



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0041410
 (43) 공개일자 2009년04월28일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C12N 9/44</i> (2006.01) <i>C12N 15/12</i> (2006.01)
 <i>C12N 5/10</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7003544
 (22) 출원일자 2009년02월20일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2009년02월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/018523
 국제출원일자 2007년08월21일
 (87) 국제공개번호 WO 2008/024372
 국제공개일자 2008년02월28일</p> <p>(30) 우선권주장
 60/839,735 2006년08월23일 미국(US)
 60/903,247 2007년02월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 다니스코 유에스 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토 페이지 밀 로드 925</p> <p>(72) 발명자
 잉글랜드 조지
 미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코유에스 인크. 제넨코 디비전
 콜크만 마르크
 네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스백 30
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인코리아나</p> |
|---|---|

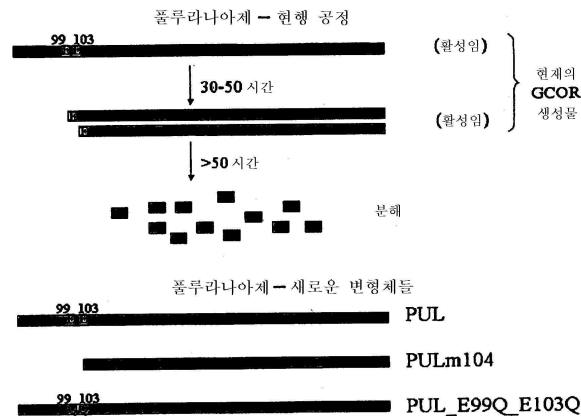
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 생산성이 증가된 폴루라나아제 변형체

(57) 요약

본 발명은 효소적 펩티드인 폴루라나아제의 신규한 변형체, 상기 신규한 펩티드를 인코딩하는 유전자 서열, 이들 유전자 서열을 포함하는 발현 벡터 및 상기 신규한 폴루라나아제 변형체를 발현하는 유기체에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 폴루라나아제 변형체는 코돈-최적화 절차의 이용, "야생형" 분자에 대한 선택적 절단 및 선택된 아미노산 잔기들의 대체를 통해 실험적으로 제조된 것이다. 나아가, 본 발명은 이들 신규한 폴루라나아제 펩티드들의, 식물, 발효, 식품 및 기타 산업에서의 사용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

밀러 브라이언 에스

미국 94010 캘리포니아주 벨렝게임 플로리번다 애
비뉴 1446 넘버 103

브뢰멘 카스퍼

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스백
30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 2, 4 및 6 으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 90 % 서열 동일성을 갖는 단리된 펩티드 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 단리된 펩티드 분자가 폴루라나아제 활성을 갖는 조성물.

청구항 2

서열번호: 1, 3 및 5 로 이루어진 군에서 선택되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 단리된 핵산 분자를 포함하는 조성물로서, 상기 뉴클레오티드 서열이 폴루라나아제를 인코딩하는 것인 조성물.

청구항 3

서열번호: 2, 4 또는 6 의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 인코딩하는 단리된 DNA 를 포함하는 조성물.

청구항 4

서열번호: 1, 3 및 5 로 이루어진 군에서 선택되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 단리된 DNA 로 이루어진 발현 구조체를 포함하는 조성물.

청구항 5

제 4 항의 발현 구조체로서, 상기 발현 구조체로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 제어 서열에 작동가능하게 연결된 발현 구조체.

청구항 6

제 5 항의 발현 구조체로서, 숙주 유기체 내로 형질감염되는 발현 구조체.

청구항 7

제 6 항의 숙주 유기체로서, 진균, 세균 및 진핵 세포로 이루어진 군에서 선택되는 숙주 유기체.

청구항 8

제 7 항의 숙주 유기체로서, *바실러스* 속, *바실러스 서브틸리스*, *에스케리키아 콜리*, *트리코더마 리이세이*, *사카로마이세스 세레비지애*, *아스페르길루스 니케르* 및 *B. 리케니포르미스*로 이루어진 군에서 선택되는 숙주 유기체.

청구항 9

폴루라나아제를 인코딩하는 발현 구조체를 포함하는 조성물로서, 상기 발현 구조체가 서열번호: 1, 3, 및 5 로 이루어진 군에서 선택되는 핵산 서열을 포함하는 조성물.

청구항 10

서열번호: 2, 4 및 6 으로 이루어진 군에서 선택되는 펩티드를 인코딩하는 발현 구조체를 포함하는 조성물.

청구항 11

하기를 포함하는, 폴루라나아제 생성 방법:

- a. 하기를 제공하는 단계: i) 폴루라나아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 작동가능한 상태의 발현 구조체로서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호: 1, 3 및 5 로 이루어진 군에서 선택되는 것인 발현 구조체; ii) 숙주 유기체 및; iii) 배양 수단;
- b. 상기 발현 구조체를 상기 숙주 유기체 내로 형질감염시켜 형질감염된 숙주 유기체를 생성하는 단계;
- c. 상기 형질감염된 숙주 유기체를 상기 배양 수단 중에서 폴루라나아제를 생성하기에 충분한 조건 하에서 일정 기간의 시간 동안 배양하는 단계.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 폴루라나아제가 상기 배양 수단으로부터 단리되는 방법.

청구항 13

제 11 항의 숙주 유기체로서, 진균, 세균 및 진핵 세포로 이루어진 군에서 선택되는 숙주 유기체.

청구항 14

제 13 항의 숙주 유기체로서, *바실러스 속*, *바실러스 서브틸리스*, *에스케리키아 콜리*, *트리코더마 리이세이*, *사카로마이세스 세레비지애*, *아스페르길루스 니케르* 및 *B. 리케니포르미스*로 이루어진 군에서 선택되는 숙주 유기체.

청구항 15

하기를 포함하는, 폴루라나아제 생성 방법:

- a. 하기를 제공하는 단계: i) 서열번호: 2, 4 및 6 으로 이루어진 군에서 선택되는 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 작동가능한 상태에서 인코딩하는 발현 구조체로 형질감염된 숙주 유기체 및 ii) 배양 수단;
- b. 상기 형질감염된 숙주 유기체를 상기 배양 수단 중에서 폴루라나아제를 생성하기에 충분한 조건 하에서 일정 기간의 시간 동안 배양하는 단계.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 폴루라나아제가 상기 배양 수단으로부터 단리되는 방법.

청구항 17

제 15 항의 숙주 유기체로서, 진균, 세균 및 진핵 세포로 이루어진 군에서 선택되는 숙주 유기체.

청구항 18

제 17 항의 숙주 유기체로서, *바실러스 속*, *바실러스 서브틸리스*, *에스케리키아 콜리*, *트리코더마 리이세이*, *사카로마이세스 세레비지애*, *아스페르길루스 니케르* 및 *B. 리케니포르미스*로 이루어진 군에서 선택되는 숙주 유기체.

청구항 19

폴루라나아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열로서, 서열번호: 1, 3 및 5 중 임의의 것으로부터 방향성 분자 진화에 의해 유래된 서열.

청구항 20

표 4 에 제시된 *B. 리케니포르미스* 중 하나 이상의 균주를 포함하는 조성물.

명세서

<1> 본 출원은 미국 가출원 US 60/903,247 (2007 년 2 월 23 일 제출), 및 US 60/839,735 (2006 년 8 월 23 일 제출) 에 대해 우선권을 주장하며, 상기 각각은 전문이 참조로서 본원에 포함된다.

기술분야

<2> 본 발명은 효소적 펩티드인 폴루라나아제의 신규한 변형체, 상기 신규한 펩티드를 인코딩하는 유전자 서열, 상기 유전자 서열을 포함하는 발현 벡터 및 상기 신규한 폴루라나아제 변형체를 발현하는 유기체에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 직물, 발효, 식품 및 기타 산업에서의 이들 신규한 폴루라나아제 펩티드의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <3> 풀루라나아제는 수많은 산업 분야, 특히 식품 및 음료 산업에서 유용성이 발견되는 효소이다. 풀루라나아제는 전분 절지 (debranching) 효소이며, 전분 가수분해물의 절지 (반죽 상태조절에 유용), β-한계 텍스트린의 절지 (맥주 및 에일 (ale) 의 양조에 유용) 및, 예를 들어, 옥수수, 감자, 밀, 마니옥 (manioc) 및 쌀로부터의, 설탕 시럽 제조에 효과적이다. 풀루라나아제는 EC 3.2.1.41 로 분류되는 효소이며, 이러한 효소들은 α-1,6-글리코시드 결합 (예를 들어, 아밀로펙틴 및 풀루란에서의 것) 을 가수분해하는 능력을 특징으로 한다.
- <4> 풀루라나아제는 세균, 특별히 *바실러스* 속의 생성물이다. 산업적 용도를 위한 풀루라나아제의 제조는 문제가 없지 않다. 풀루라나아제는 상기 세균에 의해 또한 생성되는 각종 프로테아제들에 의해 신속히 분해되어, 다량의 풀루라나아제의 회수를 비효율적이고 고비용적인 것으로 만든다. 배양물 내에서의 풀루라나아제의 분해를 제한하여 생성을 증가시키는 방법이 당 분야의 다양한 사람들에 의해 고안되었다. 예를 들어, 본 발명자들은 이전에 풀루라나아제 생성 균주로부터 (프로테아제들을 발현하는) AprL 및 Mpr 유전자들을 결실시키는 것이 활성 풀루라나아제의 경제적 발현에 필수적임을 나타내었다. 나아가, 단백질 분해 및 풀루라나아제 생성물의 활성 손실을 제한하기 위해 발효 시간은 51 - 60 시간으로 제한된다. Svendsen 은 상기 효소의 열 안정성을 증가시키거나 또는 상기 효소가 그의 기질을 분해하는 방법을 변화시키도록 상기 효소의 3 차원적 형태를 변경하는 풀루라나아제 변형체를 고안하였다(US 특허 제 6,350,599 호 및 6,838,257 호, 및 US 출원 제 2004/0082028 호 참조).
- <5> 보다 최근에는, 본 발명자들은 풀루라나아제 분해의 시기가 하기 결과로 결정된다는 것을 나타내었다: 30 내지 50 시간 사이에, 전장 (full length) 풀루라나아제 분자가 N-말단의 98 개 및 102 개 아미노산을 각각 결여한 절단된 분자들로 부분적 클리핑 (partial clipping) 되는 것을 관찰함. 클리핑은 글루탐산 잔기들인 E99 및 E103 각각에 대해 N-말단쪽으로 일어났으며, 이는 HPLC 로 가시화될 수 있었다. 놀랍게도, 1-98 및 1-102 절단된 풀루라나아제 분자들은 풀루라나아제 활성을 보유하며, 더욱 더 놀라운 것은, 상기 활성이 전장 풀루라나아제보다 더 큰 것으로 증명되었다. 51 시간 후, 풀루라나아제 분자가 추가로 분해되면, 활성 저하가 일어났으며, 이는 궁극적으로 활성을 완전히 잃어버리게 하였다.
- <6> 여전히, 풀루라나아제 펩티드 및 이를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 설계에 있어 개선의 여지가 남아 있다. 따라서, 풀루라나아제의 보다 효율적인 생성을 위한 화합물 및 방법, 예를 들어, 단백질 분해 제한, 발효 역가 (fermentation titer) 증가 또는 풀루라나아제 활성 증가를 이용한 방법이 필요하다.

발명의 상세한 설명

- <7> 발명의 요약
- <8> 본 발명은 펩티드 효소인 풀루라나아제의 자명하지 않은 새로운 형태에 관한 것이다. 본 발명의 풀루라나아제는 생산 역가 (production titer) 및/또는 분해 (예컨대, 프로테이나제에 의한 효소적 분해) 저항에 있어서 우수한 성능을 일으키고/일으키거나 표적화 기질 물질의 분해에 있어서 그의 모 ("야생형") 펩티드보다 활성이 더 큰 신규한 변형을 포함한다.
- <9> 이와 관련하여, 본 발명은 도 7(b), 8(b) 및 9(b) 에 각각 나타난 바와 같은 펩티드 서열번호: 2, 서열번호: 4 및 서열번호: 6 의 풀루라나아제들에 관한 것이다. 본 발명은 또한 아미노산 서열 서열번호: 2, 4 및 6 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 상기 각 뉴클레오티드 서열은 또한 도 7(a), 8(a) 및 9(a) 에도 서열번호: 1, 3 및 5 로 각각 나타나 있다. 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이, 유전자 코드에는 동일 아미노산을 인코딩하는 다수의 뉴클레오티드 코돈이 풍부하다. 따라서, 본 발명은 부가적으로 서열번호: 2, 4 및 6 의 펩티드들을 인코딩하는 모든 대안적인 뉴클레오티드 서열들에 관한 것이다. 당업자는 본 명세서의 교시 및 당업계의 지식을 기초로 본 발명의 펩티드 서열들을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열들을 결정할 수 있다.
- <10> 본 발명은 본 발명의 펩티드들을 인코딩하는 발현 구조체에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명의 펩티드들을 발현할 수 있는 것인 한 임의의 특정 발현 구조체에 한정되지 않는다. 이와 관련하여, 적당한 발현 구조체의 비제한적인 예는 도 4 - 6 의 (a) 부분에 도식적으로 나타나 있다.
- <11> 본 명세서의 상세한 설명 및 실시예 부분에서 더욱 상세히 설명되지만, 한 가지 구현예에서, 모 풀루라나아제 펩티드 (*바실러스 테라미피칸스* (*Bacillus deramificans*) 로부터의 것) 를 인코딩하는 서열을 코돈-최적화 기법으로 변형시켜 상기 야생형 (즉, 모) 풀루라나아제 아미노산 서열 [서열번호: 2] 의 중복물을 인코딩하는 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열 [서열번호: 1] 을 생성하였다. 상기 아미노산 서열 [서열번호: 2] 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 *B. 리케니포르미스* (*B. licheniformis*) 삽입 벡터인 pICatH 의 *XhoI* 부위 내로 두 방향

으로 클로닝하여 상기 발현 구조체의 Ori1 (pICatH-PUL-Ori1) 및 Ori2 (pICatH-PUL-Ori2) 버전들을 생성하였다.

<12> 또 다른 구현예에서는, 상기 모 폴루라나아제 펩티드를 인코딩하는 서열을, N-말단 104 개 아미노산이 결실된 폴루라나아제 펩티드를 생성하도록 변형시켰다. 상기 신규한 폴루라나아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 또한, 한 가지 구현예에서, 코돈-최적화되었다[서열번호: 3]. 상기 구조체에 의해 발현된 펩티드인 PULm104 는 서열번호: 4 로 제시되어 있다(도 8(b) 참조). [서열번호: 4] 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 *B. 리케니포르미스* 삽입 벡터 pICatH 의 *XhoI* 부위 내로 두 방향으로 클로닝하여 상기 발현 구조체의 Ori1 (pICatH-PULm104-Ori1) 및 Ori2 (pICatH-PULm104-Ori2) 버전들을 생성하였다.

<13> 또 다른 구현예에서는, 상기 모 폴루라나아제 펩티드를 인코딩하는 서열을, 99 및 103 위치의 아미노산 잔기가 글루탐산 (E) 에서 글루타민 (Q) 으로 대체되도록 변경하여, 결과적으로 생성된 펩티드가 이들 위치에서의 단백질 분해에 더욱 저항성 있게 하였다. 상기 신규한 폴루라나아제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 또한, 한 가지 구현예에서, 코돈-최적화되었다[서열번호: 5]. 상기 핵산 서열에 의해 발현되는 펩티드인 PUL_E99Q_E103Q 는 서열번호: 6 에 제시되어 있다. 상기 [서열번호: 6] 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 *B. 리케니포르미스* 삽입 벡터 pICatH 의 *XhoI* 부위 내로 두 방향으로 클로닝하여 상기 발현 구조체의 Ori1 (pICatH-PUL_E99Q_E103Q-Ori1) 및 Ori2 (pICatH-PUL_E99Q_E103Q-Ori2) 버전들을 생성하였다.

<14> 본 발명은 또한 본 발명의 발현 구조체를 적당한 숙주 유기체 내로 형질감염(transfection)하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 임의의 특정 숙주 유기체에 한정되지 않는다. 상기 숙주 유기체는, 예를 들어, 미생물, 진핵 세포 또는 조직 배양물, 식물 세포 또는 조직 배양물 또는 진균 세포 또는 조직 배양물일 수 있다. 한 가지 바람직한 구현예에서, 상기 숙주 유기체는 미생물이다. 바람직한 숙주 유기체로는, 이들에 제한되는 것은 아니나, *바실러스* 속 (특별히, *바실러스 서브틸리스* (*Bacillus subtilis*), *B. 리케니포르미스* 및 *B. 데라미피칸스*), *에스케리키아 콜리* (*Escherichia coli*), *트리코더마 리이세이* (*Trichoderma reesei*), *사카로마이세스 세레비지애* (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 *아스페르길루스 니게르* (*Aspergillus niger*) 가 있다. 가장 바람직한 구현예에서, 상기 숙주 유기체는 *B. 리케니포르미스*이다.

<15> 본 발명은 본 발명의 숙주 유기체가 배양되는 매질로부터 본 발명의 펩티드들을 단리 및 정제하는 것에 관한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명은 10 % 의 최소 순도를 야기하는 것인 한 임의의 특정 단리 및 정제 기법에 제한되지 않는다. 더욱 바람직한 구현예에서, 단리·정제되는 펩티드의 최소 순도는 25 % 이고, 더욱 더 바람직한 구현예에서, 단리·정제되는 펩티드의 최소 순도는 50 % 이다. 더욱 더 바람직한 구현예에서, 단리·정제되는 펩티드의 최소 순도는 75 % 이다. 가장 바람직한 구현예에서, 본 발명의 단리·정제되는 펩티드의 최소 순도는 90 % 이다. 최소 순도는 총 건조 중량의 비율 또는 당업계에 공지된 기타 적당한 수단으로 측정할 수 있다.

<16> 본 발명은 본 발명의 펩티드들의 단리 및 정제에 대한 임의의 특정 정제 수단에 제한되지 않는다. 당업계에 공지된 임의의 펩티드 정제 수단이 적당하다. 적당한 정제 수단의 비제한적인 예로서는 친화 크로마토그래피, 침전, 크기 배제 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피, 전기영동, 크기 여과 (size filtration) 등이 있다.

<17> 당업자는 본 발명의 맥락에서 본 발명의 폴루라나아제의 생물학적으로 활성인 절편이 전장 서열 또는 등가물 대신 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. "생물학적으로 활성인 절편"은 본 발명의 서열들의 임의의 유사체, 모방체, 절단, 결실 및/또는 치환을 포괄하는 것으로 의도되었다. 상기 폴루라나아제의 펩티드 모방체 및 본 발명의 폴루라나아제의 활성 도메인은, 당업계에 공지된 바와 같이, 구조 데이터를 사용하여 컴퓨터를 이용하여 설계할 수 있다. 부가적으로, 본 발명의 한 가지 구현예에서, 본 발명의 폴루라나아제의 뉴클레오티드 서열들의 유사체 및 돌연변이를 방향성 분자 진화에 의해 생성할 수 있다는 것이 고려된다. 방향성 분자 진화의 기법들은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 하기 참조: Stemmer, 등의 U.S. 특허 제 5,605,793 호, 또는 Short 의 U.S. 특허 제 6,537,776 호; 이들은 참조로서 본원에 포함됨). 방향성 분자 진화에 의해 생성되는 단백질들은 본 발명의 펩티드들과 비교하여 폴루라나아제로서 기능하는 능력이 더 적거나 더 크거나 또는 동등할 것이다.

<18> 본 발명의 또 다른 구현예에서, 본 발명의 펩티드들은, 예를 들어, 다른 구조 또는 기능의 펩티드 도메인과의, 융합 단백질로 사용된다. 이러한 도메인들은, 예를 들어, 상기 융합 단백질에 다른 효소적 능력을 부여하거나 또는 상기 펩티드를 일정 표면에 속박시킬 수 있다.

<19> 본 발명의 펩티드에는 또한 동의 유전자 (multiple genes) 의 존재, 선택적 전사 (alternative transcription) 사건, 선택적 RNA 스플라이싱 사건, 및 선택적 번역 및 번역후 사건의 결과로서 일어나는 것들이 포함된다. 상기 폴리펩티드를, 발현된 폴루라나아제가 본래의 세포에서 발현될 때 존재하는 실질적으로 동일한 번역후 변형이 일어나게 하는 시스템, 예컨대, 배양된 세포 내에서 발현시킬 수 있고, 또는 본래의 세포에서 발현시 존재하는 번역후 변형이 누락되게 하는 시스템 내에서 발현시킬 수도 있다.

<20> 본 발명에는 또한 하나 이상의 폴루라나아제 펩티드 (또는 이를 인코딩하는 핵산) 및 하나 이상의 추가적인 성분, 예컨대, 담체, 희석제 또는 용매를 포함하는 조성물이 포함된다. 상기 추가적인 성분은 상기 조성물을 시험관내, 생체내, 약학적, 또는 수의학적 용도에 유용하게 하는 것일 수 있다.

<21> 또 다른 측면에서, 본 발명은 그의 아미노산 서열이 본 발명의 폴루라나아제 펩티드의 서열이거나 또는 이를 포함하는 것인 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖거나 또는 포함하는 실질적으로 순수한 핵산을 제공한다.

<22> 바람직한 구현예들에서, 본 폴루라나아제 핵산은 상기 폴루라나아제 유전자 서열에 작동가능하게 연결된, 예컨대, 상기 폴루라나아제 유전자 서열을 발현 벡터로 사용하기에 적합하게 하는, 전사 조절 서열, 예컨대, 전사 프로모터 또는 전사 인핸서 서열 중 적어도 하나를 포함할 것이다.

<23> 또한 추가로 바람직한 구현예에서, 본 발명의 폴루라나아제 펩티드를 인코딩하는 핵산은, 엄격한 조건 하에서 서열번호: 1, 3 또는 5 로부터의 적어도 12 개의 연속적 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 서열번호: 1, 3 또는 5 로부터의 적어도 20 개의 연속적 뉴클레오티드에 해당하는 핵산 탐침자에 혼성화된다.

<24> 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예는 본원에 기술된 폴루라나아제의 다양한 산업 환경에서의 용도를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은, 식료품 (이들에 제한되는 것은 아니나, 각종 가루 반죽 및 시럽 포함), 음료 (맥주 및 알레와 같은 각종 양조 음료 포함, 그러나 이들에 제한되는 것은 아님), 바이오에탄올 및 당업자들에 공지된 수많은 다른 제품들의 제조에서의 본 발명의 신규한 폴루라나아제 변형체의 용도에 관한 것이다.

<25> **도면의 간단한 설명**

<26> 도 1 은 현행 폴루라나아제 공정 및 본 프로젝트에서 설계된 폴루라나아제 변형체들을 도식적으로 표현한 것을 나타낸다.

<27> 도 2 는 본 발명에서 제조된 폴루라나아제 발현 균주에 존재하는 구조체의 분자 구조를, 균주 BMP139 에서의 폴루라나아제 발현 구조체와 비교하여 나타낸다.

<28> 도 3 은 pICatH 벡터를 도식적으로 표현한 것을 나타낸다. 상기 pICatH 벡터는 온도 민감성 복제 원점 (ori pE194, *바실러스*에서의 복제용), ori pBR322 (*E. 콜리*에서의 증폭용), 선별을 위한 네오마이신 저항성 유전자, 및 선별, 염색체 통합 및 카세트 증폭을 위한 반복된 본래의 *B. 리케니포르미스* 클로람페니콜 저항성 유전자 (cat)를 포함한다.

<29> 도 4 는 pICatH-PUL Ori1 구조체를 도식적으로 표현한 것을 나타낸다.

<30> 도 5 는 pICatH-PULm104Ori1 구조체를 도식적으로 표현한 것을 나타낸다.

<31> 도 6 은 pICatH-PUL_E99Q_E103Q Ori 구조체를 도식적으로 표현한 것을 나타낸다.

<32> 도 7A-B 는 코돈-최적화된 "야생형" 폴루라나아제 (PUL) 의 (a) 핵산 서열 [서열번호: 1] 및 (b) 아미노산 서열 [서열번호: 2] 을 나타낸다.

<33> 도 8A-B 는 PULm104 폴루라나아제의 (a) 핵산 서열 [서열번호: 3] 및 (b) 아미노산 서열 [서열번호: 4] 을 나타낸다.

<34> 도 9A-B 는 PUL_E99Q_E103Q 폴루라나아제의 (a) 핵산 서열 [서열번호: 5] 및 (b) 아미노산 서열 [서열번호: 6] 을 나타낸다.

<35> **정의 부분**

<36> 본 명세서 및 첨부된 청구의 범위에 사용되는 바와 같은 단수 형태는 내용상 명백히 다르게 지시되어 있지 않는 한 복수의 대응물을 포함한다는 것을 유의하여야 한다. 즉, 예를 들어, "화합물"을 함유하는 조성물에 대한 언급에는 둘 이상의 화합물의 혼합물이 포함된다. 또한, "또는"이라는 용어는 내용상 명백히 다르게 지시되

어 있지 않는 한 일반적으로 "및/또는"을 포함하는 의미로 이용된다는 것도 유의하여야 한다.

- <37> "폴루라나아제"라는 용어는 폴루란을 분해하는 전분분해 세포내 효소인 특수한 종류의 글루카나아제를 지칭한다. 이는, 예를 들어, *클렙시엘라 (Klebsiella)* 속의 그람-음성 세균에 의해 세포외부의 세포 표면-고정 지질단백질로서 생성된다. 그러나, 그람-양성 세균은 폴루라나아제를 분비 단백질로서 생성한다. I 형 폴루라나아제는 α -1,6 연결을 특이적으로 공격하는 반면, II 형 폴루라나아제는 α -1,4 연결도 또한 가수분해할 수 있다. 이는 또한 일부 다른 세균 및 고세균에 의해서도 생성된다. 폴루라나아제는 생명공학에서 세제로 사용된다. 폴루라나아제 (EC 3.2.1.41)는 또한 폴루란-6-글루카노히드롤라제 (절지 효소)로도 알려져 있다. 폴루란은 α -1,6-글루코시드 결합에 의해 연결된 말토트리오스 단위들의 사슬로 간주된다. 폴루라나아제는 폴루란 (α -글루칸 다당류)을 가수분해적으로 절단할 것이다.
- <38> "코돈 최적화"라는 용어는 암호화 서열 내의 뉴클레오티드 코돈을, 동일 아미노산을 암호화하지만 숙주 유기체에 의해 더욱 효율적으로 가공되는 코돈으로 대체함으로써 발현 수준을 강화하는 기법을 지칭한다. 상이한 종 사이에서 코돈 선호는 극적으로 상이할 수 있다. 특정 발현 시스템 (세균, 진균, 효모, 곤충, 식물 또는 포유동물 세포) 내에서 외래 단백질의 발현 수준을 강화하기 위해서는, 상기 외래 단백질의 코돈 빈도를 숙주 발현 시스템의 것에 대응되게 조절하는 것이 매우 중요하다. 한 가지 고전적인 예로서 포유동물 세포에서 고수준의 발현을 달성하도록 최적화된 GFP (녹색 형광 단백질)가 있다. 즉, 코돈-최적화는 해당 서열들이 발현된다 하더라도 효율적으로 발현되지 않을 수 있는 폭넓은 숙주 유기체에서 본 발명의 단백질들을 발현시키는데 사용될 수 있다.
- <39> 본원에 사용된 바 "발현 벡터"라는 용어는 목적하는 암호화 서열 및 특정 숙주 유기체에서 상기 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 지칭한다. 원핵 생물에서의 발현에 필요한 핵산 서열에는, 프로모터, 임의로는 작동유전자 (operator) 서열, 리보솜 결합 부위 및 가능하게는 기타 서열이 포함된다.
- <40> 본원에 사용된 바, "이종성 프로모터"는 유전자 또는 정제된 핵산에 천연적으로 결합되는 것이 아닌 프로모터이다. 본원에 사용된 바, "프로모터," "프로모터 요소," 또는 "프로모터 서열"이라는 용어들은 관심 뉴클레오티드 서열에 결합시 상기 관심 뉴클레오티드 서열의 mRNA 로의 전사를 조절할 수 있는 DNA 서열을 지칭한다. 프로모터는, 반드시 그런 것은 아니지만, 전형적으로 mRNA 로의 전사 조절 대상인 관심 뉴클레오티드 서열의 5' (즉, 상류)에 위치하며, RNA 중합효소 및 전사 개시를 위한 기타 전사 인자들에 의한 특이적 결합 부위를 제공한다.
- <41> 조절 인자에 적용되는 바 "세포-유형 특이적" 또는 "숙주 유기체 특이적"이라는 용어 또는 이에 상당하는 용어들은, 동일 조직 내의 상이한 유형의 세포 또는 유기체에서 동일한 관심 뉴클레오티드 서열의 발현이 상대적으로 부재한 중에 특정 유형의 세포 또는 유기체에서의 관심 뉴클레오티드 서열의 선택적 발현을 지휘할 수 있는 조절 인자를 지칭한다. 조절 인자에 적용될 때 "세포-유형 특이적" 또는 "숙주 유기체 특이적"이라는 용어는 또한 각각 단일 조직 또는 유기체 내의 일정 영역에서 관심 뉴클레오티드 서열의 선택적 발현을 촉진할 수 있는 조절 인자를 의미한다.
- <42> 본원에 사용된 바, 폴리펩티드의 "단리된," "정제된 시료" 또는 "실질적으로 순수한 시료"란, 그의 천연적 상태에서는 또는 그의 실제 원천으로부터 수득시에는 통상 결합되어 있는 적어도 하나의 오염 물질이 분리된 동정된 폴리펩티드를 의미한다. 상기 적어도 하나의 다른 오염 물질은, 예를 들어, 천연적으로는 함께 발생하는 다른 단백질, 지질, 및 핵산일 수 있다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드를 또한 이를 정제하는데 사용되는 물질, 예컨대, 항체 또는 겔 매트릭스, 예컨대, 폴리아크릴아미드로부터도 분리한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 상기 정제된 시료의 적어도 10, 20, 50, 70, 80 또는 95 % 건조 중량을 구성한다. 바람직하게는, 상기 시료는 하기를 함유한다: 단백질 서열분석을 가능하게 하기에 충분한 폴리펩티드; 적어도 1, 10, 또는 100 mg의 상기 폴리펩티드.
- <43> 본원에 사용된 바, "정제된 세포 시료"란, 식물 또는 동물 세포의 경우, 세포의 시험관내 시료로서 전체의 온전한 식물 또는 동물이 아닌 것을 지칭한다. 배양된 세포 또는 미생물 세포의 경우, 이는 대상 세포의 적어도 10 % 및 더욱 바람직하게는 50 %의 시료로 이루어진다.
- <44> 실질적으로 순수한 DNA 와 같은 "실질적으로 순수한 핵산"은 하기 중 하나 또는 둘 다인 핵산이다: 상기 핵산이 유래한 유기체의 천연 발생 계능에서는 바로 인접해 있는 서열들, 예컨대, 암호화 서열들 (즉, 5' 말단에서 하나 및 3' 말단에서 하나) 중 하나 또는 둘 다에 바로 인접하지는 않은 것; 또는 상기 핵산이 유래한 유기체에서

함께 발생하는 핵산 서열을 실질적으로 결여한 것. 상기 용어에는, 예를 들어, 벡터, 예컨대, 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스 내로, 또는 원핵 생물 또는 진핵 생물의 게놈 DNA 내로 편입되거나, 또는 다른 DNA 서열들과 무관하게 별개의 분자 (예컨대, PCR 또는 제한효소 처리에 의해 생성된 cDNA 또는 게놈 DNA 절편) 로 존재하는 재조합 DNA 가 포함된다. 부가적으로, "단리된"이라는 용어는, "단리된 핵산 서열"에서와 같이 핵산과 관련하여 사용될 때, 그의 천연적 상태에서는 또는 그의 실제 원천으로부터 수득시에는 통상 결합되어 있는 적어도 하나의 오염 물질 핵산으로부터 분리된 동정된 핵산 서열을 지칭한다. 단리된 핵산은 자연에서 발견되는 것과는 상이한 형태 또는 상태로 존재하는 핵산이다. 이와 반대로, 단리되지 않은 핵산은 이들이 자연에서 존재하는 상태로 발견되는 핵산, 예컨대 DNA 및 RNA 이다. 예를 들어, 주어진 DNA 서열 (예컨대, 유전자) 은 숙주 세포 염색체 상에서 이웃하는 유전자들에 근접하게 발견되는데; 특정 단백질을 인코딩하는 특정 mRNA 서열과 같은 RNA 서열은 상기 세포 내에서 다수의 단백질들을 인코딩하는 다른 많은 mRNA 들과 함께 혼합물로서 발견된다. 그러나, 예를 들어, 서열번호:1 을 포함하는, 단리된 핵산 서열은, 예로써, 천연 세포에서와는 상이한 염색체 상의 또는 염색체 외부의 위치에 존재하거나, 또는 그렇지 않다면 자연에서 발견되는 것이 아닌 상이한 핵산 서열로 플랭킹(flanking)된, 서열번호:1 을 통상 포함하는 세포 내의 핵산 서열을 포함한다. 상기 단리된 핵산 서열은 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재할 수 있다. 단리된 핵산 서열을 단백질 발현에 이용하고자 하는 경우, 상기 핵산 서열은 (최소한) 센스 (sense) 또는 암호화 가닥의 적어도 일부를 포함할 것이다(즉, 상기 핵산 서열은 단일가닥일 수 있음). 다르게는, 이는 센스 및 안티-센스 가닥을 모두 포함할 수 있다(즉, 상기 핵산 서열은 이중가닥일 수 있음).

<45> 본원에 사용된 바, "상동성"은 두 폴리펩티드 분자 간의 또는 두 핵산 분자 간의 서열 유사성을 지칭한다. 두 비교되는 서열들 둘 다에서의 한 위치가 동일 염기 또는 아미노산 단량체 하위단위에 의해 점유되어 있는 경우, 예컨대, 두 DNA 분자 각각에서의 한 위치가 아데닌에 의해 점유되어 있는 경우, 상기 분자들은 상기 위치에서 상동이다. 두 서열 간의 상동성의 비율은 [(상기 두 서열에 의해 공유된 대응 또는 상동 위치들의 수) ÷ (비교된 위치들의 수) × 100] 의 함수이다. 예를 들어, 상기 두 서열의 위치들 중 10 개 중 6 개가 대응 또는 상동이라면, 상기 두 서열은 60 % 상동이다. 예로써, DNA 서열 ATTGCC 및 TATGGC 는 50 % 상동성이다. 일반적으로, 비교는, 두 서열을 최대 상동성이 나타나도록 정렬시킬 때 이루어진다.

<46> "펩티드(들)," "단백질(들)" 및 "폴리펩티드(들)"라는 용어들은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

<47> "프로테아제"라는 용어는 미생물, 예컨대, 진균, 세균으로부터, 또는 식물 또는 동물로부터 유래한 단백질 또는 폴리펩티드의 단백질 또는 폴리펩티드 도메인으로서, 단백질 골격의 다양한 위치 중 하나 이상에서의 펩티드 결합 절단을 촉매하는 능력을 가진 도메인을 의미한다.

<48> 바람직하게는, 본 발명에 따른 폴루라나아제 단백질은 단리된 또는 정제된 것이다. 정제 또는 단리란 상기 폴루라나아제를 자연에서는 이와 결합되어 있는 천연 발생 구성요소들의 일부 또는 전부로부터 분리시킴으로써 상기 폴루라나아제 단백질을 그의 자연적 상태에서부터 변경시키는 것을 의미한다. 이러한 단리 또는 정제는 최종 조성물에 바람직하지 않은 전세포 (whole cell), 세포 잔해물, 불순물, 외인성 단백질, 또는 효소를 제거하는 당업계에 인식되어 있는 분리 기법, 예컨대 이온 교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 소수성 분리, 투석, 프로테아제 처리, 암모늄 술페이트 침전법 또는 기타 단백질 염 침전법, 원심분리, 크기 배제 크로마토그래피, 여과, 정밀여과, 겔 전기영동 또는 분리에 의해 수행할 수 있다. 상기 폴루라나아제 함유 조성물에 부가적인 유익을 제공하는 구성요소들을 첨가하는 것이 추가로 가능한데, 이들에는 예를 들어, 활성화제, 항-저해제, 바람직한 이온, pH 를 조절하는 화합물 또는 기타 효소들이 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 폴루라나아제 단백질을 재조합 방법으로 생성한다.

<49> 본원에 사용된 바, "미생물"은 세균, 진균, 바이러스, 원생동물 및 기타 미생물 또는 극소형 유기체를 지칭한다. 본 발명에서, 미생물은 외인성 펩티드의 발현을 위한 숙주 유기체로 사용된다.

<50> 본원에 사용된 바, "유도체," "변형체" 또는 "변형 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질"은, 전구체 단백질 (예컨대, 본래의 단백질) 로부터 그의 C- 및 N-말단 말단 중 하나 또는 둘 다에 하나 이상의 아미노산을 첨가하거나, 그의 아미노산 서열 중의 상이한 부위들 중 하나 또는 다수에서 하나 이상의 아미노산을 치환하거나, 상기 단백질의 한 쪽 또는 양쪽 말단에서 또는 그의 아미노산 서열 중의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산을 결실시키거나, 또는 그의 아미노산 서열 중의 하나 이상의 부위에 하나 이상의 아미노산을 삽입하여 유도시킨 단백질을 의미한다. 폴루라나아제 유도체의 제조는 바람직하게는 그 본래의 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 변형시키고, 상기 DNA 서열을 적당한 숙주 내로 형질전환시키고, 상기 유도체 폴루라나아제를 형성하도록 상기 변형 DNA 서열을 발현시켜 수행된다. 본 발명의 "유도체"는 전구체 아미노산 서열 (예컨대, 아

생형 또는 본래 상태의 폴루라나아제) 과 비교할 때 변경된 아미노산 서열을 포함한 펩티드를 포함하는데, 이때 상기 펩티드는 전구체 폴루라나아제의 특징적인 폴루라나아제 성질을 보유하지만 일부 특정 측면에서는 변경된 특성들을 갖는다. 예를 들어, 폴루라나아제 유도체는 최적 pH, 효소적 분해 또는 기타 분해에 대한 저항성, 효소적 유효성, 온도 또는 산화적 안정성이 증가될 수 있지만, 그의 특징적인 효소적 변형 활성은 유지한다. 유사하게, 본 발명에 따른 유도체는, 그의 기질 결합 능력이 변경되도록 추가 또는 변형된 단백질 (또는 기타 기질) 결합 도메인을 포함한다. 발현된 폴루라나아제 유도체의 기능상의 활성이 유지되게 하는 폴루라나아제 유도체 인코딩 DNA 절편으로부터 본 발명에 따른 유도체를 유도하는 것이 고려된다. 유도체는 또한 상기 폴루라나아제의 특징들을 변화시키는 화학적 변형을 포함한다.

<51> 통상적으로, 폴루라나아제 유도체는 적어도 약 50 %, 70 % 또는 85 % 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 85 % 아미노산 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90 % 아미노산 서열 동일성, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95 % 아미노산 서열 동일성 및 추가로 더욱 바람직하게는 98 % 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 바람직하게는, 임의의 아미노산 치환은 L-아미노산을 사용하는 "보존적 아미노산 치환"인데, 이 때 하나의 아미노산은 또 다른 생물학적으로 유사한 아미노산으로 대체된다. 보존적 아미노산 치환은 치환되는 아미노산의 전체 전하, 소수성/친수성, 및/또는 입체 부피를 보존하는 치환이다. 보존적 치환의 예는 하기 군 중의 것들이다: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Lys/Arg, Asn/Gln, Glu/ Asp, Ser/Cys/Thr, 및 Phe/Trp/Tyr. 유도체는, 예를 들어, 1 내지 10 개 정도로 적은 아미노산 잔기, 예컨대 6-10 개, 5 개 정도로 적은, 4, 3, 2, 또는 심지어 1 개 정도로 적은 아미노산 잔기가 상이한 것일 수 있다. 본원의 표 1 은 당업계에 인식되어 있는 예시적인 아미노산 치환을 나타낸다.

<52> 본원에 사용된 바, 폴루라나아제의 "본래의 서열" 또는 폴루라나아제의 "야생형" 서열에는, 자연계의 모 균주로부터 유래한 폴루라나아제와 동일한 아미노산 서열 또는 상기 변형 또는 유래된 폴루라나아제가 만들어진 폴루라나아제, 예컨대, 본 발명의 모 균주 *B. 테라미피칸스* (BMP139) 에 의해 발현된 폴루라나아제와 동일한 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드가 포함된다. 상기와 같은 본래의 서열 폴루라나아제는 자연에서 단리한 것일 수 있고, 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 제조한 것일 수도 있다. "야생형" 또는 "본래의 서열" 폴루라나아제라는 용어는, 한 가지 구현예에서, 본 발명의 변형체가 유래된 폴루라나아제 펩티드를 지칭하며, 이는 도 7b 에 서열번호: 2 로 발견할 수 있다.

<53> 본원에 사용된 바, 본원에 나타낸 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열들에 대해 "서열 동일성 비율 (%)"은, 서열들을 정렬시키고, 필요할 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하기 위해 갭 (gap) 을 도입한 후의, 폴루라나아제 서열 내 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로 정의되며, 임의의 보존적 치환은 상기 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않는다. 서열 정렬 수행 및 서열 동일성 결정 방법은 당업자들에 공지되어 있으며, 과도한 실험없이 수행될 수 있는데, 동일성 값의 계산은 명확히 수득할 수 있다. 예를 들어, 하기를 참조할 수 있다: Ausubel, 등, eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York); 및 ALIGN 프로그램 (Dayhoff (1978), Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.)). 다수의 알고리즘이 서열 정렬 및 서열 동일성 결정에 이용가능하며, 예를 들어, 하기가 포함된다: Needleman 등 (1970) 의 상동성 정렬 알고리즘 [J. Mol. Biol. 48:443]; Smith 등 (1981) 의 국지적 상동성 알고리즘 [Adv. Appl. Math. 2:482]; Pearson 등 (1988) 의 유사성 검색 방법 [Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444]; Smith-Waterman 알고리즘 [Meth. Mol. Biol. 70:173-187 (1997)]; 및 BLASTP, BLASTN, 및 BLASTX 알고리즘 [Altschul, 등 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 참조]. 이들 알고리즘을 이용하는 컴퓨터 프로그램 또한 이용가능하며, 이들에 제한되는 것은 아니나 하기가 있다: ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어, 또는 WU-BLAST-2 (Altschul, 등, Meth. Enzym., 266:460-480 (1996)); 또는 Genetics Computing Group (GCG) 패키지, Version 8 (Madison, Wis., USA) 에서 이용가능한 GAP, BESTFIT, BLAST (Altschul, 등) (상기 참조), FASTA, 및 TFASTA; 및 Intelligenetics (Mountain View, Calif) 에 의한 PC/Gene 프로그램에서의 CLUSTAL. 당업자들은 비교되는 서열들의 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 알고리즘들을 포함하여, 정렬 측정을 위한 적절한 매개변수들을 결정할 수 있다. 바람직하게는, 상기 서열 동일성은 해당 프로그램에 의해 결정되는 기본 매개변수들을 사용하여 결정된다. 구체적으로, 서열 동일성은 하기 검색 매개변수들을 이용하여 아핀 갭 (affine gap) 검색을 사용하는 MSPRCH 프로그램 (Oxford Molecular) 에서 구현되는 Smith-Waterman 상동성 검색 알고리즘 (Meth. Mol. Biol. 70:173-187 (1997)) 으로 결정할 수 있다: 갭 개시 감점 12, 및 갭 신장 감점 1. 바람직하게는, 아미노산 쌍대 비교는 갭 가중치 (gap weight) 12 및 길이 가중치 (length weight) 2 로 하여 blosum62 아미노산 치환 매트릭스를 이용하여 Genetics Computer Group, Inc. (Madison, Wis.) 의 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램을 사용

하여 실시할 수 있다. 두 개의 아미노산 서열의 최적 정렬에 있어서, 상기 변형체 아미노산 서열의 연속적 단편은 기준 아미노산 서열에 대해 부가적인 아미노산 잔기 또는 결실된 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 상기 기준 아미노산 서열에 대한 비교에 사용되는 연속적 단편은 적어도 20 개의 연속적 아미노산 잔기를 포함할 것인데, 30, 40, 50, 또는 그 이상의 수의 아미노산 잔기일 수 있다. 상기 유도체의 아미노산 서열에서 겹이 포함된 것과 관련된 서열 동일성 증가는 겹 감점을 할당하여 보정할 수 있다.

<54> 본원에 사용된 바, "발현 구조체" (또는 "발현 벡터") 는 적당한 숙주에서 해당 DNA 의 발현에 영향을 미칠 수 있는 적당한 제어 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체를 의미한다. 이러한 제어 서열에는, 전사에 영향을 미치는 프로모터, 전사를 제어하는 임의적 작동유전자 서열, mRNA 상의 적당한 리보솜-결합 부위를 인코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열이 포함될 수 있다. 본 발명은 임의의 특정 발현 구조체의 사용에 제한되지 않는다. 상이한 세포 유형에는 바람직하게는 상이한 발현 벡터가 이용된다. 예를 들어, *바실러스 서브틸리스*에 사용되는 벡터용으로 바람직한 프로모터는 AprE 프로모터이고; *바실러스 테라미피칸스*에 사용되는 벡터용으로 바람직한 프로모터는 amyL 프로모터이고; *E. 콜리*에 사용되는 바람직한 프로모터는 Lac 프로모터이고, *사카로마이세스 세레비지에*에 사용되는 바람직한 프로모터는 PGK1 이고, *아스페르길루스 니게르*에 사용되는 바람직한 프로모터는 glaA 이고, *트리코더마 리이세이*용으로 바람직한 프로모터는 cbh1 이다. 상기 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 단순히 잠재적 게놈 삽입체일 수 있다.

<55> 적당한 숙주 내로 일단 형질전환(또는, 형질감염)되면, 상기 발현 구조체는 숙주 게놈과 무관하게 복제되어 기능할 수도 있고, 또는, 적당한 조건 하에서, 상기 게놈 자체 내로 통합될 수 있다. 본 명세서에서, "플라스미드," "벡터" 및 "발현 구조체(들)"이라는 용어들은 간혹 상호교환가능하게 사용된다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는, 당업계에 공지되어 있거나 공지되고 있는 다른 형태의 발현 벡터를 포함하는 것을 의도하였다. 즉, 폭넓은 다양한 숙주/발현 벡터 조합을 본 발명의 DNA 서열을 발현시키는데 이용할 수 있다.

본 명세서의 다른 곳에서 언급되지 않은 본 발명에 유용한 발현 벡터는, 예를 들어, 염색체 상의, 비(非)-염색체의 및 합성 DNA 서열의 단편들, 예컨대 각종의 공지된 SV40 유도체 및 공지된 세균 플라스미드, 예컨대, col E1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC 19 및 이들의 유도체를 포함하는 *E. 콜리*로부터의 플라스미드, 더욱 넓은 숙주 범위의 플라스미드, 예컨대, RP4, 파지 DNA, 예컨대, 다수의 파지 λ 유도체, 예컨대, NM989, 기타 DNA 파지, 예컨대, M13 및 섬유상 단일가닥 DNA 파지, 효모 플라스미드, 예컨대 2μ 플라스미드 또는 이의 유도체, 진핵 세포에 유용한 벡터, 예컨대 동물 세포에 유용한 벡터 및 플라스미드 및 파지 DNA 의 조합물에서 유래한 벡터, 예컨대 파지 DNA 또는 다른 발현 제어 서열을 이용하도록 변형된 플라스미드로 이루어질 수 있다.

<56> 본 발명의 발현 벡터를 이용하는 발현 기법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Sambrook, 등, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, SECOND EDITION, Cold Spring Harbor Press (1989)] 에 전반적으로 기술되어 있다. 종종, 본 발명의 DNA 서열이 포함된 이러한 발현 벡터를, 통합 사건을 통해 특정 생물종의 게놈 내로 직접 삽입함에 의해 단세포 숙주 내로 형질 전환시킨다(예컨대, 하기 참조: Bennett & Lasure, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego, pp. 70-76 (1991) 및 진균 숙주 내로의 표적화 게놈 삽입을 기술하는 이에 인용된 논문들).

<57> 본원에 사용된 바 "작동가능하게 연결된," "작동가능한 조합으로," 및 "작동가능한 상태로"라는 용어들은 핵산 서열들이 각자의 의도된 기능을 수행하도록 연결된 것을 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 서열을 관심 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결하는 것은, 상기 프로모터 서열이 관심 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 관심 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드의 합성을 지휘할 수 있도록 하는 방식으로 상기 프로모터 서열 및 관심 뉴클레오티드 서열을 연결하는 것을 지칭한다. 유사하게, 가령성 (age-related) 조절 활성을 가진 핵산 서열을 프로모터 서열 및 관심 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결하는 것은, 상기 가령성 조절 활성을 가진 핵산 서열이 관심 뉴클레오티드 서열의 mRNA 로의 전사 수준 및/또는 관심 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드의 합성 수준을 일정 시간 기간에 걸쳐 변경할 수 있도록 하는 방식으로 상기 가령성 조절 활성을 가진 핵산 서열, 프로모터 서열 및 관심 뉴클레오티드 서열을 연결하는 것을 의미한다.

<58> 본원에 사용된 바, "숙주 유기체," "숙주 균주" 또는 "숙주 세포"는 본 발명에 따른 DNA 를 포함한 발현 벡터에 대한 적당한 숙주를 의미한다. 본 발명에 유용한 숙주 세포는 일반적으로 원핵 또는 진핵 숙주로서, 여기에는 발현을 달성할 수 있는 임의의 형질전환가능한 미생물이 포함된다. 본 발명의 맥락에서, 예를 들어, 숙주 균주는 *바실러스 서브틸리스*, *바실러스 테라미피칸스*(또는 기타 *바실러스* 속), *에스캐리키아 콜리*, *트리코더마 리이세이*, *사카로마이세스 세레비지에* 또는 *아스페르길루스 니게르*일 수 있다. 숙주 세포는 재조합 DNA 기법으로 구축된 벡터로 형질전환 또는 형질감염될 수 있다. 이러한 형질전환된 숙주 세포는 플루라나아제

및 그의 유도체 또는 변형체 (변이체) 를 인코딩하는 백터를 복제할 수 있거나 또는 목적하는 펩티드 생성물을 발현할 수 있거나 또는 둘 다 가능한 것일 수 있다.

<59> "배양액" 또는 "배양 조건(들)"이라는 용어는 숙주 유기체 군집을 성장시키는 맥락에서 사용될 때, 숙주 유기체의 성장에 적합한 및, 본 발명의 뉴클레오티드 서열 및 이들의 변형체로 형질감염된 숙주 유기체의 경우, 본 발명의 폴루라나아제의 제조에 적합한 배양 용기, 배양 매질 및 배양 조건을 지칭한다. 본 발명은 전술한 것을 만족시키는 것인 한 임의의 특정 배양액 또는 배양 조건에 제한되지 않는다.

<60> 본원에 사용된 바, "기능적으로 부착된" 또는 "작동가능하게 연결된"이란, 조절 영역, 예컨대 프로모터, 종결자 (terminator), 분비 신호 또는 인핸서 영역이 구조 유전자에 부착 또는 연결되어 상기 유전자의 발현을 제어하는 것을 의미한다.

<61> 본원에 사용된 바, 미생물"로부터 유래한" 물질 (예컨대, 폴리뉴클레오티드 또는 단백질)이란, 상기 물질이 상기 미생물에 본래 존재하는 것을 의미한다.

<62> "트리코더마" 또는 "트리코더마 속"은 이전에 *트리코더마*로 분류된 또는 현재 *트리코더마*로 분류되는 임의의 진균 균주를 지칭한다. 바람직하게는 상기 종들은 *트리코더마 롱기브라키아툼* (*Trichoderma longibrachiatum*), *트리코더마 리이세이* 또는 *트리코더마 비리데* (*Trichoderma viride*) 이다. 본 발명에서, *트리코더마* 속은 본 발명에서 숙주 유기체로 사용될 수 있다.

<63> 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 한 가지 측면은 폴루라나아제 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 "실질적으로 순수한" (또는 재조합) 핵산 및/또는 이러한 핵산의 등가물을 특징으로 한다. 본원에 사용된 바 핵산이라는 용어는 절편 및 등가물을 포함할 수 있다. "등가물"이라는 용어는 기능상 등가인 폴리펩티드 또는 기능상 등가인 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 등가의 뉴클레오티드 서열에는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 상이한 서열들, 예컨대 대립유전자 변형체들이 포함될 것이며, 유전자 코드의 축퇴로 인해 서열번호: 1 에 나타낸 폴루라나아제의 뉴클레오티드 서열과 상이한 서열들이 포함될 것이다.

<64> 본 발명의 실시에서는, 다른 지시가 없는 한, 당업계의 기술에 속하는 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자이식 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학의 통상적인 기법이 이용될 것이다. 이러한 기법들은 문헌에 기술되어 있다. 본원에 인용된 모든 공개물, 특허 및 특허 출원들은 그들의 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조 병합된다. 예를 들어, 하기를 참조할 수 있다: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 제 2 판, Sambrook, Fritsch 및 Maniatis 편저 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volumes I 및 II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis 등, U.S. 특허 제 4,683,195 호; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); 논문, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller 및 M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vol. 154 및 155 (Wu, 등, eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer 및 Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir 및 C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986). 또한, 프로테아제의 제조, 발현, 단리 및 사용 방법에 관한 정보는 U.S. 특허 제 6,768,001 호를 살펴봄으로써 취득할 수 있는데, 이의 전문은 참조로서 본원에 포함된다.

<65> 본 발명의 기타 특징 및 이점들은 하기 상세한 설명 및 청구의 범위로부터 명백할 것이다.

<66> **상세한 설명**

<67> 본 발명을 이제 단지 참조로서 하기 정의 및 실시예를 사용하여 상세히 기술할 것이다. 본원에 언급된 모든 특허 및 공개물은, 이들에 개시된 모든 서열들을 포함하여 명백히 참조로서 포함된다.

<68> 본원에 다르게 정의되어 있지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속한 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Singleton, 등, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 제 2 판, John Wiley 및 Sons, New York (1994)], 및 [Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991)] 은 당업자에 본 발명에

사용된 용어들 중 다수에 대한 전반적인 사전을 제공한다. 본원에 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 수치 범위는 상기 범위를 한정하는 수를 포함한다. 다른 지시가 없는 한, 핵산은 5' 에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재되며; 아미노산 서열은 아미노에서 카르복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 기재된다. 실행자들은 당업계의 정의 및 용어에 대해, 특히 Sambrook 등 (1989) 및 Ausubel FM 등 (1993) 을 참조할 수 있다. 본 발명이 기술된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약들에 한정되지 않는데, 이는 이러한 것들이 다양할 수 있기 때문임은 자명할 것이다.

- <69> 수치 범위는 상기 범위를 한정하는 수를 포함한다.
- <70> 다른 지시가 없는 한, 핵산은 5' 에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기재되며; 아미노산 서열은 아미노에서 카르복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 기재된다.
- <71> 본원에 제시된 표제들은 본 명세서를 전체적으로 참조할 때 나타날 수 있는 본 발명의 다양한 측면 또는 구현예들을 제한하는 것이 아니다. 따라서, 바로 직후에 정의되는 용어들은 본 명세서를 전체적으로 참조할 때 좀 더 충분히 정의된다.
- <72> 분자 생물학
- <73> 한 가지 구현예에서 본 발명은 amyL 프로모터의 제어 하에서의 이중성 유전자들의 발현을 제공한다. 따라서, 본 발명은 재조합 유전학 분야의 일상적인 기법에 의존한다. 본 발명에서의 일반적인 사용 방법을 개시하는 기본적인 도서에는 하기가 있다: Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (제 2 판 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 및 Ausubel, 등, eds., Current Protocols in Molecular Biology (1994)).
- <74> 사상 진균의 셀룰라아제 유전자 프로모터 서열들을 포함하는 이중성 유전자들은 복제 및/또는 발현을 위해 트리코더마 리이세이 세포 내로 형질전환하기 전에 전형적으로 중간체 벡터 내로 클로닝된다. 이들 중간체 벡터는 전형적으로 원핵생물 벡터, 예컨대, 플라스미드, 또는 서틀 벡터이다.
- <75> 클로닝된 유전자를 고수준으로 발현시키기 위해, 상기 이중성 유전자를 바람직하게는 상기 프로모터로부터 천연 발생 셀룰라아제 유전자에서와 거의 같은 거리에 위치시킨다. 그러나, 당업계에 공지된 바와 같이, 프로모터 기능 손실을 일으키지 않으면서 상기 거리의 다소간 변동을 적합화할 수 있다.
- <76> 당업자들은 천연 프로모터를 기능의 변화없이 하나 이상의 뉴클레오티드를 대체, 치환, 부가 또는 제거하여 변형시킬 수 있다는 것을 인지하고 있다. 본 발명의 실시는 상기 프로모터에 대한 이러한 변경들을 모두 포함하나, 이들에 한정되지는 않는다.
- <77> 상기 발현 벡터/구조체는 전형적으로 이중성 서열의 발현에 필요한 모든 부가적인 요소들을 포함하는 전사 단위 또는 발현 카세트를 포함한다. 그러므로 전형적인 발현 카세트는 이중성 핵산 서열 및 전사물의 효율적인 폴리아데닐화에 필요한 신호에 작동가능하게 연결된 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 번역 종결을 포함한다. 상기 카세트의 부가적인 요소들에는 인헨서 및, 구조 유전자로 게놈 DNA 가 사용되는 경우, 기능적 스플라이싱 공여체 (splice donor) 및 수용체 부위를 가진 인트론이 포함될 수 있다.
- <78> 본 발명의 실시에 있어서 유전자 구조체에서의 프로모터의 선택이 한정되는 것은 아니다. 그러나, 예시적인 프로모터는 트리코더마 리이세이 cbh1, cbh2, eg1, eg2, eg3, eg5, xln1 및 xln2 프로모터이다.
- <79> 프로모터 서열 외에, 상기 발현 카세트는 또한 구조 유전자의 하류에 효율적인 종결을 제공하는 전사 종결 영역을 포함하여야 한다. 상기 종결 영역은 상기 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 수득한 것일 수 있고 또는 상이한 유전자들로부터 수득한 것일 수도 있다.
- <80> 임의의 진균 종결자도 본 발명에서 기능적일 가능성이 있지만, 바람직한 종결자로는 하기가 있다: *아스페르길루스 니둘란스* (*Aspergillus nidulans*) trpC 유전자로부터의 종결자 (Yelton, M. 등 (1984) PNAS USA 81 :1470-1474, Mullaney, E.J. 등 (1985) MGG 199:37-45), *아스페르길루스 아와모리* (*Aspergillus awamori*) 또는 *아스페르길루스 니케르* 글루코아밀라아제 유전자들 (Nunberg, J.H. 등 (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306, Boel, E. 등(1984) EMBO J. 3:1581-1585) 및 *무코르 미에헤이* (*Mucor miehei*) 카르복실 프로테아제 유전자 (EPO 공개공보 제 0 215 594 호).
- <81> 세포 내로 유전 정보를 전달하는데 사용되는 특정 발현 벡터는 특별히 중요한 것은 아니다. 진핵 또는 원핵

세포에서의 발현을 위해 사용되는 통상적인 벡터 중 임의의 것을 사용할 수 있다. 표준 세균 발현 벡터로는, 박테리오파지 λ 및 M13, 및 플라스미드, 예컨대 pBR322-기반 플라스미드, pSKF, pET23D, 및 융합 발현 시스템, 예컨대 MBP, GST, 및 LacZ 가 있다. 통상적인 단리 방법을 제공하는 에피토프 태그 (epitope tag) 를 또한 재조합 단백질에 부가할 수 있는데, 예컨대, c-myc 가 있다.

- <82> 발현 벡터에 전형적으로 포함되는 요소로는 또한 레플리콘, 재조합 플라스미드를 내포한 세균에 대한 선별을 허용하는 항생제 저항성을 인코딩하는 유전자, 및 이중성 서열의 삽입을 가능하게 하는 상기 플라스미드의 비필수 영역 내 특이적 제한효소 인식부위를 들 수 있다. 선택된 특정 항생제 저항성 유전자는 중요하지 않으며, 당업계에 공지된 다수의 저항성 유전자 중 어떠한 것이라도 적당하다. 원핵생물 서열은 바람직하게는 트리코더마 리이세이에서의 DNA 의 복제 또는 통합을 방해하지 않는 것으로 선택된다.
- <83> 본 발명의 형질전환 방법들은 형질전환 벡터의 전부 또는 일부를 사상 진균의 게놈 내로 안정적으로 통합시킬 수 있다. 그러나, 자가-복제하는 염색체 외부의 형질전환 벡터를 유지시키는 형질전환도 또한 고려된다.
- <84> 다량의 이중성 단백질을 발현하는 트리코더마 리이세이 세포주를 생성하는데 있어서 다수의 표준 형질감염 방법을 사용할 수 있다. 트리코더마의 셀룰라아제-생성 균주 내로 DNA 구조체를 도입하는 공개된 방법 중 일부로는 문헌 [Lorito, Hayes, DiPietro 및 Harman, 1993, Curr. Genet. 24: 349-356]; [Goldman, VanMontagu 및 Herrera-Estrella, 1990, Curr. Genet. 17:169-174]; [Penttila, Nevalainen, Ratto, Salminen 및 Knowles, 1987, Gene 6: 155-164] 이 있고, 아스페르길루스에 대한 것으로는, 문헌 [Yelton, Hamer 및 Timberlake, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474] 가 있고, 푸사리움 바자르 (Fusarium Bajar) 에 대한 것으로는, 문헌 [Podila 및 Kolattukudy, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8202-8212] 이 있고, 스트렙토마이세스 (Streptomyces) 에 대한 것으로는, 문헌 [Hopwood 등, 1985, The John Innes Foundation, Norwich, UK] 이 있고, 바실러스 브리기디 (Bacillus Brigidi) 에 대한 것으로는, 문헌 [DeRossi, Bertarini, Riccardi 및 Matteuzzi, 1990, FEMS Microbiol. Lett. 55: 135-138] 이 있다.
- <85> 그러나, 외래 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포 내로 도입하는 것에 대한 주지의 절차들 중 임의의 것이 사용가능하다. 이들에는, 인산칼슘 형질감염, 폴리브렌 (polybrene), 원형질체 융합, 전기천공, 유전자총 (biolistics), 리포솜, 미량주사법, 플라즈마 (plasma) 벡터, 바이러스 벡터 및 클로닝된 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 기타 외래 유전 물질을 숙주 세포 내로 도입하기 위한 주지된 기타 방법 중 임의의 것을 사용하는 것이 포함된다(예컨대, 상기 Sambrook 등 참조). U.S. 특허 제 6,255,115 호에 기재된 아그로박테리움-매개 형질감염 방법 또한 사용된다. 유일한 필수조건은 사용되는 특정 유전자 조작 절차가 해당 이중성 유전자를 발현시킬 수 있는 숙주 세포 내로 적어도 하나의 유전자를 성공적으로 도입할 수 있는 것이어야 한다는 것이다.
- <86> 본 발명은 또한 미생물에 의해 이중성으로 생성된 폴루라나아제에 관한 것이다. 적당한 세균의 예는 바실러스 서브틸리스, 바실러스 리케니포르미스, 바실러스 렌투스 (*Bacillus lentus*), 바실러스 브레비스 (*Bacillus brevis*), 바실러스 스테아로테르모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*), 바실러스 알칼로필러스 (*Bacillus alkalophilus*), 바실러스 아밀로리쿠에파시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실러스 코아굴란스 (*Bacillus coagulans*), 바실러스 키르쿨란스 (*Bacillus circulans*), 바실러스 라우투스 (*Bacillus lautus*), 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 바실러스 투링기엔시스 (*Bacillus thuringiensis*), 또는 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*) 또는 스트렙토마이세스 무리너스 (*Streptomyces murinus*) 와 같은 그람 양성 세균, 또는 *E. 콜리*와 같은 그람 음성 세균이다. 상기 세균의 형질전환은, 예를 들어, 원형질체 형질전환으로 또는 적격 세포 (competent cell) 를 사용하여 그 자체 공지된 방식으로 실시할 수 있다.
- <87> 전반적으로, 본 발명은 숙주 세포 내로 형질전환된 발현 시스템에 편입된 DNA 를 발현시킴으로써 폴루라나아제를 생성하는 방법을 포함한다. 폭넓은 다양한 숙주/발현 벡터 조합이 본 발명의 DNA 서열을 발현시키는데 이용될 수 있다. 다수의 원핵 및 진핵생물 발현 벡터가 시중에서 입수가능하다. 적절한 발현 벡터를 선택하는 것은 당업자들의 지식에 속한다. 상기 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 단순히 잠재적 게놈 삽입체일 수 있다. 상기 벡터는 일단 적당한 숙주 내로 형질전환되면, 숙주 게놈과 무관하게 복제 및 기능할 수 있고, 또는 일부 경우 상기 게놈 자체 내로 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 가장 흔히 사용되는 벡터 형태이므로, 본 명세서에서는, 플라스미드 및 벡터가 간혹 상호교환가능하게 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 공지되어 있거나 공지되고 있는 동등한 기능을 제공하는 다른 형태의 발현 벡터를 포함시키는 것을 의도한다. 유용한 발현 벡터로는, 예를 들어, 염색체, 비(非)-염색체 및 합성 DNA 서열들의 단편, 예컨대 상기 목적으로 유용한 각종 공지된 플라스미드 및 파지를 들 수 있다. 또한, 폭넓은 다양한 발현 제어 서열 중 어떠한 것이라도 일반적으로 이들 벡터에 사용된다.

- <88> 본 발명에 유용한 숙주 세포는 일반적으로, 본 발명에 따른 폴루라나아제의 발현이 이루어질 수 있는 임의의 형질전환가능한 미생물을 포함하는, 원핵생물 또는 진핵생물 숙주이다. 숙주 세포는 재조합 DNA 기법을 사용하여 구축된 벡터로 형질전환 또는 형질감염된다. 이러한 형질전환된 숙주 세포는 폴루라나아제 및 그의 변형체(변이체)를 인코딩하는 벡터를 복제하거나 또는 상기 목적 폴루라나아제를 발현할 수 있다. 이들 숙주에는 주지의 진핵 및 원핵생물 숙주, 예컨대 *E. 콜리*, *슈도모나스(Pseudomonas)*, *바실러스*, *스트렙토마이세스*, 각종 진균, 효모 및 동물 세포 계통이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 상기 숙주는 정제 및 후기 단계의 가공을 용이하게 하도록 본 발명의 폴루라나아제를 세포외로 발현하는 것이다.
- <89> 일부 구현예에서, 상기 숙주 세포는 *바실러스* 속의 구성원인 반면, 일부 구현예에서는, 관심 *바실러스* 균주는 공업용 *바실러스* 균주이다. 공업용 *바실러스* 균주의 예로서는, 이들에 제한되는 것은 아니나, *B. 리케니포르미스*, *B. 서브틸리스*, *B. 렌투스*, *B. 아밀로리쿠에파시엔스*를 들 수 있다. 부가적인 구현예에서, 상기 *바실러스* 숙주 균주는 *B. 렌투스*, *B. 브레비스*, *B. 스테아로테르모필러스*, *B. 알칼로필러스*, *B. 코아굴란스*, *B. 키르쿨란스*, *B. 푸밀러스*, *B. 투링기엔시스*, *B. 클라우시이*, 및 *B. 메가테리움*, 및 상기 논의한 바와 같은 *바실러스* 속에 속하는 기타 유기체로 이루어진 균으로부터 선택된다. 일부 구현예에서는, *B. 서브틸리스*가 사용된다. 다른 구현예에서는, *B. 리케니포르미스*가 사용된다. 예를 들어, U.S. 특허 제 5,264,366 호 및 4,760,025 호 (RE34,606), 및 US2002/0182734 (국제 공개번호 제 WO 02/14490 호) 에는 본 발명에서 사용되는 각종 *바실러스* 숙주 균주가 기재되어 있으나, 다른 적당한 균주도 본 발명에서의 사용에 고려된다. 바람직하게는, 프로테아제 음성 *바실러스* 균주 (유전자 결실된 것, 예컨대, 특히 Δapr 또는 Δnpr) 가 사용된다.
- <90> *바실러스* 종의 형질전환에 있어서 다양한 방법이 공지되어 있다. 실제로, 플라스미드 구조체를 포함하는 *바실러스* 염색체 변경 및 상기 플라스미드의 *E. 콜리* 내로의 형질전환을 방법들이 주지되어 있다. 대부분의 방법들에서, 플라스미드를 이어서 *E. 콜리*로부터 단리하여 *바실러스* 내로 형질전환시킨다. 그러나, *E. 콜리* 와 같은 이러한 중개 미생물을 사용하는 것이 필수적인 것은 아니며, 일부 구현예에서는, 상기 DNA 구조체를 원형질체 또는 적격 세포 형질전환을 통해 적격 *바실러스* 숙주 내로 직접 형질전환시킨다. 본 발명의 변이체 폴루라나아제의 발현 및 정제는 상기와 같은 방법들을 실시하기 위한 당업계-인식된 수단들을 통해 실시할 수 있다.
- <91> 발현 벡터를 세포 내로 도입한 후, 형질감염된 세포를 프로테아제 유전자 프로모터 서열의 제어 하에 유전자들의 발현에 유리한 조건 하에서 배양한다. 하기 실시예에 기술된 바와 같이 다수의 회분의 형질전환된 세포들을 배양할 수 있다. 마지막으로, 표준 기법들을 사용하여 상기 배양액으로부터 생성물을 회수한다.
- <92> 즉, 여기서 본 발명은 천연 발생 아밀라아제 유전자, 융합 DNA 서열, 및 각종 이중성 구조체를 포함하는 유전자 프로모터 서열들의 제어 하에 발현되는 목적 폴리펩티드의 발현 및 강화된 분비를 제공한다. 본 발명은 또한 이러한 목적 폴리펩티드를 고수준으로 발현 및 분비하는 방법을 제공한다.
- <93> 단백질 발현
- <94> 본 발명의 단백질은 아밀라아제 유전자 프로모터 서열들의 제어 하에 발현되는 유전자들이 포함된 발현 벡터로 형질전환된 세포들을 배양함으로써 생성된다. 본 발명은 단백질의 세포내 및/또는 세포외 생성을 강화시키는데 특히 유용하다. 상기 단백질은 상동성 또는 이중성일 수 있다. 본 발명에 의해 생성할 수 있는 단백질에는, 이들에 제한되는 것은 아니나, 호르몬, 효소, 성장 인자, 사이토킨, 항체 등이 있다.
- <95> 효소에는, 이들에 제한되는 것은 아니나, 히드롤라제, 예컨대 프로테아제, 에스테라아제, 리파아제, 페놀 산화 효소, 투과효소 (permease), 아밀라아제, 폴루라나아제, 셀룰라아제, 글루코오스 이성질화효소, 라카아제 및 단백질 이황화물 이성질화효소가 있다.
- <96> 상기 유전자들의 발현에 적절한 조건들은 상기 배양액에 유도 공급 조성물 (inducing feed composition) 을 제공하는 것을 포함한다(예를 들어, US-2004-0121446 참조). 상기 단백질들의 생성에 최적의 조건들은 숙주 세포의 선택, 및 발현시킬 단백질에 대한 선택에 따라 다양할 것이다. 당업자는 일상적인 실험 또는 최적화를 통해 이러한 조건들을 용이하게 확정할 것이다.
- <97> 관심 단백질, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 폴루라나아제는 전형적으로는 발현 후 정제 또는 단리된다. 관심 단백질은 표본에 어떤 다른 성분들이 존재하는지에 따라 당업자들에 공지된 다양한 방식으로 단리 또는 정제될 수 있다. 표준 정제 방법에는 전기영동, 분자적, 면역학적 및 크로마토그래피적 기법 (이온 교환, 소수성, 친화, 및 역상 HPLC 크로마토그래피 포함) 및 크로마토포커싱이 있다. 예를 들어, 관심 단백질은 표준 항-관심 단백질 항체 컬럼을 사용하여 정제할 수 있다. 단백질 농축과 결합된 초여과 및 정용여과 기

법이 또한 유용하다. 적당한 정제 기법에 대한 일반적인 지침을 위해서는, 문헌 [Scopes, Protein Purification (1982)] 을 참조할 수 있다. 필요한 정제의 정도는 관심 단백질의 사용에 따라 다양할 것이다. 일부 경우 정제가 필요하지 않을 것이다.

<98> 본 발명의 폴루라나아제의 유사체

<99> 유사체는 아미노산 서열에 있어서 또는 서열과 관련되지 않은 방식으로, 또는 둘 다로 "야생형" 모 폴루라나아제 또는 천연 발생 폴루라나아제와 상이할 수 있다. 비(非)-서열 변형에는, 폴루라나아제에 대한 생체내 또는 시험관내 화학적 유도체화가 포함된다. 비(非)-서열 변형으로는 아세틸화, 메틸화, 인산화, 카르복실화, 또는 글리코실화에서의 변화를 들 수 있다.

<100> 바람직한 유사체에는 폴루라나아제의 생물학적 활성을 없애버리지 않는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환 또는 하나 이상의 비(非)-보존적 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입에 의해 "야생형" 서열 또는 천연 서열과 상이하게 된 서열을 가진 폴루라나아제 (또는 이의 생물학적으로 활성인 절편) 가 포함된다. 보존적 치환에는 전형적으로 유사한 특징들을 가진 하나의 아미노산의 또 다른 것에 대한 치환, 예컨대, 하기 군 내에서의 치환이 포함된다: 발린, 글리신; 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신.

<101> 보존적 치환은, 예를 들어 아미노산에 대한 일반적으로 인정되는 벤 다이어그램 (Venn diagram) 분류를 기술하는 하기 표에 따라 이루어질 수 있다.

표 1

집합		하위-집합	
소수성	FWYHKMILVAGC	방향족	FWYH
		지방족	ILV
극성	WYHKREDCSTNQ	하전된 것	HKRED
		양으로 하전된 것	HKR
		음으로 하전된 것	ED
소형	VCAGSPTND	매우 작은 것	AGS

<102>

<103> 하기 표로부터 다른 보존적 치환들을 취할 수 있다.

표 2

보존적 아미노산 대체

하기 아미노산에 대해	코드	하기 중 임의의 것으로 대체
알라닌	A	D-Ala, Gly, 베타-Ala, L-Cys, D-Cys
아르기닌	R	D-Arg, Lys, D-Lys, 호모-Arg, D-호모-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
아스파라긴	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
아스파르트산	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
시스테인	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
글루타민	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
글루탐산	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
글리신	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala Acp
이소류신	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
류신	L	D-Leu, Val, D-Val, Ile, D-Ile, Met, D-Met
리신	K	D-Lys, Arg, D-Arg, 호모-Arg, D-호모-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
메티오닌	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
페닐알라닌	F	D-Phe, Tyr, D-Tyr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, 트랜스-3,4, 또는 5-페닐프롤린, 시스-3,4, 또는 5-페닐프롤린
프롤린	P	D-Pro, L-I-티오아졸리딘-4-카복실산, D-또는 L-1- 옥사졸리딘-4-카복실산
세린	S	D-Ser, Thr, D-Thr, 알로-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
트레오닌	T	D-Thr, Ser, D-Ser, 알로-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
티로신	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
발린	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

<104>

<105>

본 발명에 속하는 다른 유사체들은 펩티드 안정성을 증가시키는 변형을 가진 것들이며; 이러한 유사체들은 펩티드 서열 내에, 예를 들어, (해당 펩티드 결합을 대체하는) 하나 이상의 비(非)-펩티드 결합을 포함할 수 있다. 또한 하기가 포함된다: 천연 발생 L-아미노산 이외의 잔기, 예컨대, D-아미노산 또는 비(非)-천연 발생 또는 합성 아미노산을 포함하는 유사체, 예컨대, α 또는 β 아미노산 유사체 및 고리형 유사체.

<106>

기타 구현예

<107>

본 발명에는 하기가 포함된다: 대립유전자 변이; 천연 변이체; 유도성 변이체; 고도 또는 낮은 엄격성 조건 하에서 서열번호: 1 의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 혼성화하는 DNA 에 의해 인코딩되는 단백질 (고도 및 낮은 엄격성의 정의에 대해서는 하기 참조: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, 6.3.1 - 6.3.6, 이는 참조로서 본원에 포함됨); 및 항혈청에 의해 폴루라나아제에, 특별히 항혈청에 의해 폴루라나아제의 활성 부위 또는 결합 도메인에 특이적으로 결합되는 폴리펩티드.

<108>

본 발명의 핵산 및 폴리펩티드에는, 개시된 서열 중에 서열 분석 오류로 인해 본원에 개시된 서열과 상이한 것들이 포함된다.

<109>

본 발명에는 또한 폴루라나아제의 절편, 바람직하게는 생물학적으로 활성인 절편 또는 유사체가 포함된다. 생물학적으로 활성인 절편 또는 유사체는 서열번호: 2, 4 및 6 에 나타난 폴루라나아제 또는 다른 천연 발생 폴루라나아제 특유의 임의의 생체내 또는 시험관내 활성, 예컨대, 본원에 기재된 생물학적 활성 중 하나 이상을 가진 것이다. 특별히 바람직한 것은 생체내에 존재하는 절편, 예컨대, 전사후 가공으로부터 비롯된 또는 다르게 스플라이싱된 RNA 의 번역으로부터 비롯된 절편이다. 절편에는, 예컨대, 번역후 가공의 결과로서, 예

컨대, 아미노-말단 신호 서열의 제거의 결과로서, 본래의 또는 내인성 세포에서 발현된 것들 및 발현 시스템에서, 예컨대, CHO 세포에서 만들어진 것들이 포함된다. 특히 바람직한 절편은 단백질 분해 절단 또는 대안적인 스플라이싱 사건에 의해 생성된 절편, 예컨대, 활성인 절편이다. 폴루라나아제와 같은 펩티드는 종종 일정 범위의 생리학적 특성을 나타내며 또한 상기와 같은 특성들은 상기 분자의 상이한 부분들에 기인한 것일 수 있기 때문에, 유용한 폴루라나아제 절편 또는 폴루라나아제 유사체는 폴루라나아제 활성에 대한 임의의 생물학적 검정에서 생물학적 활성을 나타내는 것이다. 가장 바람직하게는 상기 절편 또는 유사체는 임의의 생체내 또는 시험관내 폴루라나아제 검정에서 폴루라나아제 (서열번호: 2, 4 및 6) 의 활성의 10%, 40%, 60%, 70%, 80% 또는 적어도 90% 를 지닌다. 이러한 폴루라나아제의 유사체를 제조하는 한 가지 방법에는, 하기 논의되는 바와 같은, 방향성 분자 진화에 의한 폴루라나아제 유사체의 합성이 포함된다.

<110> 폴루라나아제의 절편은 당업자들에 공지된 방법에 의해 생성할 수 있다. 후보 절편에 있어서 폴루라나아제의 생물학적 활성을 나타내는 능력은 본원에 기재된 바와 같은 당업자들에 공지된 방법들로 평가할 수 있다. 또한 상기 펩티드의 생물학적 활성에 필요하지 않은 잔기들 또는 대안적인 mRNA 스플라이싱 또는 대안적인 단백질 가공 사건들로부터 야기된 잔기들을 포함하는 폴루라나아제 펩티드도 포함된다.

<111> 폴루라나아제 펩티드를 수득하기 위해, 폴루라나아제-인코딩 DNA 를 발현 벡터 내로 도입하고, 상기 벡터를 상기 목적 단백질의 발현에 적당한 세포 내로 도입하고, 상기 펩티드를 회수 및 정제하는 것을 선행 기술 방법에 의해 할 수 있다. 상기 펩티드 및 단백질들에 대한 항체는, 선행 기술 방법에 의해 동물, 예컨대, 토끼 또는 마우스를 면역화하고, 항-폴루라나아제 항체를 회수함으로써 제조할 수 있다.

<112> **본 발명의 산업적 응용**

<113> 본 발명은, 본원에 고찰된 바와 같이, 산업에서 다수의 실제적 응용을 갖는데, 본원에서의 기재는 예시적이고 비(非)-포괄적인 것으로 의도된 것이다.

<114> 몇몇 구현예들에서, 본 발명은 에탄올 제조, 제빵, 과일 주스 제조, 양조, 증류, 포도주 양조, 가죽 제품, 오일 및 지방류, 종이 및 펄프 및 동물 사료 제조에서의 사용을 고찰하였다.

<115> 다른 구현예들에서, 본 발명은 세제 및 세정 제품의 활성 "생물학적" 성분으로서의 사용을 고찰하였다. 여기서, 프로테아제, 아밀라아제 및 리파아제는 단백질, 전분 및 지방성 얼룩을 분해시키기 위해 사용된다. 본 발명의 구현예에는, 안정성 연구 수행에 의해 세제 성분들에 대한 효소의 상용성을 시험하고, 다양한 제형물 중에서 이들을 시험하는 것이 포함된다.

<116> 또 다른 구현예에서, 본 발명은 식물 산업에서, 주로는 패브릭 및 의류의 가공에서의 사용을 고찰하였다. 주요한 응용으로는 하기가 있다: 발호 (desizing), 제직 (weaving) 후 패브릭 내의 실로부터 사이즈 (size) 제거 (즉, 섬유의 강성 (stiff) 요소 제거). 필링 (pilling) 경향을 감소시키고 패브릭에 더욱 매끄럽고 광택 있는 외관을 제공하는 감량유연 가공 (Bio-polishing-a process). 마모된 외관 (worn look) 을 이룩하기 위한 데님의 스톤워싱 (stonewashing) 에 사용되는 종래의 부석 (pumice stone) 을 소 용량의 효소로 대체할 수 있는 연화 가공 (Bio-stoning-a process).

<117> 또 다른 구현예에서, 본 발명은 전분의 포도당으로의 액화 (liquefaction) 및 당화 (saccharification) 및 과당으로의 이성질화를 위한 효소적 사용을 고찰하였다. 본 발명은 다량의 옥수수 및 기타 곡물을 고과당 옥수수 시럽 및 맥아당 시럽과 같은 감미제로 전환시키는데 사용될 수 있다.

실시예

<118> 하기 실험 개시에서, 하기 약어들이 적용된다: eq (등가물); M (몰농도); μM (마이크로몰농도); N (노르말농도); mol (몰); mmol (밀리몰); μmol (마이크로몰); nmol (나노몰); g (그램); mg (밀리그램); kg (킬로그램); μg (마이크로그램); L (리터); ml (밀리리터); μl (마이크로리터); cm (센티미터); mm (밀리미터); μm (마이크로미터); nm (나노미터); °C (섭씨 도); h (시간); min (분); sec (초); msec (밀리세컨드); TLC (박층 크로마토그래피); nt (뉴클레오티드); Q (글루타민); E (글루탐산); CAP (클로로암페니콜).

<119> 본 발명을 하기 실시예에서 더욱 상세하게 설명하나, 상기 실시예는 청구된 본 발명의 영역을 어떤 식으로든 제한하도록 의도된 것이 아니다. 첨부된 도면은 본 발명의 명세 및 상세한 설명의 필수적 부분으로 간주되도록 의도하였다. 인용된 모든 참조문헌들은 본원에 기재된 모든 것에 대한 참조로서 명백히 본원에 포함된다. 하기 실시예는 설명을 위해 제공되는 것으로, 청구된 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.

<120>

실시에 1

<121>

플루라나아제 변형체의 설계

<122>

하기 플루라나아제 변형체들을 설계하였다(도 1 참조).

<123>

"PUL" 이는 BMP139 에 의해 발현되는 분자와 동일한 '야생형' *B. 테라미피칸스* 플루라나아제이다. 상기 유전자는 코돈-최적화되었고, amyL (LAT) 프로모터로 구동되며, amyL 신호 서열을 갖는다. 상기 구조체와 BMP139 에 존재하는 것 사이의 차이점은 하기와 같다(도 2 참조). 첫째로, 상기 새로운 구조체는 BMP139 내의 본래의 암호화 서열과 비교하여 코돈-최적화된 암호화 영역을 갖는다. 둘째로, 상기 새로운 구조체는 100 nt 의 더 짧은 amyL 프로모터 영역을 갖는데, BMP139 에서는 대략 800 nt 이다. 셋째로, 상기 새로운 구조체는 amyL 종결자를 갖는 반면, BMP139 는 *B. 테라미피칸스* 플루라나아제 종결자를 갖는다. 상기 새로운 및 종래의 구조체 모두 amyL 신호 서열을 가지며, 동일한 플루라나아제 분자를 발현한다. 상기 새로운 구조체에 의해 발현되는 분자가 현재의 생성물과 동일하지만, 코돈 최적화의 결과로서 생산 역가에 있어서 유익이 있을 수 있다.

<124>

"PULm104" 이는 N-말단의 104 개 아미노산이 결실된 *B. 테라미피칸스* 플루라나아제이다. 상기 구조체는 amyL 프로모터, amyL 신호 서열, 성숙 플루라나아제의 N-말단 104 개 아미노산을 인코딩하는 서열을 결여한 코돈-최적화된 플루라나아제 암호화 영역, 및 amyL 종결자를 포함한다. 당해 절단된 플루라나아제 PULm104 는 전장 플루라나아제의 E99 및 E103 을 N-말단으로 클리핑할 때 생성되는 PULm98 및 PULm102 분자들과 유사하다. 상기 플루라나아제를 아미노산 104 까지 결실시킨 이유는 amyL 신호 서열과 플루라나아제 서열 간의 이상적인 신호 펩티다아제 표적 공통 서열인 ASA-A 를 수득하기 위해서였다. 당해 절단된 플루라나아제 변형체에 대한 이론적 배경은 전장 분자와 비교하여 상기 클리핑된 플루라나아제 변형체에서 더욱 고도의 특이적 활성이 나타났다는 이전의 놀라운 발견을 따른다.

<125>

"PUL_E99Q_E103Q" 이는, 플루라나아제 분자를 E99 및 E103 에서의 클리핑에 저항성있게 하기 위해 E99 및 E103 에서의 프로테아제 표적 모티프(motif)들을 Q99 및 Q103 으로 변형시킨 *B. 테라미피칸스* 플루라나아제이다. 나아가, 플루라나아제의 51 h 후 분해가 E99 및 E103 에서의 초기 클리핑에 좌우되는 경우, 상기 변형은 51 h 후의 분해 및 활성 저하를 방지할 것으로 기대된다.

<126>

실시에 2

<127>

플라스미드의 구축 및 형질전환

<128>

2 개의 코돈-최적화된 플루라나아제 구조체를 합성하였는데, 하나는 '야생형' 플루라나아제 단백질을 인코딩하는 것이고, 다른 하나는 E99Q_E103Q 변형체를 인코딩하는 것이다.

<129>

둘 다 57 개 뉴클레오티드의 amyL 프로모터 (*E. 콜리*에서의 클로닝을 가능하게 하는 것으로 이전에 증명됨; 더 긴 프로모터 스트레치(strech)들은 치사적임), amyL 신호 서열, 코돈-최적화된 플루라나아제 (변형체) 서열, 및 amyL 종결자를 모두 포함하였다. 이들 구조체들은 상기 기술한 3 가지의 플루라나아제 구조체들의 PCR-구축을 위한 주형으로 기능하였다:

<130>

"PUL" 합성 '야생형' 플루라나아제 구조체로부터 '야생형' 플루라나아제 구조체를 증폭하기 위해 하기 프라이머들을 사용하였다(*XhoI* 부위는 볼드체로 표시):

Plat5-XhoI_FW:

ccccgcctcgaggctttcttttgaagaaaatatagggaatggtacttgtaaaaattcggaatattatacaatatcatatgt

<131>

ttacattgaaagggg [서열번호: 7].

<132>

Tlat-XhoI_RV: tggaatctcgaggtttatcctttaccttctcc [서열번호: 8].

<133>

"PULm104" 상기 절단된 플루라나아제를 위한 발현 카세트를 융합 PCR 로 생성하였다. 상기 합성 '야생형' 플루라나아제 구조체로부터 하기 두 절편을 증폭시킨 후, 이어서 융합시켰다:

<134>

amyL 프로모터 및 amyL 신호 서열을 포함하는 절편.

<135>

상기 절단된 플루라나아제 암호화 서열 및 amyL 종결자를 포함하는 절편.

- <136> Ad A)
- <137> amyL 프로모터 및 신호 서열의 증폭을 위해서는 하기 프라이머들을 사용하였다:
- <138> Plat5-XhoI_FW [서열번호: 7] (상기 참조).
- <139> **ssLAT-PULm104_RV: gcgttgctgactgccggtttagcagctgctgaagctgcagaatgaggcagc [서열번호:9]**
- <140> (융합 프라이머; 코돈 105 에서 시작하는 역 폴루라나아제 서열은 볼드체로 표시).
- <141> Ad B)
- <142> 폴루라나아제 암호화 서열 및 amyL 종결자의 증폭을 위해서는 하기 프라이머들을 사용하였다:
- <143> **ssLAT-PULm104_FW: gctgcctcattctgcagcttcagcagctgctaaaccggcagtcagcaacgc [서열번호:10]**
- <144> (융합 프라이머; 코돈 105 에서 시작하는 폴루라나아제 서열은 볼드체로 표시). Tlat-XhoI_RV: [서열번호: 8] (상기 참조).
- <145> 상기 융합 프라이머들은 각각 주형 서열 (N-말단 104 개 아미노산을 나타냄) 에서 독특한 312 nt 인 2 개의 서열 스트레치들을 포함한다. A) 및 B) 하에 기재된 상기 두 PCR 절편들을 Plat5-XhoI_FW 및 Tlat-XhoI_RV 프라이머들을 사용한 PCR 반응으로 융합시켰다.
- <146> "PUL_E99Q_E103Q" E99Q_E103Q 폴루라나아제 변형체의 구축은 주형으로서 E99Q_E103Q 합성 구조체를 사용하여 '야생형' 폴루라나아제 구조체의 구축과 동일하게 하였다(상기 1 참조).
- <147> 생성된 절편들을 *B. 리케니포르미스* 삽입 벡터 pICatH 의 XhoI 부위 내로 두 방향으로 클로닝하였다(도 3). 그 결과, 하기 6 개의 구조체가 생성되었다: pICatH-PUL-Ori1 (도 4), pICatH-PUL-Ori2, pICatH-PULm104-Ori1 (도 5), pICatH-PULm104-Ori2, pICatH-PUL_E99Q_E103Q-Ori1 (도 6), 및 pICatH-PUL_E99Q_E103Q-Ori2.
- <148> 상기 Ori1 및 Ori2 구조체들은 클로람페니콜-저항성 (catH) 유전자에 대해 폴루라나아제 유전자의 반대 정위를 갖는다. 도 4(a), 5(a) 및 6(a) 는 상기 세 가지 Ori1 구조체들의 플라스미드 지도를 나타낸다.
- <149> 6 개 구조체 모두를 *B. 서브틸리스* 내로 형질전환시키고, AZCL-폴루란 (Megazyme) 중층 (overlay) (100 mM NaAc pH 5 중 0.1 %, 1% 한천) 중에 할로 (halo) 형성한 것을 스크리닝하였다. pICatH-PULm104 형질전환체들은 양 전장 폴루라나아제의 형질전환체들보다 더 큰 할로를 생성하였다. 구조체들을 서열 확인하고, 원형질체 형질전환을 이용하여 *B. 리케니포르미스* 숙주 균주들인 BML612 및 BML780 내로 형질전환시켰다.

실시예 3

***B. 리케니포르미스* 게놈 내로의 통합**

- <152> 형질전환 후, 형질전환체들을 5 µg/ml 클로람페니콜 및 10 µg/ml 네오마이신이 함유된 최소 재생성 (regeneration) 플레이트 상에서 선별하였다. 형질전환체들을 동일 항생제가 함유된 2 개의 Heart Infusion-한천 플레이트 (당업자들에 공지된 것) 에 평판복제 (replica-plating) 하였는데, 이 중 하나에는 폴루라나아제 양성 형질전환체를 선별하기 위해 AZCL-폴루란을 덧칠하였다. *B. 서브틸리스*에서의 상황과 유사하게, PULm104 형질전환체들은 가장 큰 할로를 나타내었다. 플라스미드들은 *B. 리케니포르미스* 염색체 상의 catH 좌위 내로 통합되었다. 즉, 표 3 에 나타낸 바와 같은 하기 통합체 세트에 대해 절제 (excision) / 증폭을 추가로 수행하였다:

표 3

BML612 PUL Ori1
BML612 PUL Ori2
BML612 PULm104 Ori1
BML612 PULm104 Ori2
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori1
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori2
BML780 PUL Ori1
BML780 PUL Ori2
BML780 PULm104 Ori1
BML780 PULm104 Ori2
BML780 PUL_E99Q_E103Q Ori1
BML780 PUL_E99Q_E103Q Ori2

<153>

<154>

플라스미드 절제 및 카세트 증폭은 하기와 같이 수행하였다. 염색체 내에 통합된 catH - 폴루라나아제 발현 카세트만을 남겨두는 벡터 서열의 절제 ('루프-아웃(loop-out)') 를 통해 외래 DNA 를 갖지 않은 균주 ("면제(exempt) 균주") 를 획득하였다. 그 후 상기 균주에 대해 클로람페니콜 농도를 순차적으로 증가시켜(5, 25, 50, 75 µg/ml), 상기 발현 카세트를 증폭시켰다. 각 증폭 단계 후 복제 평판들에 AZCL-폴루란을 덧칠하여 폴루라나아제 생성을 모니터링하였다. 각 균주에 대해, 4 가지 증폭 수준이 획득되었다: CAP5, CAP25, CAP50 및 CAP75.

<155>

실시예 4

<156>

B. 리케니포르미스 폴루라나아제 균주에 대한 평가

<157>

균주들을 모든 증폭 수준들에 대해 2 개씩 골라내어 5 µg/ml 클로람페니콜이 함유된 단일 대형 Heart Infusion-한천 플레이트에 두고, 37 °C 에서 하룻밤 배양하였다. 폴루라나아제 생성 균주 BMP139 를 기준으로 포함시켰다. 상기 플레이트에 AZCL-폴루란 한천을 덧발라 폴루라나아제 활성을 가시화하였다. 상기 증충을 37 °C 에서 8h 인큐베이션한 후, 실온에서 16h 인큐베이션하였다. 결과는 하기 표 4 에 요약되어 있다.

표 4

균주	CAP5	CAP25	CAP50	CAP75	
BML612 PUL Ori1	+	+	+	++	
BML612 PUL Ori2	+	+	+	++	
BML612 PULm104 Ori1	+	++	++	+++	
BML612 PULm104 Ori2	+	+	+++	+++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori1	+	+	++	++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori2	+	+	++	++	
BML780 PUL Ori1	+	+	+	++	
BML780 PUL Ori2	+	+	++	++	
BML780 PULm104 Ori1	++	++	+++	+++++	
BML780 PULm104 Ori2	++	++	+++	+++++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori1	++	++	++	++	
BML612 PUL_E99Q_E103Q Ori2	+	++	++	+++	
BMP139					++

범례:

- + = 할로 직경 7-9 mm
- ++ = 할로 직경 10-12 mm
- +++ = 할로 직경 13-15 mm
- ++++ = 할로 직경 16-18 mm
- +++++ = 할로 직경 19-21mm

<158>

<159>

상기 평가로부터, 증폭에 의해 역가 및/또는 성능이 증가된다는 것이 명백하다. 더욱 구체적인 결론은 하기 와 같다:

<160>

1) N-말단 절단된 PUL 균주 (PULm104) 는 전장 폴루라나아제 균주에 비해 매우 두드러진 성능 유익을 갖는다. BML780 PULm104 CAP75 균주는 BMP139 균주 및 BML780 PUL CAP75 균주의 할로에 비해 표면이 2.5 배 증가된 할로를 생성한다(직경은 1.5 배 이상 증가). 이는 더 짧은 분자가 더 높은 역가로 생성된다는 것, 또는 그의 활성이 전장 폴루라나아제 분자에 비해 증가된 것을 시사한다.

<161>

2) PUL_E99Q_E103Q 변형체는 '야생형' PUL 에 비해 약간의 유익을 가질 수 있다. BML780 PUL_E99Q_E103Q 균주에 의해 생성된 할로는 BML780 PUL 균주의 것보다 약간 더 크다.

<162>

3) BMP139 생성 균주는 CAP75 증폭된 "야생형" PUL 균주와 성능이 동일한 것으로 보인다. 즉, 플레이트 평가에 기초할 때, 코돈-최적화는 성능 증가를 야기하지 않는다.

<163>

4) BML780 균주는 일반적으로 BML612 균주보다 성능이 더 우수하다. 이러한 관찰은 BML612 배경에서의 폴루라나아제의 분해에 대한 이전의 데이터와 일치한다. 여기서 구축된 BML612 폴루라나아제 균주가 여전히 합당한 AZCL-제거를 나타낸다는 사실은 플레이트 상에서, 폴루라나아제가 심지어 BML612 배경에서도 비교적 안정하다는 것을 시사한다.

<164>

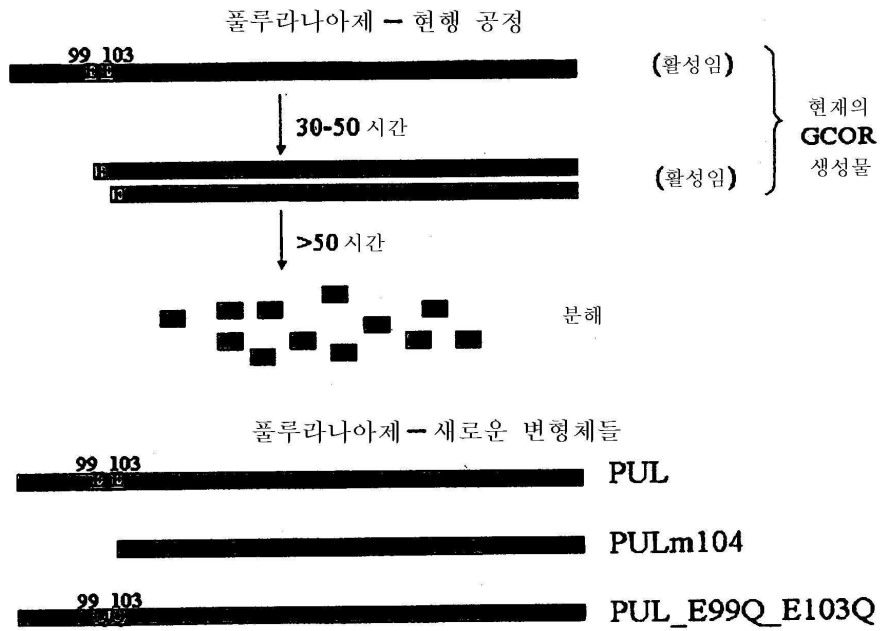
5) Ori1 및 Ori2 폴루라나아제 균주들 간에는 명확한 성능 차이가 관찰되지 않는다.

<165>

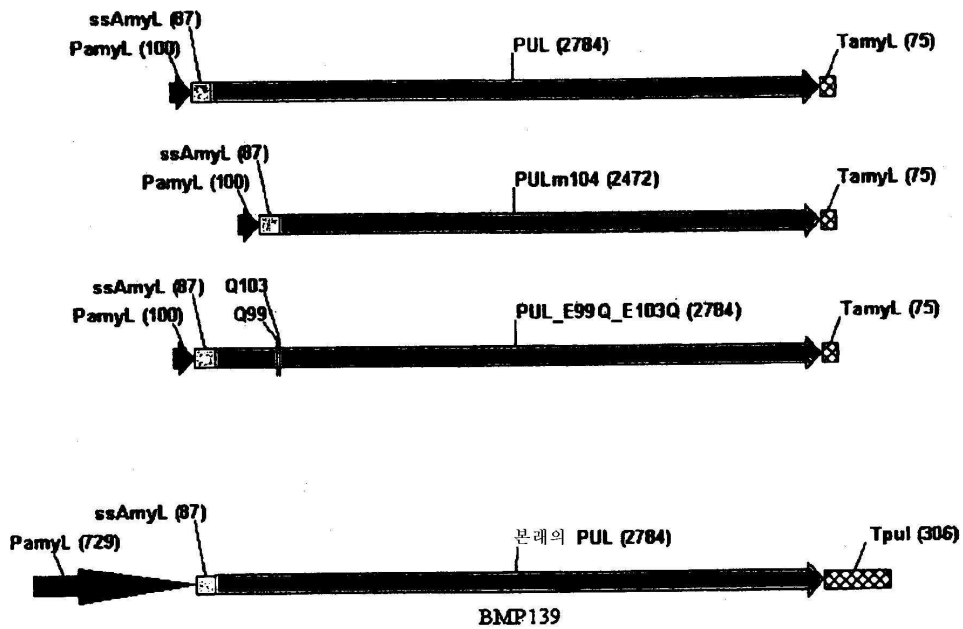
상기 명세서에 언급된 모든 공개물 및 특허는 참조로서 본원에 포함된다. 본 발명의 범위 및 취지를 벗어나지 않는, 상기 기재한 본 발명의 방법 및 시스템에 대한 다양한 변형 및 변화는 당업자들에 명백할 것이다. 본 발명이 특정 바람직한 구현예들과 관련하여 기술되었지만, 청구된 본 발명을 이러한 특정 구현예들에 과도하게 한정하지 않아야 한다는 것이 이해되어야 한다. 실제로, 당업자들에 자명한, 상기 기술한 본 발명의 실시 양식에 대한 다양한 변형은 하기 청구의 범위에 속하는 것으로 의도되었다.

도면

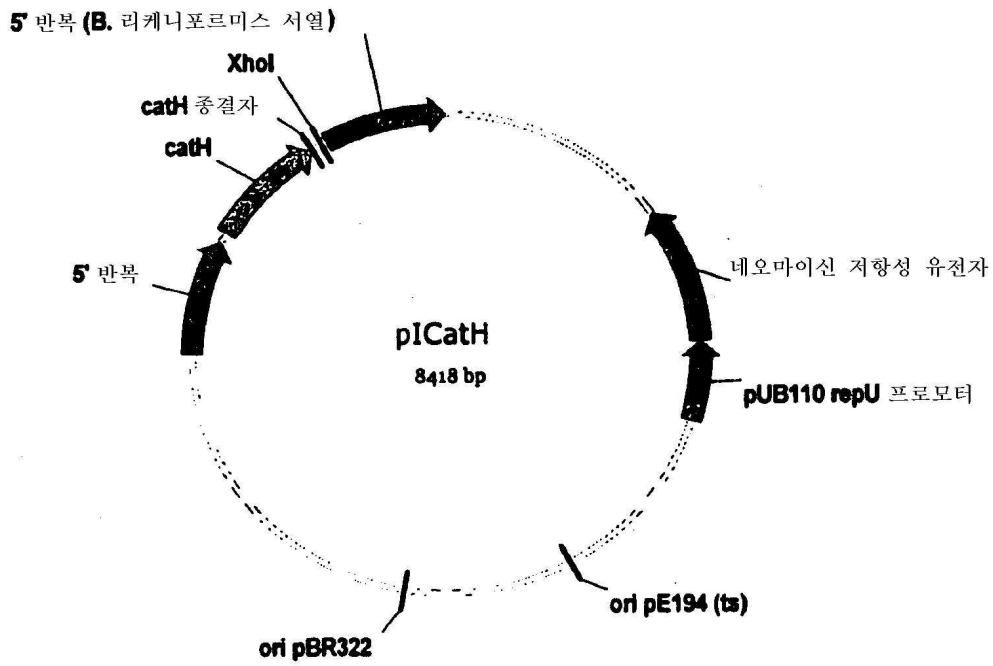
도면1



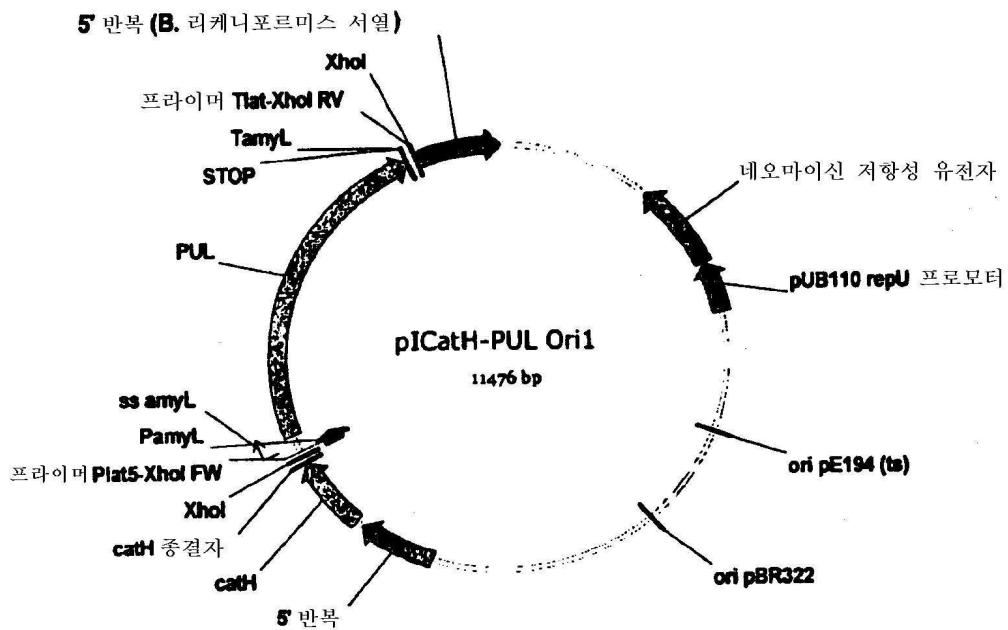
도면2



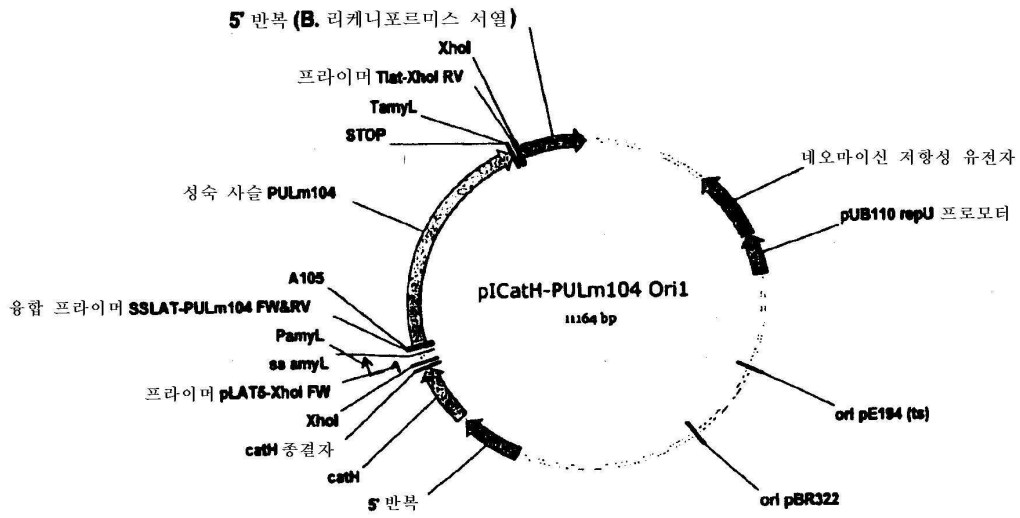
도면3



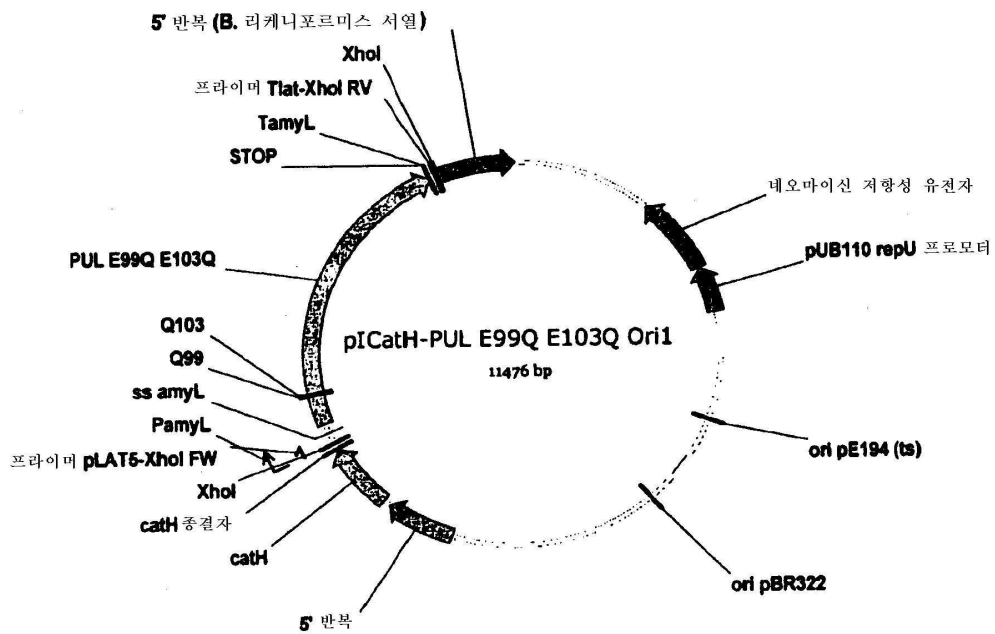
도면4



도면5



도면6



도면7A

PUL 야생형 DNA 뉴클레오티드 서열
 볼드체 = amyL 신호 서열
 흑색 = PUL 성숙 암호화 서열

atgaaacaacaaaaacggctttacgcccgattgctgacgctgttatttgegetcatcttcttctgctgcc
 tcattctgcagcttcagcagatggcaatcagcagcagatcatcgtccattatcttagaccggcgggag
 attatcaaccgtggagccttggatgtggcggaaagatggaggaggagcggaaatgat ttaaccag
 ccggcagattcacttggagcagtcgctcagcagatattccgggaaatccgagccaagtccggcatcat
 cgtcagaacacaggattggacgaaagatgtcagcgcgcatcgctatcgcctgagcaaaaggcaatg
 aagtctggctggtcgaaggcaacagccagatctttatagcgaaaaagacgccgaagatgctgctaaa
 ccggcagtcagcaacgcttatctggatgccagcaaccaagtccctggtcaaaactgagccaaccgctgac
 acttggagaaggagcagcggatttacggtccatgatgacacggcgaacaaagatatcccggtcacga
 gcttaagatgctagcctgggccaagatgtcacagcagttctggcgggacgcttcaacatatctt
 ggccgatcagattgggcaccggataatcacagcagctgctgaaaaaagtcagcaaacctgtatca
 gtttagcggagatctgccggaaggcaactatcaatataaagtgcctgaacgatagctggaacaatc
 cgagctatccgagcgataacatcaatctgacagtcgccggcaggcggagcacatgtcacgcttagctat
 atcccagcacacatgccgtctatgacacgatcaacaaccggaacgccgatcttcaagtgcgaagcgg
 cgtcaaacggatctggtcacagtcacattgggagaagatccggatgtcagccatacactgagcatcc
 aaacggatggctatcaagcgaacaagtcatcccagaaaacgctcctgaacagcagcagttat
 agcggcgatgatctgggcaacacgtatacaaaaaagcagcagcgttaaagt tggggcggcgaacg
 cacacaagtcaacgctcctgctgtatgatcagcaaacggcagcgtcacaaaaatcgtcccgatgacag
 catcaggacatggagtctgggaagcagcggccaacaaaaactggaaaactggtattatgatgaa
 gtcacgggccaaggatcaacaagaacagcggctcgatccgtatgctacagcaatcgccccgaatggaac
 aagaggcatgatcgtcgatctggcaaaaacagaccggcaggctggaatagcgataaacatcacgc
 cgaaaaacatcgaagatgaagtcatctatgaaatggacgctccgggattttagcatcgatccgaaacagc
 ggcatgaaaaacaaaggcaaatatctggcgtgacggaaaaaggaaacaaaaggcccgataacgtcaa
 agcggcacaggaaatgaaatcgccgccgaaagaccgatgggtccagaaatttatcatcgacagccttaa
 atatgggtcaacgaatatcatatcgacggcttctcgcttgatctgatggcgtgctgggcaagata
 caatgagcaaaagcggcagcgaacttcatgctatcaatccgggcatcgctctttaggagaaccgctgg
 acaggaggaacatcagcactgccggatgatcaactgctgacaaaaggcggcccaaaaagggaatgggagt
 cgccgtctttaacgacaacctgagaaatgccctggatggcaacgtttttgatagcagcggccaaggat
 ttgctacaggagcagcaggactgacagatgccatcaaaaatggcgtcgaaggcagcatcaacgat t
 acaagcagcccgggagaaacgatcaattatgtcacgagccatgacaactatacgtgtgggacaaaat
 cgctctgagcaaccgaatgatagcgaagcggaccgatcaaaaatggatgaaactggcacaagcagtcg
 tcatgacatcacaaggcgtcccgtttatgcaaggcggagaagaaatgctgagaacgaaaggcggcaac
 gacaacagctataatgccggcgtgcccgtcaatgaatttgactggagccggaaagcacaatatccgga
 cgtctttaactattatcaggacttatccatctgagactggaccatccggcgttagaatgacgacgg
 cgaacgaaatcaacagccatcttcagttctgaaacagcccggaaaaatcggctgcctatgaactgacg
 gacctgtgaacaaagacaaaatggggcaacatcatcgtcgtttataaccggaacaaaacggtcgccac
 aatcaatctccgagcggcaaatgggcaatcaatgccacaagcggcaaaagtggagaaagcactgg
 gacaagcagaaggatcagccaagtcccgggaatcagcatgatgatccttcatcaagaagtccgcccg
 gaccacggcaaaaa

도면7B

PUL 야생형 단백질 서열
 볼드체 = amyL 신호 서열
 흑색 = PUL 성숙 서열

MRQQKRLYARLLTLFLFALI FLLPHSAASADGNTTTIIVHYFRPAGDYQPWSLWMPKDGGAEYDFNQ
PADSLGAVASADI PGNPSQVGIIVRTQDWTKDVSADRY IDLSKGNVWLVVEGNSQIFYSKDAEDA
PAVSNAYLDASNQVLVKLSQPLTLGEGASGFTVHDDTANKDIPVTSVKDASLGQDVTAVLAVLAGTFQHI
GGSDWAPDNHSTLLKKVTNNLYQFSGDLPEGNQYKVALNDSWNNPSYPSDNINLTVPAGGAHVTF
IPSTHAVYDTINPNADLQVESGVKTDLVTVTLGEDPDVSHTLSIQTDGYQAKQVIPRNVLNSSQY
SGDDLGNTYTQKATTFKVWAPTSTQVNVLLYDSATGSVTKVIPMTASGHGVWEATVNQNLENWYMYE
VTGQGSTRTAVDPYATAIAPNGTRGMIVDLAKTDPAGWNSDKHITPKNIEDEVIYEMDVRDFSIDPNS
GMKNKGKYLALTEKGTKGPDNVKTGIDSLKQLGITHVQLMPVFASNSVDETDPTQDNWGYDPRNYDVP
EGQYATNANGNARIKEFKEMVLSLHREHIGVNMDVVYNHTATQISDFDKIVPEYYRTDDAGNYTNG
SGTGNEIAAERPVMQKFIIDSLKYWVNEYHIDGFRFDLMALLGKDTMSKAASELHAINPGIALYGE
PWTGGTSALPDDQLLTKGAQKGMVAVFNDNLRNALDGNVFDSSAQGFATGATGLTDAIKNGVEGSINDF
TSSPGETINYVTSHDNYTLWDKIALSNPNDSEADRIKMDELAQAVVMTSQGVPFMQGGEMLRTKGGN
DNSYNAGDAVNEFDWSRKAQYPDVFNYSGLIHLRLDHPAFRMTTANEINSHLQFLNSPENTVAYELT
DHVNKDKWGNIIVVYNPNKTVATINLPSGKWAINATSGKVGESTLQAEBSVQVPGISMMILHQEVSP
 DHGKK

도면8A

PULm104 뉴클레오티드 서열
 볼드체 = amy1 신호 서열
 흑색 = PULm104 성숙 암호화 서열

atgaaacaacaaaaacggctttacgcccgatgctgacgctggtattttgcgctcatcttcttctgctgcc
tcattctgcagcttcagcagctgctaaaccggcagtcagcaaccgcttatctggatgccagcaaccaag
tcctggccaactgagccaaccgctgacactgggagaaggagcgcgcatcttacggctccatgatgac
acggcgaacaaagatatcccggctcagcagcgttaaagatgctagcctgggccaagatgtcacagcagc
tctggcgggcacgtttcaacatatctttggcggatcagattgggcaccggataatcacagcagcctgc
tgaaaaaagtcacgaaacaacctgtatcagtttagcggagatctgcccgaaggcaactatcaatataaa
gtcgccctgaacgatagctggaacaatccgagctatccgagcagataacatcaatctgacagctccggc
agcggagcacatgtcacgcttagctatcccagcacaacatgcccgtctatgacacgatcaacaacc
cgaacccgatcttcaagtcgaaagcggcgtcaaaacggatctggctcacagtcacatgggagagat
ccggatgtcagccatacactgagcattcaaacggatggctatcaagcgaacaagtcaccccagaaa
cgctcctgaacagcagccagctatttatagcggcgatgatctgggcaacacgtatacacaacaaagcga
cgacgtttaaagttgggcccgaacaagcacacaagtcacacgtcctgctgtatgatcagcaacagggc
agcgtcaaaaaatcgtcccgatgacagcattcaggacatggagctggggaagcagcggctcaaccaaaa
ctggaaaaactggattatgatgtagaagtcacggcccaaggatcaacaagaacagcggctcgatccgt
atgctacagcaatcgccccgaatggaacaagagggcatgatcgtcgatctggcaaaaacagaccggca
ggctggaatagcgaataacatatacgcggcaaaaacatcgaagatgaagtcacatgaaatggagcgt
ccgggatttttagcattcgatccgaacagcggcatgaaaaacaaaggcaaatatctggcggctgacggaaa
atggacaaaaaggcccggataacgtcaaacagggcatcgatagcctgaaacaactgggcatcacacat
gtccaactgatcccgctctttgctagcaatagcgtcgatgaaacggaccggacacaagataaactgggg
ctatgacccgagaaattatgatgtcccgaaggccaatagccacgaacgccaatggaaacgcccggga
tcaaagaatttaagaaatggctcctgagccttcatagagaacatatacggcgtcaacatggagcgtcgtc
tataaccatacgtttgccacacagatcagcgcacttgataaaaatcgtgcccgaatattatcaggac
ggatgacgcccggcaattatacgaatggcagcggcagcaggaaatgaaatcgcccggaaagaccgatgg
tccagaaatttatcatcgacagccttaaatattgggtcaacgaatatacatcgacggcttctcgctt
gatctgatggcggctgctgggcaaaagatacaatgagcaaaagcggcggagcgaactcatgctatcaatcc
gggcatcgctctttatggagaaccgtggacaggaggaacatcagcactgcccggatgatcaactgctga
caaaaggcggcccaaaaagggaatgggagtcgcccgtcttaacgcaaacctgagaaatgccctggatggc
aacgttttgatagcagcggccaaggatttgctacaggagcgcagcaggactgacagatgccatcaaaaa
tggcgtcgaaggcagcatcaacgattttacaagcagcccgggagagacgatcaattatgtcacagacc
atgacaactatacgcgtgtgggacaaaatcgctctgagcaaccggcaatgatagcgaagcggaccggatc
aaaatggatgaactggcacaagcagtcgtcatgacatcaacaaggcgtcccgtttatgcaaggcgggaga
agaatgctgagaacgaaaggcggcaacgacaacagctataatgccggcgatgccgtcaatgaatttg
actggagcggaaagcacaatatccggacgcttctaactattatcaggacttatccatctgagactg
gacctccggcgtttagaatgacgacggcgaacgaaatcaacagccatcttcagtttctgaaacagccc
ggaaaatcggctcgcctatgaactgacggaccatgtgaacaaagacaaatggggcaacatcatcgctcg
tttataaccggcaacaaaacggctcgccacaatcaatctccgagcggcaaatgggcaatcaatgccaca
agcggcaaaagtgggagaaagcacactgggacaagcagaaggatcagtcgaagtcccgggaatcagcat
gatgatccttcatcaagaagtgcgcccggaccacggcaaaaa

도면8B

PULm104 단백질 서열
 볼드체 = amyL 신호 서열
 흑색 = PULm104 성숙 서열

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASAANKPAVSNAYLDASNQVLVKLSQPLTLGEGASGFTVHDD
TANKDIPVTSVKDASLQDVTAVLAGTFQHFGGSDWAPDNHSTLLKKVTNNLYQFSGDLPEGNYQYK
 VALNDSWNNPSYPSDNINLTVPAGGAHVTFYSI PSTHAVYDTINNPADLQVESGVKTDLVTVTLGED
 PDVSHTLSIQTDGYQAKQVI PRNVLNSSQYYSYSGDDLGNITYTQKATTFKVWAPTSTQVNVLLYDSATG
 SVTKIVPMTASGHVWEATVNQNLENWYYMYEVTGGSTRTAVDPYATAIAPNGTRGMIVDLAKTDPA
 GWNSDKHITPKNIEDEVIYEMDVRDFS IDPNSGMKNKGKYLALTEKGTGKPDNVKTGIDSLKQLGITH
 VQLMPVFASNSVDETDPTQDNWGYDPRNYDVPEGQYATNANGNARI KEFKEMVLSLHREHIGVNMDVV
 YNHTFATQISDFDKIVPEYYRTDDAGNYTNGSGTGNEIAAERPMVQKFI IDSLKYVWNEYHIDGFRF
 DLMALLGKDTMSKAASELHA INPGIALYGEFPTGGTSALPDDQLLTKGAQKGMGVAVFNDNLRNALDG
 NVFDSAQGFATGATGLTDAIKNGVEGSINDFTSSPGETINYVTSHDNYTLWDKIALSNPNDSEADRI
 KMDELAQAVVMTSQGVFFMQGGEMLRTKGGNDNSYNAGDAVNEFDWSRKAQYPDVFNYYSGLIHLRL
 DHPAFRMTTANEINSHLQFLNSPENTVAYELTDHVNKDKWGNII VVYNPNKTVATINLPSGKWAINAT
 SGKVGESTLGOAEGSVQVPGI SMMILHQEVSPDHGKK

도면9A

PUL E99Q_E103Q 뉴클레오티드 서열
 볼드체 = amyL 신호 서열
 흑색 = PUL E99Q_E103Q 성숙 암호화 서열

atgaaacaacaaaaacggctttacgccgattgctgacgctgttatttgcgctcatcttctgctgcc
tcattctgcagcttcagcagatggcaatacgcagcagcatcatcgccattatcttagaccggcgaggag
attatcaaccgctggagcctttggatgtggccgaaagatggaggaggagcggaaatgatatttaaccag
ccggcagattcactggagcagtcgcctcagcagatattccgggaaatccgagccaagtcggcatcat
cgtcagaacacaggattggacgaaagatgtcagcggcagatcgctatatcgatctgagcaaaaggcaatg
aagtctggctggtcgaaggcaacagccagatctttatagcgaaaagacgccaagatgctgctaaa
ccggcagtcagcaacgcttatctggatgccagcaaccaagtcctgggcaaaactgagccaaccgctgac
actgggagaaaggagcagcggatttacggctccatgatgacacggcgaaacaaagatatcccggtcacga
gcgttaaagatgctagcctgggcaagatgtcacagcagttctggcgggcagcttcaacatatcttt
ggcggatcagatggggcaccgataatcacagcagctgctgaaaaaagtcacgaacaacctgtatca
gtttagcggagatctgccggaaggcaactatcaatataaagtcgacctgaacgatagctggaacaatc
cgagctatccgagcgataacatcaatctgacagtcggcgagcgggagcagatgtcagcttagctat
atcccagcacaacatgcccgtctatgacagatcaacaaccgaaacgcccagcttcaagtcgaaagcgg
cgtcaaaacggatctggtcacagtcacattgggagaagatccggatgtcagccatacactgagcatcc
aaacggatggctatcaagcgaacaagtcaccccagaaacgctcctgaacagcagccagtatattat
agcggcgatgatctgggcaacacgtatacacaacaaagcagcagctttaaagttggggcgccgacaag
cacacaagtcacagtcctgctgtatgatcagcaaacagcagcgtcacaaaaatcgtcccgatgacag
catcaggacatggagtcgggaagcagcggcacaacaaacctggaaaactggattatgatgaa
gtcacgggccaaggatcaacaagaacagcggctcgatccgatgctacagcaatcgccccgaatggaac
aagaggcatgatcgtcgatctggcaaaaacagaccggcaggctggaatagcgataaacatcacgc
cgaaaaacatcgaagatgaaatcattatgaaatggagcgtccgggatttagcatcgatccgaacagc
ggcatgaaaaacaaaggcaaatctggcgctgacggaaaaaggcaaaaaggccggataacgctcaa
aacaggctcgatagcctgaaacaactgggcatcacacatgtccaactgatgcccgtcttgctagca
atagcgtcgatgaaacggaccgacacaagataactggggctatgaccgagaaatgatgctcccg
gaaggccaatatgccacgaacgccaatggaacgcccggatcaaagaatttaagaaatggtcctgag
cctcatagagaacatccggcgtcaacatggagcgtcgtctataaccatacgtttgccacacagatca
ggactttgataaaaatcgtgcccgaatatattatcggacggatgacgcccgcaatatatacgaatggc
agcggcacaggaaatgaaatcgccgcaaaagaccgatggccagaaatctcatcgacagccttaa
atattgggtcaacgaatatcatatcgacggcttctgctttgatctgatggcgctgctgggcaagata
caatgagcaaaagcggcgagcgaacttcatgctatcaatccgggcatcgctctttatgggaaaccgctgg
acaggaggaacatcagcactgcccgatgatcaactgctgacaaaaggcgccccaaaagggaatgggagt
cgccgtctttaacgacaacctgagaaatgcccggatggcaacgcttttgatagcagcggccaaggat
ttgctacaggagcagcaggactgacagatgccatcaaaaatggcgtcgaaggcagcatcaacgat
ttacaagcagcccgggagaaacgatcaattatgtcagcagccatgacaactatacgtctggggcaaaaat
cgctctgagcaaccggaatgatagcgaagcggaccggatcaaaaatggatgaaactggcacaagcagctcg
tcatgacatcacaaggcgtcccgtttatgcaaggcggagaagaaatgctgagaacgaaaggcggcaac
gacaacagctataatgcccggatgcccgtcaatgaaatggactggagccggaaagcacaatccgga
cgtctttaactattatcaggacttatccatctgagactggaccatccggcgcttagaatgacgacgg
cgaacgaaatcaacagccatctcagttctggaacagcccggaaaaatcggctcgctatgaaactgacg
gacctgtgaacaagaacaaatggggcaacatcatcgtcgtttataaccgaaacaaacggctcgccac
aatcaatctccgagcggcaaatgggcaatcaatgccacaagcggcaaaagtgggagaaagcactgg
gacaagcagaaggatcagccaagtcggggaatcagcatgatgatcctcatcaagaagtcagcccg
gaccacggcaaaaa

도면9B

PUL E99Q_E103Q 단백질 서열
 불드체 = amyL 신호 서열
 흑색 = PUL E99Q_E103Q 성숙 서열

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAASADGNTTTIIVHYFRPAGDYQPWSLWMWPKDGGGA
 EYDFNQPADSLGAVASADIPGNPSQVGIIVRTQDWTQDVSAADRYIDLSKGNEVWLVEGNSQI
 FYSQKDAQDAAKPAVSNAYLDASNQVLVKLSQPLTLGEGASGFTVHDDTANKDIPVTSVKDA
 SLGQDVTAVLAGTFQHIFGGSDWAPDNHSTLLKKTNNLYQFSGDLPEGNYQYKVALNDSWN
 NPSYPSDNINLTVPAGGAHVTFYSYIPSTHAVYDTINPNADLQVESGVKTDLVTVTLGEDPD
 VSHTLSIQTDGYQAKQVIPRNVLNSSQYYSGDDLGNITYTQKATTFKVVWAPTSTQVNVLLYD
 SATGSVTKIVPMTASGHGVWEATVNQNLNENWYMYEVTGQGSTRTAVDPYATAIAPNGTRGM
 NVKTGIDSLKQLGITHVQLMPVFASNSVDETDPTQDNWGYDPRNYDVPEGQYATNANGNARI
 KEFKEMVLSLHREHIGVNMDDVYNHTFATQISDFDKIVPEYYRTDDAGNYTNGSGTGNEIA
 AERPMVQKFIIDSLKYWVNEYHIDGFRFDLMALLGKDTMSKAASELHAINPGIALYGEPTG
 GTSALPDDQLLTKGAQKGMGVAVFNDNLRNALDGNVFDSSAQGFATGATGLTDAIKNGVEGS
 INDFTS SPGETINYVTSHDNYTLWDKIALSNPNDSEADRIKMDLAQAVVMTSQGVPFMGG
 EEMLRTKGNDNSYNAGDAVNEFDWSRKAQYPDVFNYYSGLIHLRLDHPAFRMTTANEINSH
 LQFLNSPENTVAYELTDHVNKDKWGNIIVYVNPNTVATINLPSGKWAINATSGKVGESTLG
 QAEGSVQVPGISMMILHQEVSPDHGKK

서열 목록

- <110> Danisco US, Inc., Genencor Division
 England, George
 Kolkman, Marc
 Miller, Brian S.
 Vroemen, Casper
- <120> Pullulanase Variants with Increased Productivity

- <130> GC907-PCT

- <140> PCT/US2007/018523
- <141> 2007-08-21

- <150> US 60/903,247
- <151> 2007-02-23

- <150> US 60/839,735
- <151> 2006-08-23

- <160> 10

- <170> PatentIn version 3.4

- <210> 1
- <211> 2871
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic codon optimized sequence from Bacillus deramificans

<400> 1

atgaaacaac aaaaacggct ttacccccga ttgctgacgc tgttatttgc gtcacatcttc	60
ttgctgcctc attctgcagc ttcagcagat ggcaatacga cgacgatcat cgtccattat	120
tttagaccgg cgggagatta tcaaccgtgg agcctttgga tgtggccgaa agatggagga	180
ggagcggaat atgattttaa ccagccggca gattcacttg gagcagtcgc ctcagcagat	240
attccgggaa atccgagcca agtcggcatc atcgtcagaa cacagattg gacgaaagat	300
gtcagcgcgg atcgtatata cgatctgagc aaaggcaatg aagtctggct ggtcgaaggc	360
aacagccaga tcttttatag cgaaaaagac gccgaagatg ctgctaaacc ggcagtcagc	420
aacgcttatac tggatgccag caaccaagtc ctggtcaaac tgagccaacc gctgacactt	480
ggagaaggag cgagcggatt tacggtccat gatgacacgg cgaacaaaga tatcccggtc	540
acgagcgtta aagatgctag cctgggccaa gatgtcacag cagtctggc gggcacgttt	600
caacatatct ttggcggatc agattgggca ccggataatc acagcacgct gctgaaaaaa	660
gtcacgaaca acctgtatca gtttagcggga gatctgccgg aaggcaacta tcaatataaa	720
gtcgcctga acgatagctg gaacaatccg agctatccga gcgataacat caatctgaca	780
gtcccggcag gcggagcaca tgtcacgttt agctatatcc cgagcacaca tgccgtctat	840
gacacgatca acaaccggaa cgccgatctt caagtcgaaa gcggcgtcaa aacggatctg	900
gtcacagtca cattgggaga agatccggat gtcagccata cactgagcat ccaaaccgat	960

ggctatcaag cgaacaagt catcccgaga aacgtcctga acagcagcca gtattattat 1020
 agcggcgatg atctgggcaa cacgtataca caaaaagcga cgacgtttaa agtttgggcg 1080
 ccgacaagca cacaagtcaa cgtcctgctg tatgattcag caacaggcag cgtcacaaaa 1140
 atcgtcccga tgacagcatc aggacatgga gtctgggaag cgacggtaa ccaaacctg 1200
 gaaaactggt attatatgta tgaagtcacg ggccaaggat caacaagaac agcggtcgat 1260
 ccgtatgcta cagcaatcgc cccgaatgga acaagaggca tgatcgtcga tctggcaaaa 1320
 acagacccgg caggctgga tagcgataaa catatcacgc cgaaaaacat cgaagatgaa 1380
 gtcatctatg aaatggacgt ccgggatttt agcatcgtc cgaacagcgg catgaaaaac 1440
 aaaggcaaat atctggcgct gacggaaaaa ggaacaaaag gcccgataa cgtcaaaaca 1500
 ggcatcgata gcctgaaaca actgggcac acacatgtcc aactgatgcc ggtctttgct 1560
 agcaatagcg tcatgaaac ggaccgcaca caagataact ggggctatga cccgagaaat 1620
 tatgatgtcc cggaaggcca atatgccacg aacgccaatg gaaacgccg gatcaaagaa 1680
 tttaaagaaa tggctctgag cttcataga gaacatatcg gcgtcaacat ggacgtcgtc 1740
 tataaccata cgtttgccac acagatcagc gactttgata aaatcgtgcc ggaatattat 1800
 tatcggacgg atgacgccg caattatacg aatggcagcg gcacaggaaa tgaatcgcc 1860
 gccgaaagac cgatggtcca gaaatttatc atcgacagcc ttaaatattg ggtcaacgaa 1920
 tatcatatcg acggctttcg ctttgatctg atggcgtgc tgggcaaaga tacaatgagc 1980
 aaagcggcga gcgaacttca tgctatcaat ccgggcatcg ctctttatgg agaaccgtgg 2040
 acaggaggaa catcagcact gccgatgat caactgctga caaaaggcgc ccaaaaagga 2100
 atgggagtcg ccgtctttaa cgacaacctg agaaatgccc tggatggcaa cgtttttgat 2160

agcagcgcce aaggatttgc tacaggagcg acaggactga cagatgcat caaaaatggc 2220
 gtcgaaggca gcatcaacga ttttacaagc agcccgggag aaacgatcaa ttatgtcacg 2280
 agccatgaca aciatacgtc gtgggacaaa atcgctctga gcaaccgaa tgatagcgaa 2340
 gcggaccgga tcaaaatgga tgaactggca caagcagtcg tcatgacatc acaaggcgtc 2400
 ccgtttatgc aaggcggaga agaaatgctg agaacgaaag gcggcaacga caacagctat 2460
 aatgccggcg atgccgtcaa tgaatttgac tggagccgga aagcacaata tccggacgtc 2520
 ttttaactatt attcaggact tatccatctg agactggacc atccggcgtt tagaatgacg 2580
 acggcgaacg aatcaacag ccatcttcag tttctgaaca gcccggaaaa tacggtcgcc 2640
 tatgaactga cggaccatgt gaacaaagac aatggggca acatcatcgt cgtttataac 2700
 ccgaacaaaa cggtcgccac aatcaatctt ccgagcggca aatgggcaat caatgccaca 2760
 agcggcaaag ttgagaaaag cacactggga caagcagaag gatcagtcca agtcccggga 2820
 atcagcatga tgatccttca tcaagaagtc agcccggacc acggcaaaaa a 2871

<210> 2
 <211> 957
 <212> PRT
 <213> Bacillus deramificans

<400> 2
 Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala Asp Gly Asn
 20 25 30
 Thr Thr Thr Ile Ile Val His Tyr Phe Arg Pro Ala Gly Asp Tyr Gln
 35 40 45

Pro Trp Ser Leu Trp Met Trp Pro Lys Asp Gly Gly Gly Ala Glu Tyr
 50 55 60

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

Ile Pro Gly Asn Pro Ser Gln Val Gly Ile Ile Val Arg Thr Gln Asp
 85 90 95

Trp Thr Lys Asp Val Ser Ala Asp Arg Tyr Ile Asp Leu Ser Lys Gly
 100 105 110

Asn Glu Val Trp Leu Val Glu Gly Asn Ser Gln Ile Phe Tyr Ser Glu
 115 120 125

Lys Asp Ala Glu Asp Ala Ala Lys Pro Ala Val Ser Asn Ala Tyr Leu
 130 135 140

Asp Ala Ser Asn Gln Val Leu Val Lys Leu Ser Gln Pro Leu Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Ala Ser Gly Phe Thr Val His Asp Asp Thr Ala Asn Lys
 165 170 175

Asp Ile Pro Val Thr Ser Val Lys Asp Ala Ser Leu Gly Gln Asp Val
 180 185 190

Thr Ala Val Leu Ala Gly Thr Phe Gln His Ile Phe Gly Gly Ser Asp
 195 200 205

Trp Ala Pro Asp Asn His Ser Thr Leu Leu Lys Lys Val Thr Asn Asn
 210 215 220

Leu Tyr Gln Phe Ser Gly Asp Leu Pro Glu Gly Asn Tyr Gln Tyr Lys
 225 230 235 240

Val Ala Leu Asn Asp Ser Trp Asn Asn Pro Ser Tyr Pro Ser Asp Asn
 245 250 255

Ile Asn Leu Thr Val Pro Ala Gly Gly Ala His Val Thr Phe Ser Tyr
 260 265 270

Ile Pro Ser Thr His Ala Val Tyr Asp Thr Ile Asn Asn Pro Asn Ala
 275 280 285

Asp Leu Gln Val Glu Ser Gly Val Lys Thr Asp Leu Val Thr Val Thr
 290 295 300

Leu Gly Glu Asp Pro Asp Val Ser His Thr Leu Ser Ile Gln Thr Asp
 305 310 315 320

Gly Tyr Gln Ala Lys Gln Val Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Ser Ser
 325 330 335

Gln Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asp Asp Leu Gly Asn Thr Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ala Thr Thr Phe Lys Val Trp Ala Pro Thr Ser Thr Gln Val Asn Val
 355 360 365

Leu Leu Tyr Asp Ser Ala Thr Gly Ser Val Thr Lys Ile Val Pro Met
 370 375 380

Thr Ala Ser Gly His Gly Val Trp Glu Ala Thr Val Asn Gln Asn Leu
 385 390 395 400

Glu Asn Trp Tyr Tyr Met Tyr Glu Val Thr Gly Gln Gly Ser Thr Arg
 405 410 415

Thr Ala Val Asp Pro Tyr Ala Thr Ala Ile Ala Pro Asn Gly Thr Arg
 420 425 430

Gly Met Ile Val Asp Leu Ala Lys Thr Asp Pro Ala Gly Trp Asn Ser
 435 440 445

Asp Lys His Ile Thr Pro Lys Asn Ile Glu Asp Glu Val Ile Tyr Glu
 450 455 460

Met Asp Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Pro Asn Ser Gly Met Lys Asn
 465 470 475 480

Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Leu Thr Glu Lys Gly Thr Lys Gly Pro Asp
 485 490 495

Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Gln Leu Gly Ile Thr His
 500 505 510

Val Gln Leu Met Pro Val Phe Ala Ser Asn Ser Val Asp Glu Thr Asp

Gly Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Tyr Thr Leu Trp
 755 760 765

Asp Lys Ile Ala Leu Ser Asn Pro Asn Asp Ser Glu Ala Asp Arg Ile
 770 775 780

Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Met Thr Ser Gln Gly Val
 785 790 795 800

Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn
 805 810 815

Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ala Val Asn Glu Phe Asp Trp Ser
 820 825 830

Arg Lys Ala Gln Tyr Pro Asp Val Phe Asn Tyr Tyr Ser Gly Leu Ile
 835 840 845

His Leu Arg Leu Asp His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asn Glu
 850 855 860

Ile Asn Ser His Leu Gln Phe Leu Asn Ser Pro Glu Asn Thr Val Ala
 865 870 875 880

Tyr Glu Leu Thr Asp His Val Asn Lys Asp Lys Trp Gly Asn Ile Ile
 885 890 895

Val Val Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Val Ala Thr Ile Asn Leu Pro Ser
 900 905 910

Gly Lys Trp Ala Ile Asn Ala Thr Ser Gly Lys Val Gly Glu Ser Thr
 915 920 925

Leu Gly Gln Ala Glu Gly Ser Val Gln Val Pro Gly Ile Ser Met Met
 930 935 940

Ile Leu His Gln Glu Val Ser Pro Asp His Gly Lys Lys
 945 950 955

- <210> 3
- <211> 2559
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic codon optimized pullulanase

<400> 3

atgaaacaac aaaaacggct ttacccccga ttgctgacgc tgttatttgc gctcatcttc 60

ttgctgcctc attctgcagc ttcagcagct gctaaaccgg cagtcagcaa cgcttatctg 120

gatgccagca accaagtctt ggtcaaaactg agccaaccgc tgacacttgg agaaggagcg 180

agcggattta cggctcatga tgacacggcg aacaaagata tcccggtcac gagcgttaaa 240

gatgctagcc tgggccaaga tgtcacagca gttctggcgg gcacgtttca acatatcttt 300

ggcggatcag attgggcacc ggataatcac agcacgctgc tgaaaaaagt cacgaacaac 360

ctgtatcagt ttagcggaga tctgccggaa ggcaactatc aatataaagt cgccctgaac 420

gatagctgga acaatccgag ctatccgagc gataacatca atctgacagt cccggcaggc 480

ggagcacatg tcacgtttag ctatatcccg agcacacatg ccgtctatga cacgatcaac 540

aaccgaacg ccgatcttca agtcgaaagc ggcgtcaaaa cggatctggt cacagtcaca 600

ttgggagaag atccggatgt cagccataca ctgagcatcc aaacggatgg ctatcaagcg 660

aaacaagtca tcccagaaaa cgtcctgaac agcagccagt attattatag cggcgatgat 720

ctgggcaaca cgtatacaca aaaagcgacg acgtttaaag tttgggcgcc gacaagcaca 780

caagtcaacg tctgctgta tgattcagca acaggcagcg tcacaaaaat cgtcccgatg 840

acagcatcag gacatggagt ctgggaagcg acggtcaacc aaaacctgga aaactggtat 900

tatatgtatg aagtcacggg ccaaggatca acaagaacag cggtcgatcc gtatgctaca 960

gcaatcgccc cgaatggaac aagaggcatg atcgtcgatc tggcaaaaac agacccgcca 1020

ggctggaata gcgataaaca tatcacgccg aaaaacatcg aagatgaagt catctatgaa 1080
 atggacgtcc gggatttttag catcgatccg aacagcggca tgaaaaacaa aggcaaatat 1140
 ctggcgtga cggaaaaagg aacaaaaggc cggataacg tcaaacagg catcgatagc 1200
 ctgaaacaac tgggcatcac acatgtccaa ctgatgccg tctttgctag caatagcgtc 1260
 gatgaaacgg acccgacaca agataactgg ggctatgacc cgagaaatta tgatgtcccg 1320
 gaaggccaat atgccacgaa cgccaatgga aacgccgga tcaaagaatt taaagaaatg 1380
 gtcttgagcc ttcatagaga acatatcggc gtcaacatgg acgtcgtcta taaccatagc 1440
 ttgcccacac agatcagcga ctttgataaa atcgtgccgg aatattatta tcggacggat 1500
 gacgccgga attatacga tggcagcggc acaggaaatg aaatcgccgc cgaaagaccg 1560
 atggtccaga aatttatcat cgacagcctt aaatattggg tcaacgaata tcatatcgac 1620
 ggctttcgtt ttgatctgat ggcgtgctg ggcaaagata caatgagcaa agcggcgagc 1680
 gaacttcatg ctatcaatcc gggcatcgct ctttatggag aaccgtggac aggaggaaca 1740
 tcagcactgc cggatgatca actgctgaca aaaggcggc aaaaaggaat gggagtgcgc 1800
 gtctttaacg acaacctgag aatgccctg gatggcaac tttttgatag cagcgcccaa 1860
 ggatttgcta caggagcgc aggactgaca gatgcatca aaaatggcgt cgaagcgagc 1920
 atcaacgatt ttacaagcag cccgggagag acgatcaatt atgtcacgag ccatgacaac 1980
 tatacgtgt gggacaaaat cgctctgagc aaccgaaatg atagcgaagc ggaccggatc 2040
 aaaatggatg aactggcaca agcagtcgtc atgacatcac aaggcgtccc gtttatgcaa 2100
 ggccggagaag aaatgctgag aacgaaaggc ggcaacgaca acagctataa tgccggcgat 2160

gccgtcaatg aatttgactg gagccgaaa gcacaatc cggacgtctt taactattat 2220
 tcaggactta tccatctgag actggacat ccggcgttta gaatgacgac ggccaacgaa 2280
 atcaacagcc atcttcagtt tctgaacagc ccgaaaata cggtcgccta tgaactgacg 2340
 gaccatgtga acaaagacaa atggggcaac atcatcgtcg tttataacc gaacaaaacg 2400
 gtgccacaa tcaatcttcc gagcggcaaa tgggcaatca atgccacaag cggcaaagtt 2460
 ggagaaagca cactgggaca agcagaagga tcagtccaag tcccgggaat cagcatgatg 2520
 atccttcac aagaagtcag cccggaccac ggcaaaaaa 2559

<210> 4
 <211> 853
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic codon optimized pullulanase

<400> 4
 Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala Lys
 20 25 30
 Pro Ala Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gln Val Leu Val
 35 40 45
 Lys Leu Ser Gln Pro Leu Thr Leu Gly Glu Gly Ala Ser Gly Phe Thr
 50 55 60
 Val His Asp Asp Thr Ala Asn Lys Asp Ile Pro Val Thr Ser Val Lys
 65 70 75 80
 Asp Ala Ser Leu Gly Gln Asp Val Thr Ala Val Leu Ala Gly Thr Phe
 85 90 95

Gln His Ile Phe Gly Gly Ser Asp Trp Ala Pro Asp Asn His Ser Thr
 100 105 110

Leu Leu Lys Lys Val Thr Asn Asn Leu Tyr Gln Phe Ser Gly Asp Leu
 115 120 125

Pro Glu Gly Asn Tyr Gln Tyr Lys Val Ala Leu Asn Asp Ser Trp Asn
 130 135 140

Asn Pro Ser Tyr Pro Ser Asp Asn Ile Asn Leu Thr Val Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Ala His Val Thr Phe Ser Tyr Ile Pro Ser Thr His Ala Val Tyr
 165 170 175

Asp Thr Ile Asn Asn Pro Asn Ala Asp Leu Gln Val Glu Ser Gly Val
 180 185 190

Lys Thr Asp Leu Val Thr Val Thr Leu Gly Glu Asp Pro Asp Val Ser
 195 200 205

His Thr Leu Ser Ile Gln Thr Asp Gly Tyr Gln Ala Lys Gln Val Ile
 210 215 220

Pro Arg Asn Val Leu Asn Ser Ser Gln Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asp Asp
 225 230 235 240

Leu Gly Asn Thr Tyr Thr Gln Lys Ala Thr Thr Phe Lys Val Trp Ala
 245 250 255

Pro Thr Ser Thr Gln Val Asn Val Leu Leu Tyr Asp Ser Ala Thr Gly
 260 265 270

Ser Val Thr Lys Ile Val Pro Met Thr Ala Ser Gly His Gly Val Trp
 275 280 285

Glu Ala Thr Val Asn Gln Asn Leu Glu Asn Trp Tyr Tyr Met Tyr Glu
 290 295 300

Val Thr Gly Gln Gly Ser Thr Arg Thr Ala Val Asp Pro Tyr Ala Thr
 305 310 315 320

Ala Ile Ala Pro Asn Gly Thr Arg Gly Met Ile Val Asp Leu Ala Lys
 325 330 335

Thr Asp Pro Ala Gly Trp Asn Ser Asp Lys His Ile Thr Pro Lys Asn
 340 345 350

Ile Glu Asp Glu Val Ile Tyr Glu Met Asp Val Arg Asp Phe Ser Ile
 355 360 365

Asp Pro Asn Ser Gly Met Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Leu Thr
 370 375 380

Glu Lys Gly Thr Lys Gly Pro Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser
 385 390 395 400

Leu Lys Gln Leu Gly Ile Thr His Val Gln Leu Met Pro Val Phe Ala
 405 410 415

Ser Asn Ser Val Asp Glu Thr Asp Pro Thr Gln Asp Asn Trp Gly Tyr
 420 425 430

Asp Pro Arg Asn Tyr Asp Val Pro Glu Gly Gln Tyr Ala Thr Asn Ala
 435 440 445

Asn Gly Asn Ala Arg Ile Lys Glu Phe Lys Glu Met Val Leu Ser Leu
 450 455 460

His Arg Glu His Ile Gly Val Asn Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr
 465 470 475 480

Phe Ala Thr Gln Ile Ser Asp Phe Asp Lys Ile Val Pro Glu Tyr Tyr
 485 490 495

Tyr Arg Thr Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Thr Gly
 500 505 510

Asn Glu Ile Ala Ala Glu Arg Pro Met Val Gln Lys Phe Ile Ile Asp
 515 520 525

Ser Leu Lys Tyr Trp Val Asn Glu Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe
 530 535 540

Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys Asp Thr Met Ser Lys Ala Ala Ser
 545 550 555 560

Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly Ile Ala Leu Tyr Gly Glu Pro Trp

Val Ala Thr Ile Asn Leu Pro Ser Gly Lys Trp Ala Ile Asn Ala Thr
 805 810 815

Ser Gly Lys Val Gly Glu Ser Thr Leu Gly Gln Ala Glu Gly Ser Val
 820 825 830

Gln Val Pro Gly Ile Ser Met Met Ile Leu His Gln Glu Val Ser Pro
 835 840 845

Asp His Gly Lys Lys
 850

- <210> 5
- <211> 2871
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> synthetic modified pullulanase

<400> 5
 atgaaacaac aaaaacggct ttacccccga ttgctgacgc tgttatttgc gctcatcttc 60
 ttgctgctc attctgcagc ttcagcagat ggcaatacga cgacgatcat cgtccattat 120
 tttagaccgg cgggagatta tcaaccgtgg agcctttgga tgtggccgaa agatggagga 180
 ggagcggaat atgattttaa ccagccggca gattcacttg gagcagtcgc ctcagcagat 240
 attccgggaa atccgagcca agtcggcatc atcgctcagaa cacaggattg gacgaaagat 300
 gtcagcgccg atcgctatat cgatctgagc aaaggcaatg aagtctggct ggtcgaaggc 360
 aacagccaga tcttttatag cgaaaaagac gccgaagatg ctgctaaacc ggcagtcagc 420
 aacgcttadc tggatgccag caaccaagtc ctggtcaaac tgagccaacc gctgacactt 480
 ggagaaggag cgagcggatt tacggtccat gatgacacgg cgaacaaaga tatcccgttc 540
 acgagcgtaa aagatgctag cctgggccaa gatgtcacag cagtcttggc gggcacgttt 600

caacatatct ttggcggatc agattgggca ccgataatc acagcacgct gctgaaaaaa 660

gtcacgaaca acctgtatca gtttagcgga gatctgccgg aaggcaacta tcaatataaa 720

gtcgcctga acgatagctg gaacaatccg agctatccga gcgataacat caatctgaca 780

gtccccgag gcggagcaca tgtcacgttt agctatatcc cgagcacaca tgccgtctat 840

gacacgatca acaacccgaa cgccgatctt caagtcgaaa gcggcgtcaa aacggatctg 900

gtcacagtca cattgggaga agatccggat gtcagccata cactgagcat ccaaacggat 960

ggctatcaag cgaacaagt catcccgaga aacgtcctga acagcagcca gtattattat 1020

agcggcgatg atctgggcaa cacgtataca caaaaagcga cgacgtttaa agtttggcgc 1080

ccgacaagca cacaagtcaa cgtcctgctg tatgattcag caacaggcag cgtcacaaaa 1140

atcgtcccga tgacagcatc aggacatgga gctctggaag cgacggtcaa ccaaaacctg 1200

gaaaactggt attatatgta tgaagtcacg ggccaaggat caacaagaac agcggtcgat 1260

ccgtatgcta cagcaatcgc cccgaatgga acaagaggca tgatcgtcga tctggcaaaa 1320

acagaccggg caggctggaa tagcgataaa catatcacgc cgaaaaacat cgaagatgaa 1380

gtcatctatg aaatggacgt ccgggatttt agcatgatc cgaacagcgg catgaaaaac 1440

aaaggcaaat atctggcgt gacggaaaaa ggaacaaaag gcccgataa cgtcaaaaca 1500

ggcatcgata gcctgaaaca actgggcac c acatgtcc aactgatgcc ggtctttgct 1560

agcaatagcg tcgatgaaac ggaccgaca caagataact ggggctatga cccgagaat 1620

tatgatgtcc cggaaggcca atatgccacg aacgccaatg gaaacgccg gatcaaagaa 1680

tttaaagaaa tggctctgag ccttcataga gaacatatcg gcgtcaacat ggacgtcgtc 1740

tataaccata cgtttgccac acagatcagc gactttgata aaatcgtgcc ggaatattat 1800

tatcggacgg atgacgccgg caattatacg aatggcagcg gcacaggaaa tgaatcggc 1860

gccgaaagac cgatggtcca gaaatttatac atcgacagcc ttaaatattg ggtcaacgaa 1920

tatcatatcg acggctttcg ctttgatctg atggcgctgc tgggcaaaga tacaatgagc 1980

aaagcggcga gcgaacttca tgctatcaat ccgggcatcg ctctttatgg agaaccgtgg 2040

acaggaggaa catcagcact gccgatgat caactgctga caaaaggcgc caaaaagga 2100

atgggagtcg ccgtctttaa cgacaacctg agaaatgccc tggatggcaa cgttttgat 2160

agcagcggcc aaggatttgc tacaggagcg acaggactga cagatgcat caaaaatggc 2220

gtcgaaggca gcatcaacga ttttacaagc agcccgggag aaacgatcaa ttatgtcacg 2280

agccatgaca actatacgt gtgggacaaa atcgctctga gcaaccgaa tgatagcgaa 2340

gctgaccgga tcaaatgga tgaactggca caagcagtcg tcatgacatc acaaggcgtc 2400

ccgtttatgc aaggcggaga agaaatgctg agaacgaaag gcggcaacga caacagctat 2460

aatgccggcg atgccgtcaa tgaatttgac tggagccgga aagcacaata tccggacgtc 2520

tttaactatt attcaggact tatccatctg agactggacc atccggcgtt tagaatgacg 2580

acggcgaacg aaatcaacag ccatcttcag tttctgaaca gcccggaaaa tacggtcgcc 2640

tatgaactga cggaccatgt gaacaaagac aaatggggca acatcatcgt cgtttataac 2700

ccgaacaaaa cggtcgccac aatcaatctt ccgagcggca aatgggcaat caatgccaca 2760

agcggcaaag ttggagaaag cacactggga caagcagaag gatcagtcca agtcccggga 2820

atcagcatga tgatccttca tcaagaagtc agcccggacc acggcaaaaa a 2871

<210> 6

<211> 957
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic modified pullulanase

<400> 6
 Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala Asp Gly Asn
 20 25 30

Thr Thr Thr Ile Ile Val His Tyr Phe Arg Pro Ala Gly Asp Tyr Gln
 35 40 45

Pro Trp Ser Leu Trp Met Trp Pro Lys Asp Gly Gly Gly Ala Glu Tyr
 50 55 60

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

Ile Pro Gly Asn Pro Ser Gln Val Gly Ile Ile Val Arg Thr Gln Asp
 85 90 95

Trp Thr Lys Asp Val Ser Ala Asp Arg Tyr Ile Asp Leu Ser Lys Gly
 100 105 110

Asn Glu Val Trp Leu Val Glu Gly Asn Ser Gln Ile Phe Tyr Ser Gln
 115 120 125

Lys Asp Ala Gln Asp Ala Ala Lys Pro Ala Val Ser Asn Ala Tyr Leu
 130 135 140

Asp Ala Ser Asn Gln Val Leu Val Lys Leu Ser Gln Pro Leu Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Glu Gly Ala Ser Gly Phe Thr Val His Asp Asp Thr Ala Asn Lys
 165 170 175

Asp Ile Pro Val Thr Ser Val Lys Asp Ala Ser Leu Gly Gln Asp Val
 180 185 190

Thr Ala Val Leu Ala Gly Thr Phe Gln His Ile Phe Gly Gly Ser Asp
 195 200 205

Trp Ala Pro Asp Asn His Ser Thr Leu Leu Lys Lys Val Thr Asn Asn
 210 215 220

Leu Tyr Gln Phe Ser Gly Asp Leu Pro Glu Gly Asn Tyr Gln Tyr Lys
 225 230 235 240

Val Ala Leu Asn Asp Ser Trp Asn Asn Pro Ser Tyr Pro Ser Asp Asn
 245 250 255

Ile Asn Leu Thr Val Pro Ala Gly Gly Ala His Val Thr Phe Ser Tyr
 260 265 270

Ile Pro Ser Thr His Ala Val Tyr Asp Thr Ile Asn Asn Pro Asn Ala
 275 280 285

Asp Leu Gln Val Glu Ser Gly Val Lys Thr Asp Leu Val Thr Val Thr
 290 295 300

Leu Gly Glu Asp Pro Asp Val Ser His Thr Leu Ser Ile Gln Thr Asp
 305 310 315 320

Gly Tyr Gln Ala Lys Gln Val Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Ser Ser
 325 330 335

Gln Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asp Asp Leu Gly Asn Thr Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ala Thr Thr Phe Lys Val Trp Ala Pro Thr Ser Thr Gln Val Asn Val
 355 360 365

Leu Leu Tyr Asp Ser Ala Thr Gly Ser Val Thr Lys Ile Val Pro Met
 370 375 380

Thr Ala Ser Gly His Gly Val Trp Glu Ala Thr Val Asn Gln Asn Leu
 385 390 395 400

Glu Asn Trp Tyr Tyr Met Tyr Glu Val Thr Gly Gln Gly Ser Thr Arg
 405 410 415

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

Asp Thr Met Ser Lys Ala Ala Ser Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly
 660 665 670

Ile Ala Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Ala Leu Pro
 675 680 685

Asp Asp Gln Leu Leu Thr Lys Gly Ala Gln Lys Gly Met Gly Val Ala
 690 695 700

Val Phe Asn Asp Asn Leu Arg Asn Ala Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp
 705 710 715 720

Ser Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Ala Thr Gly Leu Thr Asp Ala
 725 730 735

Ile Lys Asn Gly Val Glu Gly Ser Ile Asn Asp Phe Thr Ser Ser Pro
 740 745 750

Gly Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Tyr Thr Leu Trp
 755 760 765

Asp Lys Ile Ala Leu Ser Asn Pro Asn Asp Ser Glu Ala Asp Arg Ile
 770 775 780

Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Met Thr Ser Gln Gly Val
 785 790 795 800

Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn
 805 810 815

Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ala Val Asn Glu Phe Asp Trp Ser
 820 825 830

Arg Lys Ala Gln Tyr Pro Asp Val Phe Asn Tyr Tyr Ser Gly Leu Ile
 835 840 845

His Leu Arg Leu Asp His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asn Glu
 850 855 860

Ile Asn Ser His Leu Gln Phe Leu Asn Ser Pro Glu Asn Thr Val Ala
 865 870 875 880

Tyr Glu Leu Thr Asp His Val Asn Lys Asp Lys Trp Gly Asn Ile Ile
 885 890 895

Val Val Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Val Ala Thr Ile Asn Leu Pro Ser
 900 905 910

Gly Lys Trp Ala Ile Asn Ala Thr Ser Gly Lys Val Gly Glu Ser Thr
 915 920 925

Leu Gly Gln Ala Glu Gly Ser Val Gln Val Pro Gly Ile Ser Met Met
 930 935 940

Ile Leu His Gln Glu Val Ser Pro Asp His Gly Lys Lys
 945 950 955

<210> 7
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 cccccgctcg aggcctttct tttggaagaa aatatagga aaatggtact tgttaaaat 60

tcggaatatt tatacaatat catatgttta cattgaaagg gg 102

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 8
 tggaatctcg aggttttate ctttaccttg tctcc 35

<210> 9
 <211> 51
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

gcgttgctga ctgccggttt agcagctgct gaagctgcag aatgaggcag c

51

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

gctgcctcat tctgcagctt cagcagctgc taaaccggca gtcagcaacg c

51