg gacaagtcca aaacttcacg atcaatggac aatacaatca 120

gggtttcatt ctcgattact actatcagaa gcagaatact ggtcacttcc ccaacgttgc 180

tggctggtac gccgaggacc tagacctggg ctctcatctcc cctgaccaat acaccacgcc 240

cgacattgtc tgtcacaaga acgcggcccc aggtgccatt tctgccactg cagcggccgg 300

cagcaacatc gtcttccaat ggggccctgg cgtctggcct caccctacg gtcccatcgt 360

tacctacgtg gctgagtga gcgatcgtg cagcaccgtg aacaagaaca acctgcgctg 420

ggtcaagatt caggaggccg gcatcaacta taacacccaa gtctgggcgc agcaggatct 480

gatcaaccag ggcaacaagt ggactgtgaa gatcccgctg agcctcagc ccggaaacta 540

tgtcttcgc catgaacttc ttgctgcca tggcgctct agtgcaacg gcatgcagaa 600

ctatcctcag tgcgtgaaca tcgccgtcac aggtcgggc acgaaagcgc tccctgccgg 660

aactcctgca actcagctct acaagccac tgaccctggc atctgttca acccttacac 720

aacaatcacg agctacacca tccctggccc agccctgtgg caaggctaga tccaggggta 780
 cgggtgtggc gticgtgaag tccgagctgt tgacaaggat atctgatgat gaacggagag 840
 gactgatggg cgtgactgag tgtatatatt ttgatgacc aaattgtata cgaaatccga 900
 acgcatgggtg atcattgttt atccctgtag tatattgtct ccaggctgct aagagcccac 960
 cgggtgtatt acggcaacaa agtcaggaat ttgggtggca atgaacgcag gtctccatga 1020
 atgtatatgt gaagaggcat cggctggcat gggcattacc agatataggc cctgtgaaac 1080
 atatatgtact tgaacgtgct actggaacgg atcataagca agtcatcaac atgtgaaaaa 1140
 acactacatg taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1172

<210> 2
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

<400> 2

Met Lys Ser Cys Ala Ile Leu Ala Ala Leu Gly Cys Leu Ala Gly Ser
 1 5 10 15

Val Leu Gly His Gly Gln Val Gln Asn Phe Thr Ile Asn Gly Gln Tyr
 20 25 30

Asn Gln Gly Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr Tyr Gln Lys Gln Asn Thr Gly
 35 40 45

His Phe Pro Asn Val Ala Gly Trp Tyr Ala Glu Asp Leu Asp Leu Gly
 50 55 60

Phe Ile Ser Pro Asp Gln Tyr Thr Thr Pro Asp Ile Val Cys His Lys
 65 70 75 80

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

Ile Val Phe Gln Trp Gly Pro Gly Val Trp Pro His Pro Tyr Gly Pro
100 105 110

Ile Val Thr Tyr Val Val Glu Cys Ser Gly Ser Cys Thr Thr Val Asn
115 120 125

Lys Asn Asn Leu Arg Trp Val Lys Ile Gln Glu Ala Gly Ile Asn Tyr
130 135 140

Asn Thr Gln Val Trp Ala Gln Gln Asp Leu Ile Asn Gln Gly Asn Lys
145 150 155 160

Trp Thr Val Lys Ile Pro Ser Ser Leu Arg Pro Gly Asn Tyr Val Phe
165 170 175

Arg His Glu Leu Leu Ala Ala His Gly Ala Ser Ser Ala Asn Gly Met
180 185 190

Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Val Asn Ile Ala Val Thr Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Pro Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Pro Thr
210 215 220

Asp Pro Gly Ile Leu Phe Asn Pro Tyr Thr Thr Ile Thr Ser Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Pro Gly Pro Ala Leu Trp Gln Gly
245

<210> 3
<211> 25
<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> V= G, A, OR C

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> N= A, C, G, OR T

<400> 3

tttttttttt tttttttttt tttvn

25

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 4

tgtccatggc cgaga

15

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 5

atactggtca cttcccaa

19

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Trichoderma reesei

<400> 6

gcgctgggtc aagatt

16

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 7

actggattta ccatgaagtc ctgcgccatt cttgc

35

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 8

agtcacctct agttagcctt gccacagggc tgg

33