



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0136033
(43) 공개일자 2014년11월27일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/52 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7028525(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2007년08월29일
심사청구일자 2014년10월10일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2009-7007937
원출원일자(국제) 2007년08월29일
심사청구일자 2012년08월29일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년10월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/018909</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/048392
국제공개일자 2008년04월24일</p> <p>(30) 우선권주장
11/583,334 2006년10월19일 미국(US)
11/809,104 2007년05월31일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
다니스코 유에스 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토
페이지 밀 로드 925</p> <p>(72) 발명자
애레 볼프강
네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베
크 30
에스텔 데이비드 에이
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인코리아나</p> |
|---|--|

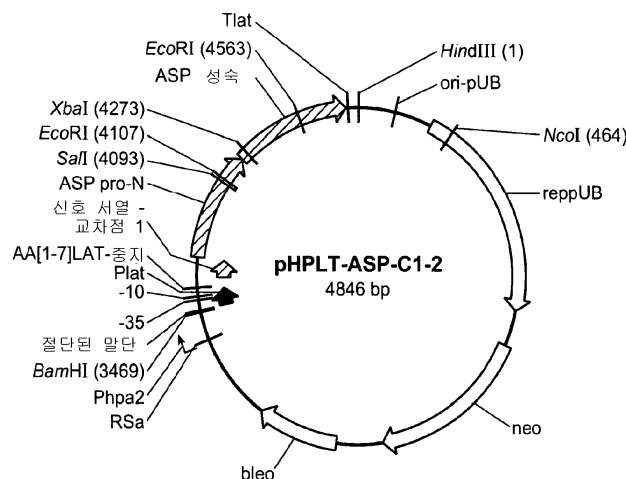
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 세린 프로테아제의 다중 돌연변이 변이체

(57) 요약

본 발명은 다중 치환을 가진 마이크로코시네아에 종(Micrococcineae spp.) 세린 프로테아제를 제공한다. 특히, 본 발명은 다중 치환을 가진 세린 프로테아제, 상기 프로테아제를 코딩하는 DNA, 프로테아제를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터, 벡터 DNA로 형질전환된 숙주 세포, 및 숙주 세포에 의해 생성된 효소를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물(예를 들어, 세제 조성물), 동물 먹이 조성물, 및 섬유 및 가죽 가공 조성물을 제공한다. 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 야생형 프로테아제 유래의 돌연변이(즉, 변이체) 프로테아제를 제공한다. 이러한 변이체 프로테아제는 또한 다양한 적용에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

호메스 로날뒤스 더블유.제이.

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베크
30

존스 브라이언 이

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베크
30

콜크만 마르크

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베크
30

레플랑 크리스

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베크
30

오 히로시

미국 45249 오하이오주 신시내티 메도우 블러프 코
트 8541

폴로즈 에이루카란 제이

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

쇼 앤드류

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크. 제넨코 디비전

반 데르 클라에이 빌헬름스 에이 에이치

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베크
30

반 마레베이크 레오

네덜란드 엔엘-2333 씨엔 라이덴 아르히메데스베크
30

특허청구의 범위

청구항 1

2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 단리된 세린 프로테아제 변이체.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 지금은 포기된 2003 년 11 월 19 일에 출원된 미국 가출원 특허 일련 번호 60/523,609 호에 대한 우선권을 주장하는, 2004 년 11 월 19 일에 출원된 PCT/US2004/039066 호에 대한 우선권을 주장하는 계류중인 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호의 일부 연속 출원인, 2006 년 10 월 19 일에 출원된 계류중인 미국 특허 출원 일련 번호 11/583,334 호의 연속인, 2007 년 5 월 31 일에 출원된 USSN 11/809,104 호의 국제 출원이다.

[0002] 기술분야

[0003] 본 발명은 다중 치환을 가진 신규 마이크로코시네아에 종 (Micrococcineae spp.) 세린 프로테아제를 제공한다. 특히, 본 발명은 다중 치환을 가진 세린 프로테아제, 상기 프로테아제를 코딩하는 DNA, 프로테아제를 코딩하는 DNA 를 포함하는 벡터, 벡터 DNA 로 형질전환된 숙주 세포, 및 숙주 세포에 의해 생성된 효소를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물 (예를 들어, 세제 조성물), 동물 먹이 조성물, 및 식물 및 가축제품 가공 조성물을 제공한다. 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 야생형 프로테아제 유래의 돌연변이 (즉, 변이체) 프로테아제를 제공한다. 이러한 변이체 프로테아제는 또한 다양한 적용에 사용될 수 있다.

배경 기술

[0004] 세린 프로테아제는 광범위한 특이성 및 생물학적 기능을 갖는 효소의 다양한 계열의 하위그룹이다 (예를 들어, Stroud, Sci. Amer., 131:74-88 [1974] 참조). 이의 기능 다양성에도 불구하고, 세린 프로테아제의 촉매 기작은 2 가지 이상의 유전적으로 구별된 효소 계열에 의해 대표된다: 1) 서브틸리신; 및 2) 포유동물 키모트립신-관련 및 상동 박테리아 세린 프로테아제 (예를 들어, 트립신). 상기 세린 프로테아제의 2 가지 계열은 현저하게 유사한 촉매작용 기작을 보인다 (예를 들어, Kraut, Ann. Rev. Biochem., 46:331-358 [1977] 참조). 게다가, 1 차 구조가 관련되지 않을지라도, 상기 2 가지 효소 계열의 3 차 구조는 세린, 히스티딘 및 아스파르트산으로 이루어진 아미노산의 보존된 촉매 3 개조와 함께 묶인다.

[0005] 대조적으로, 서브틸리신 및 키모트립신-관련 세린 프로테아제는 둘 다 아스파르트산, 히스티딘 및 세린을 포함하는 촉매 3 개조를 갖는다. 서브틸리신-관련 프로테아제에서 상기 아미노산의 상대적인 순서는, 아미노에서 카르복시 말단으로 해독하면 아스파르트산-히스티딘-세린이다. 그러나, 키모트립신-관련 프로테아제에서, 상대적인 순서는 히스티딘-아스파르트산-세린이다. 세정 및 먹이 적용에 유용성이 크기 때문에 서브틸리신에 대해 많은 연구를 수행하였다. 부가적인 작업은 다양한 적용에서 상기 효소의 기능성에 악영향을 끼칠 수 있는 열악한 환경 조건 (예를 들어, 산화제, 킬레이트제, 극도의 온도 및/또는 pH 에 대한 노출) 에 초점을 맞추고 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 열악한 조건에 저항성이고, 현재 업계에 공지된 것보다 개선된 활성을 보유하거나 가질 수 있는 효소계에 대한 업계에 필요성이 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명은 다중 치환을 가진 신규 마이크로코시네아에 종 (Micrococcineae spp.) 세린 프로테아제를 제공한다. 특히, 본 발명은 다중 치환을 가진 세린 프로테아제, 상기 프로테아제를 코딩하는 DNA, 프로테아제를 코딩하는 DNA 를 포함하는 벡터, 벡터 DNA 로 형질전환된 숙주 세포, 및 숙주 세포에 의해 생성된 효소를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물 (예를 들어, 세제 조성물), 동물 먹이 조성물, 및 식물 및 가축제품 가공 조성물을 제공한다. 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재

된 야생형 프로테아제 유래의 돌연변이 (즉, 변이체) 프로테아제를 제공한다. 이러한 변이체 프로테아제는 또한 다양한 적용에 사용될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0008]

본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 단리된 세린 프로테아제 변이체를 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 갖는 단리된 세린 프로테아제 변이체(들) 을 포함하는 조성물을 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 변이체 세린 프로테아제를 포함하고, 여기서 변이체 세린 프로테아제는 SEQ ID NO:8 에 언급된 세린 프로테아제와 면역학적 교차-반응성을 갖는다. 일부 추가적인 바람직한 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체의 서열은 하기 위치로부터 선택되는 2 개 이상의 아미노산 위치에서의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 96, 99, 100, 101, 103, 104, 105, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 및 189 .

[0009]

일부 바람직한 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

G12D, R14I, R14L, R14M, R14S, R16I, R16L, R16Q, N24E, N24H, N24M, N24T, N24W, R35E, R35F, R35H, T36S, G49A, G54D, G54L, R61V, A64K, G65Q, Q71F, Y75G, S76A, S76L, S76N, S76T, S76V, R79K, R79T, Q81K, Q81P, T86K, A93G, A93H, A93S, S99A, T109M, N112E, T116E, R123F, R123L, R123Q, R123S, R127A, R127K, R127Q, R159E, R159F, R159G, R159K, R159L, R159Q, R179N, R179Q, I181K, I181Q, I181T, D184N, D184T, 및 S187Q .

[0011]

일부 또 다른 추가의 바람직한 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

R16Q/R35F/R159Q, R16Q/R123L, R14L/R127Q/R159Q, R14L/R179Q, R123L/R127Q/R179Q, R16Q/R79T/R127Q, R16Q/R79T, R35E/R123L/R127Q/R179Q, 및 G12D/R35E/G63R/R79K/T109M .

[0012]

일부 또 다른 추가의 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기 치환 R123L, R127Q, 및 R179Q 를 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다.

[0013]

일부 추가의 바람직한 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

D2G, D2Q, V3I, V3L, N7A, N7L, N7S, I11A, I11Q, R14E,
N24A, N24E, N24H, N24L, N24M, N24Q, N24T, N24V, T36D, T36F, T36G, T36H, T36I, T36L,
T36N, T36P, T36R, T36S, T36V, T36W, T36Y, A38D, A38F, A38H, A38L, A38N, A38R, A38S,
G49F, S51A, G54A, G54D, G54H, G54K, G54L, G54M, G54R, N55F, A64H, A64N, A64R, A64W,
A64Y, G65L, G65P, G65Q, G65R, G65S, G65T, G65Y, G65V, V66A, V66D, V66E, V66H, V66I,
V66L, N67A, N67G, N67L, N67K, L69H, L69S, L69V, A70D, A70H, A70S, Q71A, Q71G, Q71H,
Q71I, Q71K, Q71M, Q71N, N73S, N73T, N74G, Y75F, Y75G, Y75I, S76L, S76Y, S76V, S76W,
G77S, G77T, G78A, G78D, G78H, G78N, G78S, G78T, R79P, V80H, V80L, Q81H, Q81K, Q81V,
H85Q, H85T, V90I, V90P, V90S, S92G, W103I, W103M, H104K, T109A, T109H, T109I, S114G,
T116F, P118A, P118F, P118H, P118R, E119K, E119R, N145E, N145I, N145Q, V150L, R159F,
N170Y, G177M, R179A, R179D, R179E, R179I, R179K, R179L, R179M, R179N, R179T, R179Y,
R179V, I181H, T183I, G186E, G186I, G186V, S187P, S187T, 및 S188M.

[0014]

[0015]

일부 부가적인 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

F1A, F1T, D2A, D2H, D2N, V3T, N7H, N7I, A8G, A8K,
T10G, T10K, I11S, I11T, G12W, G13M, S15F, N24F, N24S, A30S, R35F, T36C, A38G, A38I,
A38K, A38V, A38Y, T40S, T40V, A41N, N42H, F47I, F47M, G49A, G49K, G49L, S51F, S51Q,
G54I, G54Q, N55K, N55Q, R61M, T62I, G63Q, G63V, G63W, A64F, A64I, A64K, A64L, A64M,
A64Q, A64S, A64T, A64V, G65A, G65H, V66M, V66N, N67D, N67F, N67H, N67Q, N67R, N67S,
N67T, N67V, N67Y, L68W, L69W, A70G, Q71D, Q71F, Q71I, Q71L, Q71R, V72I, N73H, S76E, S76I,
S76K, S76A, S76N, S76Q, S76R, S76T, G77N, G77Y, G78I, S78R, G78V, R79G, V80F, Q81D,
Q81I, A83N, H85R, H85K, H85L, T86A, P89N, V90A, V90L, V90T, T107H, T107M, T107S,
T107V, T109G, T109L, T109P, T109R, A110S, A110T, N112I, P118E, P118I, P118K, P118Q,
R123E, R123I, I126L, R127F, I28L, T129S, E133Q, L142V, A143N, A143S, N145G, N145L,
N145T, V150M, T151L, R159E, T163L, Q167N, N170A, N170D, N170L, I71S, G177S, I181G,
I181N, T182V, T183K, T183M, D184F, D184H, D184Q, D184R, S185I, S185V, S187E, 및 S187L.

[0016]

[0017]

또다른 부가적인 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

D2P, A8G, T10C, T10L, I11E, I11Q, I11T, I11W, G12D,
G12I, G12N, G12Q, G12S, G12V, R14A, R14C, R14E, R14D, R14G, R14I, R14N, R14Q, R14S,
R14T, S15C, S15E, S15H, S15R, S15Y, R16C, R16D, R16E, R16T, R16V, A22C, A22S, N24E,
R35A, R35C, R35D, R35E, R35H, R35M, R35N, R35P, R35Q, R35S, R35T, R35V, T36C, A38C,
A38D, A41C, A41D, T44E, T46C, T46E, T46F, T46V, T46Y, F47R, A48E, G49A, G49C, G49E,
G49H, G49L, G49N, G49Q, G49V, G54C, N55G, D56L, Y57G, F59W, R61E, R61M, R61T, R61V,
G91Q, S99A, T100A, T100R, T107R, T109E, N112P, S113C, S114C, P118K, P118R, E119G,
E119R, E119T, E119V, E119Y, T121E, T121F, T121L, R123C, R123D, R123E, R123F, R123H,
R123N, R123Q, R123S, R123T, R123V, R123W, R123Y, G124D, L125Q, R127D, R127E, R127K,
R127Q, R127S, P134R, T151C, T151L, S155C, S155I, S155W, S155Y, R159D, R159E, R159Q,
R159S, R159T, R159V, T163D, F165E, F165W, Q167E, N170C, N170D, G177D, R179D, R179E,
및 M180L.

[0018]

또다른 부가적인 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

FIN, F1P, D2I, D2M, D2T, D2V, A8R, A8T, T10D, T10E,
T10F, T10M, T10Q, T10Y, G12H, G12P, G12Y, G13D, G13E, R14H, R14L, R14M, S15F, S15G,
S15N, R16I, R16Q, N24G, N24T, I28V, R35K, T36V, A41S, A41T, N42D, T44C, F47V, G49F,
G49K, G49S, S51A, S51C, S51L, S15M, G54E, N55A, D56F, R61K, R61Q, A64C, G65D, V66N,
A70G, A70M, A70P, R79T, R79V, Q81A, Q81G, Q81P, A83E, A83D, A83H, T86E, A87C, A87E,
A88F, S92T, S99G, S99H, S99K, S99Q, T100K, T100Q, W103L, T109K, N112D, N112E, S113A,
S113D, S114E, T115C, T116G, T116N, P118A, P118C, P118G, P118W, E119A, E119L, E119N,
E119Q, E119S, T121A, T121D, R123A, R123G, R123I, R123K, R123M, A132S, L125M, R127A,
R127C, T128A, S140P, L141M, T151V, S155E, S155F, S155T, S155V, N157D, R159A, R159C,
R159K, R159M, R159N, T160D, T163C, F165H, N170L, I172A, Q174C, Q174S, Q174T, A175T,
G177E, R179C, R179F, R179I, R179L, R179M, R179N, R179S, R179T, R179V, R179W, R179Y,
S187E, 및 S188E.

[0019]

[0020]

일부 추가의 구현예에서, 본 발명은 세린 프로테아제 변이체를 제공하고, 여기서 프로테아제의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

V3R, I4D, I4G, I4P, Y9E, Y9P, T10F, T10W, T10Y, G12D,
S18E, A22C, A22S, A22T, N24T, G26E, G26I, G26K, G26Q, G26V, G26W, F27V, F27W, I28P,
I28T, T29E, A30M, A30N, A30P, A30Y, G31H, G31M, G31N, G31V, G31Y, C33E, C33L, C33M,
C33N, A38D, A38G, T39R, T40D, T40H, T40N, T40P, T40Q, R43D, P43G, P43H, P43K, P43L,
P43N, G45A, G45V, T46V, T46Y, T46W, A48P, Y57M, Y57N, F59K, T62G, T62R, A70G, A70P,
N73P, R79T, Q81A, Q81D, Q81F, Q81G, Q81H, Q81P, Q81S, A83H, G84C, G84P, P89W, G91L,
A93S, R96C, R96E, R96F, S99A, T100A, C105E, C105G, C105K, C105M, C105N, C105P, C105S,
C105W, T121E, R123F, R123N, R123W, R123Y, L125A, T128A, T128C, T128G, T128S, T128V,
I28W, T129W, S137R, S140P, Q146P, A147E, S155F, S155K, S155P, S155R, S155W, S155Y,
G156I, G156L, G156P, C158G, C158H, C158M, R159K, T160I, G161I, G161L, G161V, T164G,
T164L, F166S, Q167L, P168Y, Y176P, G186S, 및 S188A.

[0021]

일부 구현

예에서, 세린 프로테아제 변이체의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

A8G, T10C, T10L, G12A, G12H, S15C, S15N, S15Q, S15R,
S15T, N24E, N24S, G25S, F27I, G31A, H32A, C33D, T36V, T39V, A41S, T46F, G49A, S51V,
F59W, Q71A, Q71Y, N74F, R79V, Q81C, Q81E, A83E, A83F, A83M, A83R, G84M, G84V, T86I,
T86M, T86S, A87E, A87S, P89A, V90A, V90M, S92T, A93D, S99G, T100Q, T101S, W103N,
C105A, C105L, C105T, C105Y, T107A, T107F, T107L, T107Q, T107S, T110D, A110G, L111K,
V115I, V115L, T116Q, Y117K, Y117Q, Y117R, Y117V, P118T, E119L, T121A, T121D, R123I,
R123K, R123L, R123Q, R123T, L125M, R127F, R127K, R127Q, T129Y, V130T, A132C, P134W,
L141C, A143H, G144A, V150N, T151C, G153K, G153V, G154L, G154R, S155T, R159Q, R159T,
R159V, T160E, T160Q, G161K, G162P, T163I, F166A, F166C, P168I, N170D, N170E, G177N,
R179K, M180L, T182L, T183A, T183I, T183P, S185R, G186P, S188C, S188E, S188G, S188M,
S188T, S188V, 및 P189S.

[0022]

[0023]

본 발명은 추가로 세린 프로테아제 변이체를 제공하고, 여기서 프로테아제의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

F1T, T10N, R14D, R14G, R14I, R14L, R14N, R14Q, R14T,
N24A, N24E, N24H, N24L, N24Q, N24T, N24V, R35A, R35E, R35F, R35L, R35Q, R35T, T36G,
T36I, T36N, T36S, A38D, A38F, A38H, A38N, A38R, G49A, G49S, S51D, G54D, G54E, N55E,
N55F, A64I, G65D, G65P, G65Q, G65S, G65T, G65V, N67D, L69S, N73T, N74G, Y75F, Y75G,
S76D, S76E, S76I, S76L, S76N, S76T, S76V, S76Y, G77T, G78A, G78D, R79A, R79D, R79E,
R79G, R79L, R79M, R79P, R79S, R79T, R79V, Q81E, A83E, H85Q, H85T, T86D, T86E, V90I,
V90P, V90S, V90T, S99N, S99V, T107E, T107H, T107S, T107V, T109E, N112D, N112E, N112L,
N112Q, N112V, T116E, T116Q, T121E, R123A, R123D, R123E, R123F, R123H, R123I, R123L,
R123N, R123Q, R127A, R127Q, T129S, L142V, N145E, R159D, R159E, R159F, R159N, R159Q,
N170D, N170Y, I172T, R179A, R179D, R179E, R179I, R179K, R179M, R179N, R179T, R179V,
R179Y, I181L, 및 G186N.

[0024]

[0025]

일부 대안적인 구현예에서, 프로테아제의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

F1D, V3L, N7L, A8E, A8G, T10D, T10E, G12D, G13S,
R14A, R14K, R14S, R14M, S15W, I19V, N24M, R35H, R35M, R35S, R35W, R35Y, T36D, T36H,
A38L, A38S, A38T, A38Y, T40V, A41D, A41N, A48E, G49F, G49H, S51H, S51Q, S51T, S51V,
R61E, R61H, R61M, R61S, R61T, G63D, A64F, A64H, A64L, A64M, A64N, A64P, A64Q, A64S,
A64T, A64V, A64W, A64Y, G65L, G65Y, N67E, N67G, N67H, N67S, N67T, A70D, A70G, A70H,
Q71D, Q71G, Q71H, Q71S, V72I, S76Q, S76W, G77S, Q81D, Q81H, Q81V, H85L, H85M, V90N,
S92A, S92G, A93D, A93E, A93S, S99D, S99T, T101S, W103M, T107A, T107I, T107M, T107N,
T109A, T109G, T109I, A110S, N112Y, S113T, S114A, V115A, T116F, T121D, N121I, R123G,
R123S, R123T, R123V, R123Y, R127H, R127K, R127E, R127S, R127Y, N145D, N145T, R159A,
R159C, R159K, R159L, R159S, R159Y, T160E, T163D, N170L, R179L, T182V, T183E, T183I, 및
S185N.

[0026]

[0027]

일부 또다른 부가적인 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

D2Q, V3L, N7L, I11A, I11Q, R14I, R14M, R16L, R16Q,
N24A, N24E, N24H, N24M, N24Q, N24T, N24V, R35F, R35L, T36D, T36G, T36H, T36I, T36L,
T36N, T36P, T36S, T36W, T36Y, A38L, A38R, A38S, A48Q, G49A, G54D, G54I, G54Q, G54N,
R61V, A64F, A64H, A64Y, G65L, G65P, G65Q, G65S, G65T, G65Y, V66H, N67A, N67G, N67L,
N67S, N67V, N67Y, L69H, L69S, Q71I, N73T, N74G, Y75F, Y75G, Y75I, S76A, S76D, S76E,
S76I, S76L, S76N, S76T, S76V, S76W, S76Y, G77T, G78D, R79G, R79P, Q81P, H85F, H85K,
H85L, H85Q, H85R, P89D, S92A, A93T, A93S, S99A, S99D, S99N, S99T, S99W, T109E, N112E,
S113A, S114G, T116F, T121D, R123F, R123I, R123L, R127A, R127F, R127G, R127H, R127K,
R127L, R127Q, R127S, R127T, R127Y, A132V, P134E, A143N, N157D, R159D, R159E, R159F,
R159H, R159K, R159N, R159Y, G161K, N170Y, R179V, I181Q, D184F, D184H, G186E, G186I,
G186V, 및 S187P.

[0028]

[0029]

일부 부가적인 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

F1T, A8D, A8G, T10E, T10L, T10Q, I11L, I11S, I11T,
G12D, G12Y, R14E, R14L, R14N, R14P, S15E, R16A, R16G, R16I, R16N, N24L, N24S, V31F,
R35A, A38D, A38F, A38N, A38V, A38Y, T40V, A41N, N42H, G49F, G49H, G49S, S51Q, S51T,
G54A, G54L, G54M, N55F, R61H, R61K, R61M, R61S, R61T, A64N, A64S, A64T, A64V, A64W,
G65R, G65V, V66D, N67F, N67K, N67M, N67Q, N67T, L69W, A70G, A70P, Q71D, Q71F, Q71H,
Q71L, Q71T, G77N, G77S, G78A, G78N, R79D, V80H, V80L, H85T, H85Y, T86N, A88F, P89N,
P89V, V90I, V90P, V90T S92G, A93D, A93E, S99G, L111D, L111E, N112D, N112G, N112L,
N112Q, S113G, T121E, R123E, R123K, R123Q, L125V, P134G, S140A, L142V, A143S, N145D,
V150L, R159A, R159C, R159L, R159V, T160E, G161E, T163D, T163I, N170D, N170L, R179D,
R179E, R179K, R179N, R179T, I181H, T183I, D184R, D184L, D184Q, D184T, S185W, S185I,
G186L, S187E, S187Q, 및 S188Q.

[0030]

[0031]

일부 또다른 추가의 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

A8R, A8S, A8T, A8V, R14E, R14L, R14M, R16Q, N24A,
N24E, N24Q, N24T, R35F, R35L, T36D, T36G, T36I, T36N, T36P, T36S, A38D, A38F, A38L,
A38R, A38S, S51A, S51D, G54D, G54I, N55E, N55F, N55S, R61M, R61T, G63V, A64H, A64N,
A64S, G65Q, G65P, G65R, G65S, G65T, G65Y, V66D, N67D, S76E, N67F, N67G, N67L, N67M,
N67S, N67T, N67V, N67Y, L69H, L69S, L69V, L69W, N73T, N74G, Y75F, Y75G, S76C, S76D,
S76I, S76L, S76N, S76W, S76Y, S76V, G77T, G78D, R79C, R79D, R79E, R79G, R79P, Q81V,
A83N, T85A, H85Q, T86F, T86I, T86L, V90I, V90N, V90P, V90S, V90T, A93D, A93E, T107M,
T107N, T107S, T109A, T109E, T109I, N112E, T121D, T121E, R123D, R123E, R123F, R123I,
I126L, R127A, R127H, R127K, R127L, R127Q, R127S, R127Y, P134A, P134E, L142V, A143N,
N145E, N145S, R150Y, R159C, R159D, R159E, R159F, R159K, R159Q, G161E, T163D, N170Y,
I172V, G177M, R179A, R179D, R179E, R179I, R179K, R179L, R179M, R179N, R179T, R179V,
R179Y, M180D, T182V, T183I, G186E, G186V, 및 S187P.

[0032]

[0033]

일부 또다른 추가의 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

V3L, I4M, A8E, A8H, A8L, A8N, A8P, I11T, R14I, R14Q,
R16L, N24H, N24L, N24M, N24V, R35A, R35E, T36V, T36Y, A38H, A38I, A38N, T40V, A41N,
G49A, G49L, S51F, S51Q, G54A, G54E, G54M, G54Q, N55Q, N55V, R61V, T62I, G63D, G63L,
G63P, G63Q, A64F, A64I, A64L, A64M, A64Q, A64R, A64T, A64V, A64W, G65A, G65D, V66E,
N67A, N67C, N67Q, N67R, L69Q, A70G, A70P, A70S, Q71D, Q71M, S76A, S76Q, S76T, G77N,
G77Q, R79L, Q81E, Q81H, Q81I, A83D, A83I, H85L, H85R, T86E, T86M, A88F, V90L, S92C,
S92G, A93Q, R96K, T101S, W103M, W103Y, T107A, T107E, T107H, T107Q, T107V, T109G,
T109H, T109L, T109N, A110S, A110T, N112D, S114G, T116F, T121L, R123A, R123H, R123K,
R123L, R123P, R123Q, L125V, R127F, R127T, T129G, T129S, A132V, P134D, P134G, S140A,
N145G, N145P, N145Q, N145T, Q146D, T151V, R159A, R159H, R159L, R159N, R159V, S161K,
F166Y, N170C, N170D, P171M, A175T, A175V, Y176L, R179W, T182W, T183E, T183K, T183L,
T183Q, G186I, G186L, G186P, G186T, S187E, S187T, 및 S188E.

[0034]

일부 추가적인 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체의 아미노산 서열은 하기로부터 선택되는 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

T10A, T10G, T10L, I11A, I11S, I11T, G12I, R14G, R14M,
S15E, S15F, S15G, R16K, R16N, A22V, N24A, N24E, N24L, N24Q, N24T, N24V, G34A, T36G,
T36I, T36N, T36S, A38F, A38T, G49A, G49F, S51A, G65V, L69H, L69S, Q71I, N73T, N74G,
S76D, S76L, S76V, S76W, S76Y, G77T, V80A, V90I, V90P, S99N, S99V, T107K, T107R, N112S,
S118A, E119R, R127F, P134D, P134E, P134H, P134L, P134R, P134V, S140A, L142V, V150L,
I59F, R159K, T163I, F166Y, Q167N, N170Y, R179V, T182V, G186E, G186S, 및 G186V.

[0035]

[0036]

또한 본 발명은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 개선된 안정성을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 제공한다. 일부 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 개선된 열안정성을 갖는다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

T121E/R123F/R159E, R79T/R127Q/R179Q, R16Q/R79T/R127Q,
R16Q/R79T/R123L/R159Q/R179Q, R16Q/R79T/R123L, R16Q/R79T, R16Q/R123L/R159Q,
R14Q/T121E, R14L/R79T, R123L/R159Q, R123L/R127Q/R159Q,
G12D/S15E/R35D/R123F/R159E, G12D/S15E/R159E, G12D/S15E, G12D/R35H/T121E/R123Q,
G12D/R35H/R123Q, G12D/R35H/R123F/R159E, G12D/R35H, G12D/R35E/R123Q, G12D/R35E,
G12D/R159E, G12D/R14Q/S15E/R35D, G12D/R14Q/R35H, G12D/R14Q/R159E, G12D/R14E,
G12D/R127Q/R159E, G12D/R123E/R159E, 및 R35E/R123L/R127Q/R175Q.

[0037]

[0038]

일부 대안적인 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 개선된 LAS 안정성을 갖는다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

T121E/R123F/R159E,
S15E/T121E/R123Q, S15E/R35H/R159E, S15E/R35E/R159E, S15E/R35E/R127Q/R159E,
S15E/R35E, S15E/R35D/T121E/R123Q, S15E/R35D/R123Q, S15E/R35D/R123F/R159E,
S15E/R35D, S15E/R159E, S15E/R127Q, S15E/R123Q, S15E/R123E, R79T/R127Q/R179Q,
R35H/R159E, R35H/R127Q/R159E, R35H/R123D/R159E, R35F/R61S/R159Q, R35F/R159Q,
R35E/T121E/R123E, R35E/R159E, R35E/R127Q, R35D/R159E, R35D/R127Q/R159E,
R35D/R127Q, R35D/R123Q/R159E, R16Q/R79T/R159Q/R179Q, R16Q/R79T/R127Q,
R16Q/R79T/R123L/R159Q/R179Q, R16Q/R79T/R123L/R159Q, R16Q/R79T/R123L, R16Q/R79T,
R16Q/R61S/R159Q/R179Q, R16Q/R61S/R123L/R159Q, R16Q/R35F/R61S/R159Q,
R16Q/R35F/R159Q, R16Q/R35F/R123L/R159Q, R16Q/R35F, R16Q/R159Q/R179Q, R16Q/R159Q,
R16Q/R127Q/R179Q, R16Q/R127Q/R159Q, R16Q/R123L/R159Q, R14Q/T121E,

[0039]

R14Q/R35E/T121E, R14Q/R35E/R159E, R14Q/R35E, R14Q/R35D/R127Q,
R14Q/R35D/R123E/R159E, R14Q/R35D/R123D/R159E, R14Q/R35D, R14Q/R123Q,
R14L/R79T/R127Q/R159Q, R14L/R79T, R14L/R61S/R79T/R123L, R14L/R61S/R123L,
R14L/R35F/R79T/R123L/R159Q, R14L/R35F/R61S, R14L/R127Q/R159Q/R179Q,
R14L/R123L/R159Q, R14I/R35E/T121E/R159E, R14I/R35E/R127Q, R14I/R35E/R123E,
R14I/R35D/R159E, R14I/R35D/R127Q/R159E, R14E/S15E/R35H, R14E/R35H/R127Q,
R14D/S15E/R35E/R159E, R14D/R35H/R123Q/R159E, R127Q/R159E, R127Q/R159Q,
R123Q/R159E, R123Q/R127Q/R159E, R123L/R159Q, R123L/R127Q/R159Q, R123F/R159E,
R123E/R127Q/R159E, R123E/R127Q, G12D/S15E/R35H/R159E,
G12D/S15E/R35H/R123F/R127Q/R159E, G12D/S15E/R35E/R159E, G12D/S15E/R35D/R127Q,
G12D/S15E/R35D/R123F/R159E, G12D/S15E/R35D/R123E, G12D/S15E/R35D,
G12D/S15E/R159E, G12D/S15E, G12D/R35H/T121E/R123Q, G12D/R35H/R159E,
G12D/R35H/R123Q/R159E, G12D/R35H/R123Q, G12D/R35H/R123F/R159E, G12D/R35H,
G12D/R35E/R159E, G12D/R35E/R123Q/R159E, G12D/R35E/R123Q, G12D/R35E,
G12D/R35D/R159E, G12D/R35D/R127Q, G12D/R35D/R123Q/R159E, G12D/R35D, G12D/R159E,
G12D/R14Q/S15E/R35D, G12D/R14Q/R35H, G12D/R14Q/R35E/R127Q/R159E,
G12D/R14Q/R35D/R123H, G12D/R14Q/R159E, G12D/R14I/R35H, G12D/R14E,
G12D/R14D/R35H/R123D/R127Q, G12D/R127Q/R159E, G12D/R123E/R159E, R127A/R159K,
R14I/G65Q, R14I/G65Q/N67L/R159K, R14I/G65Q/N67L/Y75G/R127A/R159K,
R14I/G65Q/R159K, R14I/G65Q/S76V/R127A/R159K, R14I/R127A, R14I/R127A/R159K,
R14I/R159K, R14I/R35F, R14I/R35F/G65Q, R14I/R35F/G65Q/R127A/R159K,
R14I/R35F/N67L/R127A/R159K, R14I/R35F/R127A/R159K, R14I/R35F/R159K, R14I/S76V,
R14I/T36S/G65Q/R127A/R159K, R35F/R127A/R159K, R35F/S76A/R127A,
024A/G049A/A093H/S099N/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024A/S076A/A093H/S099G/R127K/R159K, N024A/S076T/A093S/S099G/R127K/R159K,
N024E/G049A/A093G/S099G/R127K/A143N/R159K/I181T,
N024E/G049A/A093H/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024E/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T/V090I,
N024E/G049A/A093S/S099D/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024H/G049A/A093T/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024H/S076A/A093G/S099G/R127K/R159K, N024H/S076A/A093H/S099G/R127K/R159K,
N024H/S076A/A093S/S099A/R127K/R159K/G054H/L069H,
N024H/S076A/A093T/S099G/R127K/R159K, N024H/S076N/A093Q/S099W/R127K/R159K,
N024H/S076V/A093Q/S099G/R127K/R159K,
N024L/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024L/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q, N024L/S076V/A093H/S099G/R127K,

[0040]

N024L/S076V/A093S/S099A/R127K/R159K,
 N024M/G049A/A093G/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024M/G049A/A093H/S099D/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024M/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024M/G049A/A093S/S099W/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024Q/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
 N024Q/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024Q/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
 N024Q/S076A/A093H/S099A/R127K/R159K/T039N,
 N024Q/S076A/A093H/S099W/R127K/R159K, N024Q/S076I/A093T/S099G/R159K,
 N024Q/S076T/A093S/R127K/R159K, N024S/S076A/A093G/S099G/R127K/R159K/G054A,
 N024S/S076A/A093H/S099T/R127K/R159K, N024S/S076A/A093S/S099W/R127K/R159K,
 N024S/S076A/A093T/S099W/R127K, N024S/S076T/A093Q/S099W/R127K/R159K,
 N024S/S076Y/A093T/S099A/R127K/R159K,
 N024T/G049A/A093G/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024T/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024T/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
 N024T/G049A/A093H/S099D/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024T/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
 N024T/G049A/A093T/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
 N024T/S076N/A093Q/S099T/R127K/R159K, N024T/S076T/A093T/S099N/R127K/R159K,
 N024V/S076A/R127K/R159K, N024V/S076V/A093Q/S099G/R127K/R159K,
 N024W/A093G/S099W/R127K/R159K,
 N024W/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024W/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181K,
 N024W/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024W/S076A/A093T/S099A/R127K/R159K, N024W/S076I/A093Q/S099G/R127K/R159K,
 N024W/S076N/A093T/S099G/R159K, N024W/S076T/A093H/S099A/R127K/R159K,
 N024W/S076T/A093H/S099W/R127K/R159K, N024W/S076V/A093H/S099A/R127K/R159K,
 N024W/S099W/R127K/R159K, N24A/G54E/S76D/A93G/R127K/R159K,
 N24E/A93G/R127K/R159K, N24E/G54L/S76E/A93G/R127K/R159K,
 N24E/G54Q/A93S/R127K/R159K, N24E/S76D/A93T/R127K/R159K, N24H/A93H/R127K/R159K,
 N24H/G54E/A93G/R127K/R159K, N24H/S76D/A93H/R127K/R159K, N24L/A93G/R127K/R159K,
 N24L/G54E/A93G/R127K/R159K, N24L/G54L/A93G/R127K/R159K,
 N24L/G54Q/S76A/A93H/R127K/R159K, N24L/S76T/A93G/R127K/R159K,
 N24L/S76T/A93H/R127K/R159K, N24M/A93G/R127K/R159K, N24M/A93H/R127K/R159K,

[0041]

N24M/A93S/R127K/R159K, N24M/A93T/R127K/R159K, N24M/G54E/A93H/R127K/R159K,
 N24M/G54E/S76N/A93S/R127K/R159K, N24M/G54I/A93H/R127K/R159K/S187I,
 N24Q/A93G/R127K/R159K, N24Q/G54D/A93H/R127K/R159K, N24Q/G54I/A93G/R127K/R159K,
 N24Q/G54I/S76E/A93H/R127K/R159K, N24Q/G54Q/A93G/R127K/R159K,
 N24Q/G54Q/S76T/A93H/R127K/R159K, N24Q/S76A/A93G/R127K/R159K,
 N24T/G54D/S76V/A93G/R127K/R159K, N24T/G54E/S76V/A93H/R127K/R159K,
 N24T/G54I/A93G/R127K/R159K, N24T/G54N/A93H/R127K/R159K,
 N24T/G54Q/S76N/A93G/R127K/R159K, N24T/G54Q/S76V/R127K/R159K,
 N24T/S76I/R127K/R159K, N24T/S76L/A93G/R127K/R159K, N24W/A93G/R127K/R159K,
 N24W/G54D/A93H/R127K/R159K, N24W/G54I/S76A/A93H/R127K/R159K,
 N24W/S76A/A93H/R127K/R159K, N24W/S76E/A93G/R127K/R159K,
 R014I/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T, R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181T,
 R014I/S076D/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T,
 R014I/S076E/A093S/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076E/A093T/R127K/R159K/I181K,
 R014I/S076I/A093S/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076N/A093H/R127K/R159K/I181Q,
 R014I/S076T/A093G/R127K/R159K/I181Q, R014K/S076A/A093G/R127K/R159K/I181K,
 R014K/S076E/A093H/R127K/R159K/I181K, R014K/S076T/A093H/R127K/R159K/I181Q,
 R014L/S076A/A093H/R127K/R159K, R014L/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q,
 R014L/S076D/A093H/R127K/R159K/I181T, R014L/S076E/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014M/S076A/A093G/R127K/R159K/I181K, R014M/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076A/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181K,
 R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093T/R127K/R159K/I181Q,
 R014M/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076E/A093G/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076E/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076E/A093S/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181K, R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076N/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014M/S076N/A093H/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076N/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076N/A093T/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076T/A093H/R127K/R159K/I181K, R014M/S076V/A093G/R127K/R159K/I181Q,
 R014M/S076V/A093H/R127K/R159K/I181Q, G54E/R14L, G54L/R127S, N24D/G54F/R127C,
 N24E/R127S, N24E/R159C, N24G/G54I/R127S, N24H/R159Y/T46I, N24I/R127V/R14V,
 N24T/R127Q/R179F, R127A/R159V/R179F, R127C/R14W, R127S/R159N/R123L,
 R14A/N24F/R159L, R14A/R127L, R14A/R127Y/R159W, R14A/R159W, R14C/S114F/R159G,
 R14F/R127L/R159F, R14F/R127Q/R159W, R14F/R127S/R159V, R14F/R127V/R159F,
 R14G/N24L/R159G, R14G/N24S/R127C, R14G/R127C/G63E, R14G/R127G, R14G/R127P,
 R14L/N24S/R159F, R14L/N24V/R127S/R159I, R14L/R123L, R14L/R127C/R159G, R14L/R127S,

[0042]

R14L/R127S/R159G, R14L/R127V, R14L/R127V/R159F, R14L/R127W/R123Y, R14L/R127Y,
R14L/R127Y/R159F, R14L/R159G, R14L/R159L, R14L/R159S, R14L/R159V, R14L/R159W,
R14M/N24L/R159S/R123V, R14M/R159F, R14Q/R123F, R14S/N24E/R127W, R14S/N24L/R159G,
R14S/R127L/R159F, R14S/R127V, R14T/R14P/R159F, R14T/N24A, R14T/N24T/R127Q,
R14T/N24T/R127Y/R159W, R14T/R127Y, R14V/N24A/R127I/R159A, R14V/N24D/R127C,
R14V/N24G/P189S, R14V/N24S, R14V/N24Y/R127S/R159G, R14V/R127A, R14V/R127C/R159S,
R14V/R127M/R159V, R14V/R127S/R159G, R14V/R127T/R159Y, R14V/R127V, R14V/R159F,
R14V/R159V, R14V/R159W, R14W/N24T/R123E, R14W/R123L, R14W/R123V,
R14W/R127Q/R159W, R14W/R159V, R159V/G49D, G012D/R035E/G065E, G012D/R035E/G065E,
G012D/R035E/Q081P, G012D/R035E/R016S/A064T, G012D/R035E/R159W,
G012D/R035E/R179I, G012D/R035E/S092T/I181V, R14I/N24A/A64K/R123F/R159E/D184T,
R14I/A64K/R123F/R159F/D184T, R14I/A64K/R123F/R159E/D184T,
R14I/N24Q/R35E/A64K/R123F/D184T, R14I/N24Q/A64K/N67S/R123F/R159F/D184T,
R14I/N24A/R35E/A64K/N67S/R123F/R159E/D184T,
R14I/N24A/R35E/A64K/N67S/G78D/R123F/D184T,
R14I/N24A/R35D/A64K/G78D/R123F/R127K/R159E/D184T,
R14I/N24A/R35D/A64K/R123F/R127K/R159F/D184T,
R14I/N24T/R35D/A64K/G78D/R123F/R127Q/R159F/D184T, R14I/A64K/R123F/D184T,
R14I/N24A/A64K/R123F/R159N/D184T, R14I/N24Q/R35D/A64K/N67S/R123F/R159K/D184T,
R14I/N24E/R35E/A64K/G78D/R123F/R127Q/R159F/D184T,
R14I/N24E/A64K/R123F/R127K/R159K/D184T, R14I/N24A/A64K/R123F/D184T,
R14I/A64K/R123F/R127K/R159F/D184T, R14I/A64K/R123F/R159E/D184T,
R14I/A64K/R123F/R159N/D184T, R14I/A64K/R123F/R159K/D184T,
R14I/A64K/R123F/R127Y/R159E/D184T, R14I/N24A/R35E/A64K/N67A/G78D/R123F/D184T,
R14I/A64K/R123F/R127Y/R159K/D184T, R14I/N24Q/A64K/R123F/R127Q/R159K/D184T,
R14I/A64K/R123F/R159K/D184T, R14I/N24Q/A64K/G78D/R123F/R127Q/R159N/D184T,
R14I/N24E/A64K/N67L/G78D/R123F/R159K/D184T,
R14I/N24A/R35E/A64K/G78D/R123F/R127K/R159E/D184T,
R14I/N24Q/R35D/A64K/N67S/R123F/R159K/D184T,
R14I/N24A/R35D/A64K/N67A/R123F/R159F/D184T,
R14I/N24E/R35E/G54D/A64K/N67L/G78D/R123F/R127K/D184T,
R14I/A64K/G78D/R123F/R127Q/R159N/D184T,
R14I/N24A/R35E/A64K/G78D/R123F/R159N/D184T, R14I/A64K/R123F/R127K/R159E/D184T,
R14I/N24A/R35E/A64K/N67S/G78D/R123F/R127K/R159F/D184T,
R14I/A64K/G78D/R123F/R159E/D184T,
R14I/N24E/R35D/A64K/N67A/G78D/R123F/R159K/D184T, N24T/R35D/G78D/R159K,

[0043]

N24T/R35E/N67A/G78D/R127Q, N24Q/R35E, R127K/R159N, R35D/R159E,
R35E/G54D/N67S/G78D/R159K, N24Q/G54D/G78D/R159N, R127K/R159E, R127Q/R159K,
N24E/R35E/G54D/N67S/R127K/R159N, R35D/G78D/R159K, N67S/R159E, G54D/R127K/R159K,
G78D/R127K/R159K, G78D/R127K/R159E, N24E/R35D/G78D/R127K/R159N,
R35D/G78D/R127K/R159N, N24A/R35E/G78D/R159N, N24Q/R35D/N67S/R127K/R159E,
N24T/R35D/G78D/R159K, N67S/G78D/R127K/R159K, N24Q/R35D/R127K/R159K,
N24E/G54D/G78D/R159K, R35D/R159K, R35E/R159K, R127K/R159K, R35E/N67S/G78D/R127Q,
N24E/R35D/G78D, R35D/G78D/R127K/R159E, N24E/R35E/G54D/N67S/G78D/R127K/R159K,
N24T/N67S/R159E, N24D/R35D/G78D/R159F, N24Q/R35D/N67S/G78D/R127K/R159F,
R35D/G78D/R127Q/R159K, G78D/R159F, N24A/N67S/R159K, G78D/R127Q/R159K,
N24T/G54D/N67S/G78D/R127Y/R159E, R14I/A63K/G78D/R123F/D184T,
R14I/A63K/R123F/R159E/D184T, R14I/A63K/R123F/R159F/D184T,
R14I/A63K/R123F/R159K/D184T, R14I/A63K/R123F/R159N/D184T, R14I/A63K/R123K/D184T,
R14I/A63K/R123Q/D184T, R14I/A63K/R123Y/D184T, R14I/A64K/G78D/T86K/T116E/R123F,
R14I/A64K/T86K/T116E/R123F/R159E, R14I/A64K/T86K/T116E/R123F/R159K,
R14I/A64K/T86K/T116E/R123K, R14I/A64K/T86K/T116E/R123Q,
R14I/A64K/T86K/T116E/R123Y, R14I/G54D/A63K/R123F/D184T,
R14I/G54D/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/G54D/S76N/A93H/R127K/R159K/I181Q,
R14I/G54D/S76V/A93S/R127K/R159K/I181K, R14I/N24A/A63K/R123F/D184T,
R14I/N24A/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/N24E/A63K/R123F/D184T,
R14I/N24E/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/N24Q/A63K/R123F/D184T,
R14I/N24Q/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/N24T/A63K/R123F/D184T,
R14I/N24T/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/N24TS76N/A93H/R127K/R159K/I181Q,
R14I/N24TS76V/A93S/R127K/R159K/I181K, R14I/N67AS76N/A93H/R127K/R159K/I181Q,
R14I/N67LS76N/A93H/R127K/R159K/I181Q, R14I/N67SS76N/A93H/R127K/R159K/I181Q,
R14I/R35D/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/R35D/S76N/A93H/R127K/R159K/I181Q,
R14I/R35E/A63K/R123F/D184T, R14I/R35E/A64K/T86K/T116E/R123F,
R14I/R35E/S76N/A93H/R127K/R159K/I181Q, R14I/R35E/S76V/A93S/R127K/R159K/I181K,
R14I/R35K/A63K/R123F/D184T, R14I/S76N/A93H/R127K/R159E/I181Q,
R14I/S76N/A93H/R127K/R159F/I181Q, R14I/S76N/A93H/R127K/R159N/I181Q,
R14I/S76N/A93H/R127Q/R159K/I181Q, R14I/S76N/A93H/R127Y/R159K/I181Q,
R14I/S76N/G78D/A93H/R127K/R159K/I181Q, R14I/S76V/A93S/R127K/R159F/I181K,
R14I/S76V/A93S/R127K/R159N/I181K, R14I/S76V/A93S/R127Q/R159K/I181K,
R14I/S76V/A93S/R127Y/R159K/I181K, R14M/G54D/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K,
R14M/N24A/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K, R14M/N24E/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K,
R14M/N24Q/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K, R14M/N24T/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K,

R14M/N67S/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K, R14M/R35D/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K,
R14M/R35E/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K, R14M/S76N/A93G/R127K/R159E/I181K,
R14M/S76N/A93G/R127K/R159F/I181K, R14M/S76N/A93G/R127K/R159N/I181K,
R14M/S76N/A93G/R127Q/R159K/I181K, R14M/S76N/A93G/R127Y/R159K/I181K, 및
R14M/S76N/G78D/A93G/R127K/R159K/I181K.

또한 본 발명은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프
로테아제와 비교해 개선된 활성을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 제공한다. 일부 바람직한 구현예에서, 변
이체는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제
와 비교해 개선된 카세인분해 활성을 갖는다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 변이체는 하기로부터 선택되
는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스
(Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

R14L/R79T, G12D/R35H/R159E, G12D/R35H/R123Q, G12D/R35H/R123F/R159E,
G12D/R35H, G12D/R35E/R159E, G12D/R35E/R123Q/R159E, G12D/R35E/R123Q, G12D/R35E,
G12D/R35D/R159E, G12D/R35D/R123Q/R159E, G12D/R35D, G12D/R159E, G12D/R14Q/R35H,
G12D/R14I/R35H, 024E/G049A/A093H/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N24M/S76V/A93H/R127K/R159K, R14I/N24E/R35D/A64K/N67A/G78D/R123F/R159K/D184T
R127A/R159K, R14I/G65Q, 및 R14I/G65Q/R159K R14I/S76V.

[0047]

[0048]

일부 대안적인 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 개선된 케라틴분해 활성을 갖는다. 일부 특히 바람직한 구현예에 서, 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

N024E/G049A/A093H/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024E/G049A/A093H/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T/V090I,
N024E/G049A/A093S/S099D/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024Q/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024Q/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
N024Q/G049A/A093S/S099N/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N024T/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
N024W/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181Q,
N24A/G54E/S76D/A93G/R127K/R159K, N24E/A93G/R127K/R159K,
N24E/G54L/S76E/A93G/R127K/R159K, N24E/G54Q/A93S/R127K/R159K,
N24E/S76D/A93T/R127K/R159K, N24M/G54E/A93H/R127K/R159K,
N24M/G54E/S76N/A93S/R127K/R159K, N24Q/A93G/R127K/R159K,
N24Q/G54D/S76L/A93G/R127K/R159K, N24Q/G54I/S76E/A93H/R127K/R159K,
N24T/G54D/S76V/A93G/R127K/R159K, N24T/G54E/S76V/A93H/R127K/R159K,
N24W/G54D/A93H/R127K/R159K, N24W/S76E/A93G/R127K/R159K,
R014I/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T, R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q,
R014I/S076D/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076D/A093H/R127K/R159K/I181T,
R014I/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T, R014I/S076E/A093S/R127K/R159K/I181Q,
R014I/S076E/A093T/R127K/R159K/I181K, R014I/S076I/A093S/R127K/R159K/I181Q,
R014I/S076N/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076T/A093G/R127K/R159K/I181Q,
R014I/S076V/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014K/S076A/A093S/R127K/R159K/I181T,
R014K/S076E/A093H/R127K/R159K/I181T, R014K/S076E/A093S/R127K/R159K/I181T,
R014K/S076T/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014L/S076A/A093H/R127K/R159K,
R014L/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014L/S076D/A093H/R127K/R159K/I181T,
R014L/S076E/A093H/R127K/R159K/I181K, R014M/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T,
R014M/S076A/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181K,
R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093T/R127K/R159K/I181Q,
R014M/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076E/A093G/R127K/R159K/I181T,
R014M/S076E/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076E/A093S/R127K/R159K/I181T,
R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181K, R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181T,
R014M/S076N/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076N/A093S/R127K/R159K/I181T,
R014M/S076V/A093G/R127K/R159K/I181Q, R14I/N24Q/A64K/G78D/R123F/R159K/D184T,

[0049]

R14I/N24A/A64K/N67S/G78D/R123F/R159K/D184T,
 R14I/N24Q/R35D/A64K/N67S/R123F/R159K/D184T,
 R14I/N24E/A64K/R123F/R127K/R159K/D184T, R14I/N24Q/A64K/R123F/R127Q/R159K/D184T,
 R14I/N24Q/A64K/G78D/R123F/R127Q/R159N/D184T,
 R14I/N24E/A64K/N67L/G78D/R123F/R159K/D184T,
 R14I/N24Q/R35D/A64K/N67S/R123F/R159K/D184T, R127Q/R159K, G78D/R127K/R159K,
 N67S/G78D/R127K/R159K, R35D/R159K, G78D/R127Q/R159K, N24A/N67A/R159K,
 T36S/R127Q/R159E, S15E/T121E/R123Q, S15E/R35H/R159E, S15E/R35E, S15E/R159E,
 S15E/R123Q, S15E/R123E, R79T/R127Q/R179Q, R35H/R159E, R35H/R127Q/R159E,
 R35F/R61S/R159Q, R35F/R159Q, R35E/R159E, R35E/R127Q, R35D/R159E, R35D/R127Q,
 R16Q/R79T/R159Q/R179Q, R16Q/R79T/R127Q, R16Q/R79T/R123L, R16Q/R79T,
 R16Q/R35F/R123L/R159Q, R16Q/R159Q/R179Q, R16Q/R127Q/R159Q, R16Q/R123L/R159Q,
 R14Q/T121E, R14Q/R35E/T121E, R14Q/R35E/R159E, R14Q/R35E, R14Q/R35D/R127Q,
 R14Q/R35D, R14L/R79T/R127Q/R159Q, R14L/R61S/R79T/R123L,
 R14L/R35F/R61S, R14L/R127Q/R159Q/R179Q, R14L/R123L/R159Q, R14I/R35E/R127Q,
 R14I/R35E/R123E, R14I/R35D/R159E, R14E/R35H/R127Q, R127Q/R159E, R127Q/R159Q,
 R123Q/R159E, R123Q/R127Q/R159E, R123L/R159Q, R123L/R127Q/R159Q, R123F/R159E,
 R123E/R127Q/R159E, R123E/R127Q, G12D/S15E/R35H/R159E, G12D/S15E/R35D,
 G12D/S15E/R159E, G12D/S15E, G12D/R35H/T121E/R123Q,
 G12D/R35H/R159E, G12D/R35H/R127Q/R159E, G12D/R35H/R123Q, G12D/R35H/R123F/R159E,
 G12D/R35H, G12D/R35E/R159E, G12D/R35E/R123Q/R159E, G12D/R35E/R123Q, G12D/R35E,
 G12D/R35D/R159E, G12D/R35D/R127Q, G12D/R35D, G12D/R159E, G12D/R14Q/R35H,
 G12D/R14Q/R35D/R123H, G12D/R14Q/R159E, G12D/R14I/R35H, G12D/R14E,
 G12D/R127Q/R159E, G12D/R123E/R159E, R127A/R159K, R14I/G65Q,
 R14I/G65Q/R127A/R159K, R14I/G65Q/R159K, R14I/R127A, R14I/R127A/R159K, R14I/R159K,
 R14I/R35F, R14I/R35F/G65Q, R14I/R35F/G65Q/R127A/R159K, R14I/R35F/R159K, R14I/S76V,
 R14I/T36S/G65Q/R127A/R159K, 및 R35F/R127A/R159K.

[0050]

[0051]

또한 본 발명은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프
 로테아제와 비교해 개선된 세정 성능 활성을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 제공한다. 일부 바람직한 구현
 예에서, 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미
 노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서
 이루어진다:

N24F/R159G, N24F/R159L/R123V, N24I/R127S, N24L/R159S, N24S/R159A,
 N24V/R159L, N24Y/R159F, R14A/N24K/R127S, R14A/R159W, R14L/N24Y, R14L/R159G,
 R14L/R159S, R14L/T109M, R14L/T39P, R14M/R159W, R14S/N24V, R14S/N24Y, R14T/N24A,
 R14V/N24G/P189S, R14V/R159W, R127A/R159K, R14I/G65Q, R14I/S76V,
 R14I/G65Q/N67L/R159K, R14I/G65Q/R159K, R14I/S76V, R35F/R159Q, R16Q/R79T, R16Q/R35F,

[0052]

R16Q/R159Q, R14L/R79T, R123L/R159Q, G12D/S15E, G12D/R35H, G12D/R35D,
 N024E/G049A/A093H/R127K/A143N/R159K/I181Q,
 N024H/S076A/A093S/S099A/R127K/R159K/G054H/L069H,
 N024H/S076A/A093T/S099G/R127K/R159K, N024L/S076V/A093S/S099A/R127K/R159K,
 N024Q/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T,
 N024T/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T, N24E/G54Q/A93S/R127K/R159K,
 N24H/A93H/R127K/R159K, N24H/G54L/S76V/A93H/R127K/R159K,
 N24L/G54Q/S76A/A93H/R127K/R159K, N24M/A93G/R127K/R159K,
 N24M/G54E/A93H/R127K/R159K, N24M/S76V/A93H/R127K/R159K,
 N24Q/G54Q/S76T/A93H/R127K/R159K, N24Q/S76A/A93G/R127K/R159K,
 N24T/G54Q/S76N/A93G/R127K/R159K, N24T/S76I/R127K/R159K,
 N24W/G54D/A93H/R127K/R159K, N24W/S76A/A93H/R127K/R159K,
 N24W/S76T/A93G/R127K/R159K, N24W/S76V/A93G/R127K/R159K,
 N24W/S76Y/A93G/R127K/R159K, R014I/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T,
 R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181K, R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q,
 R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181T, R014I/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T,
 R014I/S076E/A093T/R127K/R159K/I181K, R014I/S076N/A093H/R127K/R159K/I181Q,
 R014I/S076V/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076V/A093S/R127K/R159K/I181K,
 R014K/S076A/A093S/R127K/R159K/I181T, R014K/S076E/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014K/S076I/A093S/R127K/R159K/I181T, R014K/S076T/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014K/S076T/A093H/R127K/R159K/I181T, R014K/S076V/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014L/S076A/A093H/R127K/R159K, R014L/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q,
 R014L/S076D/A093H/R127K/R159K/I181T, R014L/S076E/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014M/S076A/A093G/R127K/R159K/I181K, R014M/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076A/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181K,
 R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093T/R127K/R159K/I181Q,
 R014M/S076I/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076I/A093S/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181K, R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076N/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076N/A093S/R127K/R159K/I181T,
 R014M/S076T/A093H/R127K/R159K/I181K, R014M/S076V/A093G/R127K/R159K/I181Q,
 R014M/S076W/A093H/R127K/R159K/I181K, R014M/S076Y/A093H/R127K/R159K/I181K,
 R014M/S076Y/A093H/R127K/R159K/I181T, G012D/R035E/D184N, G012D/R035E/N067K,
 R14I/A64K/R123F/R159F/D184T, R14I/A64K/R123F/R159F/D184T,
 R14I/N24Q/A64K/G78D/R123F/R159K/D184T, R14I/N24Q/A64K/N67S/R123F/R159F/D184T,
 R14I/N24Q/A64K/N67A/R123F/R159K/D184T,
 R14I/N24A/A64K/N67S/G78D/R123F/R159K/D184T, R14I/A64K/R123F/D184T,
 R14I/N24A/A64K/R123F/R159N/D184T, R14I/N24Q/R35D/A64K/N67S/R123F/R159K/D184T,
 R14I/N24Q/A64K/N67A/R123F/R159K/D184T, R14I/N24E/A64K/R123F/R127K/R159K/D184T,

[0053]

R14I/N24A/A64K/R123F/D184T, R14I/A64K/R123F/R127K/R159F/D184T,
R14I/A64K/R123F/R159N/D184T,
R14I/A64K/R123F/R159K/D184T, R14I/A64K/R123F/R127Y/R159K/D184T,
R14I/N24Q/A64K/R123F/R127Q/R159K/D184T, R14I/A64K/R123F/R159K/D184T,
R14I/N24Q/R35D/A64K/N67S/R123F/R159K/D184T,
R14I/A64K/N67S/G78D/R123F/R127K/R159K/D184T,
R14I/N24Q/A64K/N67A/R123F/R127K/R159K/D184T, R127K/R159K, N24A/N67S/R159K,
N24A/N67A/R159K, R14I/A63K/G78D/R123F/D184T, R14I/A63K/N67A/R123F/D184T,
R14I/A63K/N67L/R123F/D184T, R14I/A63K/N67S/R123F/D184T,
R14I/A63K/R123F/R159F/D184T, R14I/A63K/R123F/R159K/D184T,
R14I/A63K/R123F/R159N/D184T, R14I/A63K/R123K/D184T, R14I/A63K/R123Q/D184T,
R14I/A63K/R123Y/D184T, R14I/A64K/G78D/T86K/T116E/R123F,
R14I/A64K/N67A/T86K/T116E/R123F, R14I/A64K/N67L/T86K/T116E/R123F,
R14I/A64K/T86K/T116E/R123F/R159K, R14I/A64K/T86K/T116E/R123K,
R14I/G54D/A63K/R123F/D184T, R14I/G54D/A64K/T86K/T116E/R123F,
R14I/N24A/A63K/R123F/D184T, R14I/N24A/A64K/T86K/T116E/R123F,
R14I/N24A/S76V/A93S/R127K/R159K/I181K, R14I/N24E/A63K/R123F/D184T,
R14I/N24E/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/N24Q/A63K/R123F/D184T,
R14I/N24Q/A64K/T86K/T116E/R123F, R14I/N24Q/S76V/A93S/R127K/R159K/I181K,
R14I/N24T/A63K/R123F/D184T, R14I/N24T/A64K/T86K/T116E/R123F,
R14I/N24TS76V/A93S/R127K/R159K/I181K, R14I/N67SS76N/A93H/R127K/R159K/I181Q,
R14I/R35E/A63K/R123F/D184T, R14I/R35K/A63K/R123F/D184T,
R14I/S76V/A93S/R127K/R159F/I181K, R14I/S76V/A93S/R127K/R159N/I181K,
R14I/S76V/A93S/R127Y/R159K/I181K, R14M/N24T/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K,
R14M/N67S/S76N/A93G/R127K/R159K/I181K, R14M/S76N/A93G/R127K/R159F/I181K, 및
R14M/S76N/G78D/A93G/R127K/R159K/I181K.

[0054]

[0055]

일부 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 개선된 식기세정 성능 활성을 갖는다. 일부 바람직한 구현예에서, 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

[0056]

[0057]

R14N/R127K/R159L, R14I/A64K/T86K/N112E/R123F/D184T,
G12D/R35E/G63R/R79K/T109M, R14L, G12D/R35E, 및
R14M/S76D/A93H/R127K/R159K/I181K.

일부 또다른 추가의 구현예에서, 변이체는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 개선된 얼룩 제거 활성을 갖는다. 일부 바람직한 구현예에서, 변이체는 하기로부터 선택되는 다중 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

G54E/R14L, N24D/R127Y/R159V, N24E/R127S, N24E/R159C, N24F/R159G, N24F/R159G/G54E, N24F/R159L/R123V, N24G/R127Y, N24H/R159Y/T46I, N24I/R127S, N24I/R127V/R14/N24L/R159S, N24S/R159A, N24V/R127M/R159V, N24V/R127S/R159H, N24V/R159L, N24Y/G54A, N24Y/R127L, N24Y/R127S, N24Y/R127V, N24Y/R159F, R127A/R159F, R127H/R159Q, R127H/R159T/S185F, R127M/R159V, R127S/R159G, R127S/R159L, R127T/R159F, R127V/R159G, R127Y/R159L, R14A/N24K/R127S, R14A/R127Y/R159W, R14G/N24S/R127C, R14G/R127G, R14L/N24D, R14L/N24Y, R14L/R123L, R14L/R127S, R14L/R127V, R14L/R127Y, R14L/R159G, R14L/R159S, R14L/T39P, R14M/N24L/R159S/R123V, R14M/R159F, R14M/R159W, R14Q/R123F, R14S/N24E/R127W, R14S/N24V, R14S/N24Y, R14T/N24T/R127Q, R14T/R127Y, R14V/N24D/R127C, R14V/N24G/P189S, R14V/N24L/R127F, R14V/R127A, R14V/R159F, R14V/R159W, R14W/N24A, R14W/R123L, R14W/R123V, R14W/R159V, R159V/G49D, R159V/R123G, N024E/G049A/A093H/R127K/A143N/R159K/I181Q, N024E/G049A/A093S/S099D/R127K/A143N/R159K/I181Q, N024Q/G049A/A093S/S099A/R127K/A143N/R159K/I181T, N24A/G54E/S76D/A93G/R127K/R159K, N24E/A93G/R127K/R159K, N24E/G54L/S76E/A93G/R127K/R159K, N24E/G54Q/A93S/R127K/R159K, N24E/S76D/A93T/R127K/R159K, N24H/G54E/A93G/R127K/R159K, N24L/S76T/A93G/R127K/R159K, N24M/A93S/R127K/R159K, N24M/A93T/R127K/R159K, N24M/G54E/A93H/R127K/R159K, N24M/G54E/S76N/A93S/R127K/R159K, N24M/S76V/A93H/R127K/R159K, N24Q/A93G/R127K/R159K, N24Q/G54D/S76L/A93G/R127K/R159K, N24Q/G54I/S76T/A93G/R127K/R159K, N24Q/G54Q/A93G/R127K/R159K, N24Q/S76A/A93G/R127K/R159K, N24T/G54Q/S76N/A93G/R127K/R159K, N24T/G54Q/S76V/R127K/R159K, N24T/S76I/R127K/R159K, N24W/A93G/R127K/R159K, N24W/G54D/A93H/R127K/R159K, R014I/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T, R014I/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076D/A093H/R127K/R159K/I181T, R014I/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T, R014I/S076E/A093S/R127K/R159K/I181Q, R014I/S076E/A093T/R127K/R159K/I181K, R014I/S076N/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014L/S076A/A093H/R127K/R159K, R014L/S076A/A093H/R127K/R159K/I181Q, R014L/S076D/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093G/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181K, R014M/S076A/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076A/A093T/R127K/R159K/I181Q, R014M/S076D/A093S/R127K/R159K/I181T,

R014M/S076E/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076E/A093S/R127K/R159K/I181T, R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181K, R014M/S076N/A093G/R127K/R159K/I181T, R014M/S076N/A093H/R127K/R159K/I181T, R014M/S076N/A093S/R127K/R159K/I181T, T36S/R127Q/R159E, S15E/R35E, S15E/R35D, S15E/R159E, S15E/R127Q, S15E/R123Q, S15E/R123E, R79T/R127Q/R179Q, R35H/R159E, R35F/R61S/R159Q, R35F/R159Q, R35D/R127Q, R16Q/R79T/R159Q/R179Q, R16Q/R79T/R123L, R16Q/R79T, R16Q/R35F, R16Q/R159Q/R179Q, R16Q/R159Q, R14Q/T121E, R14Q/R35E, R14Q/R35D, R14Q/R123Q, R14L/R79T, R127Q/R159E, R127Q/R159Q, R123Q/R159E, R123L/R159Q, R123F/R159E, G12D/S15E, G12D/R35H/R159E, G12D/R35H/R123Q, G12D/R35H, G12D/R35E, G12D/R35D, G12D/R159E, G12D/R14Q/R35H, G12D/R14I/R35H, G65Q/R127A/R159K, R127A/R159K, R14I/G65Q, R14I/G65Q/N67L/R159K, R14I/G65Q/R127A, R14I/G65Q/R127A/R159K, R14I/G65Q/R159K, R14I/R127A, R14I/R127A/R159K, R14I/R159K, R14I/R35F, R14I/R35F/G65Q, R14I/R35F/R159K, R14I/S76V, 및 R35F/R127A/R159K.

또한 본 발명은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 하나 이상의 변형된 표면 특성을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 제공한다. 일부 바람직

한 구현예에서, 변이체는 하기 부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에서의 2 개 이상의 치환을 포함하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

1, 2, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 24, 25, 32,
34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 59, 61, 62, 63,
64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,
95, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118,
119, 120, 121, 123, 124, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 137, 143, 144, 145, 146, 147,
148, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 171,
173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 및 184.

[0061]

[0062]

일부 특히 바람직한 구현예에서, 변이체 프로테아제는 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제와 비교해 하나 이상의 개선된 특성을 갖는다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 향상된 특성은 산 안정성, 열안정성, 카세인 가수분해, 케라틴 가수분해, 세정 성능, 및 LAS 안정성으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0063]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 또한 본 발명은 하나 이상의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 바실러스 종 (Bacillus sp.) 이고, 일부 다른 구현예에서, 숙주 세포는 스트렙토마이세스 종 (Streptomyces sp.) 이고, 또다른 일부 다른 구현예에서, 숙주 세포는 아스페르길루스 종 (Aspergillus sp.) 이고, 일부 또다른 추가의 구현예에서, 숙주 세포는 트리코데르마 종 (Trichoderma sp.) 이다. 또한 본 발명은 세린 프로테아제 변이체 생성 숙주 세포를 제공한다.

[0064]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체의 일부 이상을 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 치환은 본원에 제공된, SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다.

[0065]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 또한 본 발명은 하나 이상의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 바람직한 구현예에서, 숙주 세포는 바실러스 종 (Bacillus sp.) 이고, 일부 다른 구현예에서, 숙주 세포는 스트렙토마이세스 종 (Streptomyces sp.) 이고, 또다른 일부 다른 구현예에서, 숙주 세포는 아스페르길루스 종 (Aspergillus sp.) 이고, 일부 또다른 추가의 구현예에서, 숙주 세포는 트리코데르마 종 (Trichoderma sp.) 이다. 또한 본 발명은 세린 프로테아제 변이체 생성 숙주 세포를 제공한다.

[0066]

본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물을 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 일부 바람직한 구현예에서, 세정 조성물은 하나 이상의 변이체 세린 프로테아제를 포함하고, 여기서 세린 프로테아제는 SEQ ID NO:8 에 언급된 세린 프로테아제와 면역학적 교차-반응성을 갖는다. 일부 바람직한 구현예에서, 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 하기 위치와 동등한 위치에서 이루어진다:

1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 22, 24, 25, 26, 27,
28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 56, 57,
59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 87,
88, 89, 90, 91, 92, 93, 96, 99, 100, 101, 103, 104, 105, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116,
117, 118, 119, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 140, 141,
142, 143, 144, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163,
164, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187,
188, 및 189.

[0067]

[0068]

일부 바람직한 구현예에서, 세정 조성물은 프로테아제, 아밀라아제, 리파아제, 만난나아제, 펙티나아제, 큐티나아제, 산화환원효소, 헤미셀룰라아제, 및 셀룰라아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가적인 효소 또는 효소 유도체를 추가로 포함한다.

[0069]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체 및 하나 이상의 안정화제를 포함하는 조성물을 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다.

일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 세정 조성물이다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 안정화제는 붕사, 글리세롤 및 경쟁적 억제제로부터 선택된다. 일부 추가의 특히 바람직한 구현예에서, 경쟁적 억제제는 음이온성 계면활성제에 대해서 세린 프로테아제 변이체를 안정화시킨다. 일부 또다른 추가의 구현예에서, 세린 프로테아제 변이체는 자가분해적으로 안정한 변이체이다.

[0070]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 0.0001 중량% 및 임의로 보조 성분을 포함하는 세정 조성물을 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 세린 프로테아제 변이체를 약 0.001 내지 약 0.5 중량% 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 조성물은 세린 프로테아제를 약 0.01 내지 약 0.1 중량% 포함한다. 일부 추가적인 바람직한 구현예에서, 세정 조성물은 보조 성분을 포함한다. 일부 또다른 추가의 바람직한 구현예에서, 세정 조성물은 약 3 내지 약 5 의 순 pH 를 갖는 조성물을 제공하기 위해 충분한 양의 pH 개질제를 포함하며, 여기서 조성물에는 약 3 내지 약 5 의 pH 에서 가수분해되는 물질이 본질적으로 없다. 일부 대안적인 바람직한 구현예에서, 세정 조성물은 계면활성제 물질을 포함하는 가수분해되는 물질을 포함한다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 계면활성제 물질은 에틸렌 옥시드 부분을 포함하는 나트륨 알킬술페이트 계면활성제를 포함한다.

[0071]

본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물을 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어지고, 여기서 세정 조성물은 액체이다. 일부 대안적인 구현예에서, 세정 조성물은 분말, 과립 또는 정제 조성물이다.

[0072]

본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물을 추가로 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어지고, 여기서 세정 조성물은 과산화수소 공급원을 추가로 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, 과산화수소 공급원은 하나 이상의 과염을 포함하고, 여기서 과염은 알칼리금속 퍼보레이트, 알칼리금속 퍼카르보네이트, 알칼리금속 퍼포스페이트, 알칼리 금속 퍼술페이트, 또는 그의 혼합물이다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 세정 조성물은 표백 촉매, 표백 활성화제 및/또는 그의 혼합물을 추가로 포함한다.

[0073]

또한 본 발명은 하기 a) 및 b) 단계를 포함하는 세정 방법을 제공한다: a) 섬유를 포함하는 표면 및/또는 물품을 본 발명의 하나 이상의 세정 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 임의로 표면 또는 물질을 세정 및/또는 행구는 단계.

[0074]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 동물 먹이를 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다.

[0075]

또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 포함하

는 식물 및/또는 가축제품 가공 조성물을 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다.

- [0076] 또한 본 발명은 2 개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 개인 케어 조성물을 제공하고, 여기서 상기 치환은 SEQ ID NO:8 에 언급된 아미노산 서열을 포함하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제에서의 위치와 동등한 위치에서 이루어진다.

도면의 간단한 설명

- [0077] 도 1 은 플라스미드 pHPLT-ASP-C1-2 의 지도를 제공한다.
- 도 2 는 플라스미드 pXX-KpnI 의 지도를 제공한다.
- 도 3 은 플라스미드 pHPLT 의 지도를 제공한다.
- 도 4 는 플라스미드 pUC18 의 지도를 제공한다.
- 도 5 는 플라스미드 pUC18-ASP 의 지도를 제공한다.
- 도 6 은 HEPES 완충액의 부재하에서 수행된 테르고토미터 (tergotometer) 시험의 결과를 보여주는 표를 제시한다 (효소 용량은 0.55 ppm 이었다).
- 도 7 은 HEPES 완충액의 존재하에서 수행된 테르고토미터 시험의 결과를 보여주는 표를 제시한다 (효소 용량은 0.55 ppm 이었다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0078] 본 발명은 다중 치환을 가진 신규 마이크로코시네아에 종 (Micrococcineae spp.) 세린 프로테아제를 제공한다. 특히, 본 발명은 다중 치환을 가진 세린 프로테아제, 상기 프로테아제를 코딩하는 DNA, 프로테아제를 코딩하는 DNA 를 포함하는 벡터, 벡터 DNA 로 형질전환된 숙주 세포, 및 숙주 세포에 의해 생성된 효소를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 세정 조성물 (예를 들어, 세제 조성물), 동물 먹이 조성물, 및 식물 및 가축제품 가공 조성물을 제공한다. 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 야생형 프로테아제 유래의 돌연변이 (즉, 변이체) 프로테아제를 제공한다. 이러한 변이체 프로테아제는 또한 다양한 적용에 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명은 다중 치환을 가진 변이체 프로테아제 효소를 제공한다. 중요하게는, 이들 변이체 효소는 양호한 안정성 및 단백질분해 활성을 갖는다. 이들 변이체 효소는 세정 조성물, 동물 먹이, 섬유 가공 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 적용에 사용될 수 있다. 또한 본 발명은 상기 효소를 생성하기 위한 수단을 제공한다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명의 변이체 프로테아제는 순수하거나 비교적 순수한 형태이다.
- [0080] 또한 본 발명은 재조합 유기체에서 본 발명의 변이체 프로테아제를 생성하는데 적합한 뉴클레오타이드 서열을 제공한다. 일부 구현예에서, 재조합 제조는 상업적으로 생존가능한 양으로 변이체 프로테아제를 생성하기 위한 수단을 제공한다.
- [0081] 다르게 지시되지 않는다면, 본 발명의 실시에는 당업계 내에 있는 분자 생물학, 미생물학, 및 재조합 DNA 에 통상 사용되는 통상의 기술이 포함된다. 이러한 기술은 당업자에게 공지된 것들이며, 많은 문헌 및 참조 논문 에 기재되어 있다 (예를 들어, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition (Cold Spring Harbor), [1989]); 및 Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" [1987] 참조). 본원의 상기 및 이하 모두에 언급된 모든 특허, 특허 출원, 논문 및 공보는 여기에 참조로서 본원에 표현적으로 인용된다.
- [0082] 본원에 다르게 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업자에게 통상 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, [Singleton and Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, NY (1994); 및 Hale and Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991)] 은 당업자에게 본 발명에서 사용되는 많은 용어의 일반적인 사전적 의미를 제공한다. 본원에 기재된 것과 유사거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질은 본원에 기재된다. 따라서, 바로 이하에 정의된 용어는 전체로서 명세서를 참조로 더욱 상세히 기재된다. 또한, 본원에 사용되는 바와 같이, 단수형에는 문맥이 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 복수형 참조가 포함된다. 수치 범위는 범위를 정의하는 수를 포함한다. 다

르게 지시되지 않는다면, 핵산은 5' 에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 표기하며; 아미노산 서열은 아미노에서 카르복시 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 표기한다. 본 발명은 기재된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약은 당업자에 의해 사용되는 문맥에 따라 다양할 수 있기 때문에 이에 제한되지 않는 것으로 이해된다.

[0083] 본 발명의 실시는 다르게 언급되지 않는다면, 모두 당업계 내에 있는 단백질 정제, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술 및 단백질 서열분석의 통상의 기술을 사용한다.

[0084] 추가로, 본원에 제공된 표제는 전체로서 명세서를 참조할 수 있는 본 발명의 다양한 양상 또는 구현예의 제한이 아니다. 따라서, 바로 이하에 정의된 용어는 전체로서 명세서를 참조로 하여 더욱 상세히 정의된다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 하기에 정의된다. 부가적인 정의는 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 제공된다.

[0085] 1. 정의

[0086] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "프로테아제," 및 "단백질분해 활성" 은 펩티드 연결을 갖는 펩티드 또는 기질을 가수분해하는 능력을 나타내는 단백질 또는 펩티드를 말한다. 많은 잘 공지된 절차가 단백질분해 활성의 측정을 위해 존재한다 (Kalisz, "Microbial Proteinases," In: Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, [1988]). 예를 들어, 단백질분해 활성은 통상의 기질을 가수분해하는 각각의 프로테아제 능력을 분석하는 비교 검정법에 의해 확인될 수 있다. 프로테아제 또는 단백질분해 활성의 분석에 유용한 예시적 기질에는, 디-메틸 카세인 (Sigma C-9801), 소 콜라겐 (Sigma C-9879), 소 엘라스틴 (Sigma E-1625), 및 소 케라틴 (ICN Biomedical 902111) 이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 기질을 사용하는 비색 검정법은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, WO 99/34011 호; 및 미국 특허 번호 6,376,450 호 참조, 둘다 본원에 참조로서 인용됨). pNA 검정법 (예를 들어, Del Mar et al., *Anal. Biochem.*, 99:316-320 [1979]) 은 또한 구배 용리 동안 수집된 분획에 대한 활성 효소 농도를 측정하는데 사용될 수 있다. 상기 검정법은 p-니트로아닐린이 가용성 합성 기질인 숙시닐-알라닌-알라닌-프롤린-페닐알라닌-p-니트로아닐리드 (sAAPF-pNA) 를 가수분해하는 효소로서 방출되는 속도를 측정한다. 가수분해 반응으로부터의 황색조의 생성 속도는 분광광도계로 410 nm 에서 측정되고, 활성 효소 농도에 비례한다. 또한, 280 nm 에서의 흡광도 측정을 총 단백질 농도를 측정하기 위해 사용할 수 있다. 활성 효소/총-단백질 비율은 효소 순도를 제공한다.

[0087] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "ASP 프로테아제," "Asp 프로테아제," 및 "Asp," 는 본원에 기재된 세린 프로테아제를 말한다. 일부 바람직한 구현예에서, Asp 프로테아제는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 로부터 수득된 69B4 프로테아제로서 본원에 고안된 프로테아제이다. 그러므로, 바람직한 구현예에서, 용어 "69B4 프로테아제" 는 SEQ ID NO:8 에 제공된 것과 실질적으로 일치하는 아미노산 서열을 갖는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 로부터 유래된 자연 발생적 성숙 프로테아제를 말한다. 대안적인 구현예에서, 본 발명은 ASP 프로테아제의 일부를 제공한다.

[0088] 용어 "셀룰로모나스 (Cellulomonas) 프로테아제 상동" 은 자연 발생적 프로테아제를 코딩하는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 또는 폴리뉴클레오티드 서열 유래의 성숙 프로테아제와 실질적으로 일치하는 아미노산 서열을 갖는 자연 발생적 프로테아제를 말하고, 상기 프로테아제는 이러한 핵산에 의해 코딩된 세린 프로테아제의 기능 특성을 보유한다. 일부 구현예에서, 상기 프로테아제 상동은 "셀룰로모나딘" 으로 불린다. 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "프로테아제 변이체," "ASP 변이체," "ASP 프로테아제 변이체," 및 "69B4 프로테아제 변이체" 는 야생형 ASP 와 특히 그 기능이 유사하나, 야생형 프로테아제와 서열이 상이하게 되는 아미노산 서열 중의 돌연변이 (예를 들어, 치환) 를 갖는 프로테아제를 참조로 하여 사용된다. 치환에 의해 확인된 아미노산 잔기 중 일부는 보존 잔기인 반면, 일부는 그렇지 않다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제 변이체에는 프로테아제 변이체의 성숙 형태가 포함되고, 다른 구현예에서, 본 발명은 이러한 프로테아제 변이체의 프로- 및 프리프로-형태를 제공한다.

[0089] 본원에 사용되는 바와 같은, "셀룰로모나스 종 (Cellulomonas ssp.)" 은 "셀룰로모나스 (Cellulomonas)" 속명 내의 모든 종을 말하며, 이것은 셀룰로모나다세아에 과 (Family Cellulomonadaceae), 마이크로코시네아에 아목 (Suborder Micrococccineae), 악티노마이세탈레스 목 (Order Actinomycetales), 악티노박테리아 강 (Class Actinobacteria) 의 일원으로 분류되는 그람-양성 박테리아이다. 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 속명에 대한 지속적인 분류학적 개편이 있다는 것으로 인지된다. 그러므로, 속명에는 재분류된 종명이 포함되는 것으로 인지된다.

- [0090] 본원에 사용되는 바와 같은, "스트렙토마이세스 종 (Streptomyces ssp.)" 은 "스트렙토마이세스 (Streptomyces)" 속명 내의 모든 종을 말하며, 이것은 스트렙토마이세타세아에 과 (Family Streptomycetaceae), 스트렙토마이시네아에 아목 (Suborder Streptomycineae), 악티노마이세탈레스 목 (Order Actinomycetales), 악티노박테리아 강 (Class Actinobacteria) 의 일원으로 분류되는 그람-양성 박테리아이다. 스트렙토마이세스 (Streptomyces) 속명에 대한 지속적인 분류학적 개편이 있다는 것으로 인지된다. 그러므로, 속명에는 재분류된 종명이 포함되는 것으로 인지된다.
- [0091] 본원에 사용되는 바와 같은, "바실러스 (Bacillus) 속" 에는 B. 서브틸리스 (B. subtilis), B. 리체니포르미스 (B. licheniformis), B. 렌투스 (B. lentus), B. 브레비스 (B. brevis), B. 스테아로테르모필루스 (B. stearothermophilus), B. 알칼로필루스 (B. alkalophilus), B. 아밀로리퀘파시엔스 (B. amyloliquefaciens), B. 클라우시 (B. clausii), B. 할로두란스 (B. halodurans), B. 메가테리움 (B. megaterium), B. 코아굴란스 (B. coagulans), B. 서클란스 (B. circulans), B. 라우투스 (B. lautus), 및 B. 투링지엔시스 (B. thuringiensis) 가 포함되나 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 바와 같이 "바실러스 (Bacillus)" 속명 내의 모든 종이 포함된다. 바실러스 (Bacillus) 속명에 대한 지속적인 분류학적 개편이 있다는 것으로 인지된다. 그러므로, 속명에는 이제는 "제오바실러스 스테아로테르모필루스 (Geobacillus stearothermophilus)" 라고 불리는 B. 스테아로테르모필루스 (B. stearothermophilus) 와 같은 이러한 유기체를 포함하나 이에 제한되지 않는, 재분류된 종명이 포함되는 것으로 인지된다. 산소의 존재하에서의 내성 내생포자의 생성은, 상기 특성이 또한 현재 명칭 알리시클로바실러스 (Alicyclobacillus), 암피바실러스 (Amphibacillus), 아네우리니바실러스 (Aneurinibacillus), 아녹시바실러스 (Anoxybacillus), 브레비바실러스 (Brevibacillus), 필로바실러스 (Filobacillus), 그라실리바실러스 (Gracilibacillus), 할로바실러스 (Halobacillus), 파에니바실러스 (Paenibacillus), 살리바실러스 (Salibacillus), 테르모바실러스 (Thermobacillus), 우레이바실러스 (Ureibacillus), 및 비르지바실러스 (Virgibacillus) 에 적용됨에도 불구하고, 바실러스 (Bacillus) 속명의 특징을 정의하는 것으로 간주된다.
- [0092] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산," 은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태 (리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드) 를 말한다. 상기 용어에는 단일-, 이중- 또는 삼중-가닥 DNA, 게놈 DNA, cDNA, RNA, DNA-RNA 잡종, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기, 또는 기타 천연, 화학적으로, 생화학적으로 개질된 비-천연 또는 유도된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비-제한적인 예이다: 유전자, 유전자 조각, 염색체 조각, EST, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 탐침, 및 프라이머. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 개질 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 상동, 우라실, 다른 당 및 연결기, 예컨대 플루오로리보오스 및 티오에이트, 및 뉴클레오티드 분지를 포함한다. 대안적인 구현예에서, 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 방해된다.
- [0093] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "유전자" 는 폴리펩티드를 코딩하고, 코딩 영역 전 후 영역 뿐 아니라, 개별 코딩 분절 (엑손) 사이의 중단 서열 (인트론) 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 분절) 를 말한다.
- [0094] 본원에 사용되는 바와 같은, "상동 유전자" 는 서로에게 상응하고 서로 일치하거나 매우 유사한, 상이하나 일반적으로는 관련된 종으로부터의 유전자 쌍을 말한다.
- [0095] 상기 용어는 중분화에 의해 분리된 유전자 (즉, 신규 종의 개발) (예를 들어, 오르소로그 (orthologous) 유전자) 뿐 아니라 유전적 복제에 의해 분리된 유전자 (예를 들어, 파라로그 (paralogous) 유전자) 를 포함한다.
- [0096] 본원에 사용되는 바와 같은, "상동" 은 서열 유사성 또는 일치성을 말하며, 일치성이 바람직하다. 상기 상동은 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 측정된다 (예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 [1981]; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 [1970]; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; 프로그램, 예컨대 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA {Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI)}; 및 Devereux et al., Nucl. Acid Res., 12:387-395 [1984] 참조).
- [0097] 본원에 사용되는 바와 같은, "유사 서열" 은 유전자의 기능이 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 프로테아제에 기재한 유전자와 본질적으로 동일한 서열이다. 부가적으로는, 유사 유전자에는 셀룰로모나스

(Cellulomonas) 균주 69B4 프로테아제의 서열과 적어도 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 의 서열 일치성이 포함된다. 대안적으로는, 유사 서열은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 프로테아제 영역에서 발견되는 유전자의 70 내지 100% 의 정렬을 갖고/갖거나 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 염색체 중의 유전자와 정렬된 영역에서 발견되는 적어도 5 내지 10 개의 유전자를 갖는다. 부가적인 구현예에서, 상기 특성 중 하나 초과가 서열에 적용된다. 유사 서열은 공지된 서열 정렬 방법에 의해 측정된다. 통상 사용되는 정렬 방법은 BLAST 이나, 상기 및 하기에 나타나있듯이, 또한 서열 정렬에 사용될 수 있는 다른 방법도 있다.

[0098] 본원에 사용되는 바와 같은, "재조합" 에는 이중 핵산 서열의 도입에 의해 개질된 세포 또는 벡터 또는 그렇게 개질된 세포로부터 유래된 세포에 대한 참조가 포함된다. 그러므로, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 선천적 (비-재조합) 형태 내에서 동일한 형태로 발견되지 않은 유전자를 발현하거나, 고의의 인간의 개입의 결과로서 발현된 또는 전혀 발현되지 않은, 다르게 비정상적으로 발현되는 선천적 유전자를 발현한다. "재조합," "재조합화," 및 "재조합된" 핵산의 발생은 일반적으로 2 개 이상의 핵산 조각의 어셈블리로, 어셈블리는 키메라 유전자를 산출한다.

[0099] 바람직한 구현예에서, 돌연변이체 DNA 서열은 하나 이상의 코돈에서의 부위 포화 돌연변이화로 발생된다. 또다른 바람직한 구현예에서, 부위 포화 돌연변이화는 2 개 이상의 코돈에 대해 수행된다. 추가의 구현예에서, 돌연변이체 DNA 서열은 야생형 서열과 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 98% 초과와 상동성을 갖는다. 대안적인 구현예에서, 돌연변이체 DNA 는 임의의 공지된 돌연변이화 절차 예컨대, 예를 들어, 방사, 니트로소구아니딘 등을 사용하여 생체 내에서 발생된다. 그 다음 바람직한 DNA 서열을 분리하고 본원에 제공된 방법에 사용한다.

[0100] 본원에 사용되는 바와 같은 "아미노산" 은 펩티드 또는 단백질 서열 또는 그의 일부를 말한다.

[0101] 본원에 사용되는 바와 같은, "관심의 단백질" 및 "관심의 폴리펩티드" 는 바람직한 및/또는 평가되는 단백질/폴리펩티드를 말한다. 일부 구현예에서, 관심의 단백질은 세포내에서 발현되고, 다른 구현예에서, 이것은 분비된 폴리펩티드이다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 효소에는 본 발명의 세린 프로테아제가 포함된다. 일부 구현예에서, 관심의 단백질은 신호 펩티드 (즉, 분비되는 단백질에 대한 아미노-말단 확장) 에 융합된 분비된 폴리펩티드이다. 거의 모든 분비된 단백질은 막을 가로지르는 전구체 단백질의 전위 및 단백질에 대한 표적화에 중요한 역할을 하는 아미노-말단 단백질 확장을 사용한다. 상기 확장은 막 이동 동안 또는 그 이후 즉시 신호 펩티다아제에 의해 단백질 분해되어 제거된다.

[0102] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "이중 단백질" 은 숙주 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 단백질 또는 폴리펩티드를 말한다. 이중 단백질의 예에는 프로테아제를 비롯한 가수분해효소와 같은 효소가 포함된다. 일부 구현예에서, 단백질 코딩 유전자는 자연 발생적 유전자이고, 다른 구현예에서, 돌연변이된 및/또는 합성 유전자가 사용된다.

[0103] 본원에 사용되는 바와 같은, "상동 단백질" 은 세포에서 천연 또는 자연적으로 발생하는 단백질 또는 폴리펩티드를 말한다. 바람직한 구현예에서, 세포는 그람-양성 세포이고, 특히 바람직한 구현예에서, 세포는 바실러스 (Bacillus) 속주 세포이다. 대안적인 구현예에서, 상동 단백질은 E. 콜라이 (E. coli), 스트렙토마이세스 (Streptomyces), 트리코데르마 (Trichoderma), 및 아스페르길루스 (Aspergillus) 를 포함하나 이에 제한되지 않는 기타 유기체에 의해 생성된 천연 단백질이다. 본 발명은 재조합 DNA 기술을 통해 상동 단백질을 생성하는 숙주 세포를 포함한다.

[0104] 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드" 는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. [IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)] 에 따라 정의된 아미노산에 대한 3 자리 코드가 본 명세서에서 사용된다. 또한 유전적 코드의 퇴행으로 인해 폴리펩티드가 하나 초과와 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다는 것이 이해된다.

[0105] "자연 발생적 효소" 는 자연에서 발견된 효소와 일치하는 미개질 아미노산 서열을 갖는 효소를 말한다. 자연 발생적 효소에는 특정 미생물에서 자연 발현되거나 발견된 효소인 천연 효소가 포함된다.

[0106] 용어 "~로부터 유래된" 및 "~로부터 수득된" 은 문제의 유기체의 균주에 의해 생성되거나 생성될 수 있는 프로테아제 뿐 아니라, 또한 그러한 균주로부터 분리된 DNA 서열에 의해 코딩되고 그러한 DNA 서열을 함유하는 숙주 유기체에서 생성된 프로테아제를 말한다. 부가적으로는, 상기 용어는 합성 DNA 서열 및/또는 cDNA 기원에 의해 코딩되고, 문제의 프로테아제의 확인된 특성을 갖는 프로테아제를 말한다. 예를 들자면, "셀룰로모

나스 (Cellulomonas) 유래의 프로테아제" 는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 에 의해 자연 발생된 단백질분해 활성을 갖는 효소 뿐 아니라, 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 공급원에 의해 생성되었으나 유전공학 기술을 사용하여 세린 프로테아제를 코딩하는 핵산으로 형질전환된 비-셀룰로모나스 (Cellulomonas) 유기체에 의해 생성된 것과 같은 세린 프로테아제를 말한다.

[0107] 본 정의 범위 내의 "유도체" 는 일반적으로 유도체가 야생형, 천연 또는 모형태와 유사한 목적에 유용한 범위로 야생형, 천연 또는 모형태에서 관찰된 단백질분해 활성 특성을 보유한다. 세린 프로테아제의 기능성 유도체는 본 발명의 세린 프로테아제의 일반적 특성을 갖는 자연 발생적, 합성적으로 또는 재조합적으로 생성된 펩티드 또는 펩티드 조각을 포함한다.

[0108] 용어 "기능성 유도체" 는 세린 프로테아제를 코딩하는 핵산의 기능적 특성을 갖는 핵산의 유도체를 말한다. 본 발명의 세린 프로테아제를 코딩하는 핵산의 기능성 유도체는 자연 발생적, 합성적으로 또는 재조합적으로 생성된 핵산 또는 조각을 포함하고 본 발명의 세린 프로테아제 특성을 코딩한다. 본 발명에 따른 세린 프로테아제를 코딩하는 야생형 핵산에는 자연 발생적 대립유전자 및 당업계에 공지된 유전 코드의 퇴행에 근거한 상동이 포함된다.

[0109] 2 개 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥 중의 용어 "일치하는" 은 하기 서열 비교 또는 분석 알고리즘 중 하나를 사용하여 측정되는 바와 같이 최대 대응에 대해 배열되었을 때 동일한 2 개 서열 중의 잔기를 말한다.

[0110] 용어 "최적 배열" 은 가장 높은 % 일치성 점수를 제공하는 배열을 말한다.

[0111] 2 개의 아미노산, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 유전자 서열 (적합하게는) 과 관련된 "% 서열 일치성," "% 아미노산 서열 일치성," "% 유전자 서열 일치성," 및/또는 "% 핵산/폴리뉴클레오타이드 서열 일치성," 은, 서열이 최적으로 배열된 경우 2 개의 서열 중 일치하는 잔기의 % 를 말한다. 그러므로, 80% 아미노산 서열 일치성은 2 개의 최적으로 배열된 폴리펩티드 서열 중의 아미노산의 80% 가 일치한다는 것을 의미한다.

[0112] 그러므로 2 개의 핵산 또는 폴리펩티드의 문맥에서 구 "실질적으로 일치하는" 은 표준 파라미터를 사용하는 프로그램 또는 알고리즘 (예를 들어, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) 을 사용하여 참조 서열과 비교하여 70% 이상의 서열 일치성, 바람직하게는 75% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 바람직하게는 98% 이상 및 바람직하게는 99% 이상의 서열 일치성을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드를 말한다. 2 개의 폴리펩티드가 실질적으로 일치한다는 하나의 지표는 첫번째 폴리펩티드가 두번째 폴리펩티드와 면역학적으로 교차 반응하는 것이다. 전형적으로는, 보존 아미노산 치환에 의해 상이한 폴리펩티드는 면역학적으로 교차 반응한다. 그러므로, 폴리펩티드는 예를 들어, 2 개의 폴리펩티드가 보존 치환에 의해서만 상이한 경우 두번째 폴리펩티드와 실질적으로 일치한다. 2 개의 핵산 서열이 실질적으로 일치한다는 또다른 지표는 2 개의 분자가 엄격한 조건 (예를 들어, 중간 ~ 높은 엄격함 범위 내) 하에서 서로 혼성화되는 것이다.

[0113] 상기 문맥에서 구 "동등한," 은, 중간 ~ 최대 엄격함 조건 하에서 SEQ ID NO:1 에 제시된 바와 같은 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 세린 프로테아제 효소를 말한다. 예를 들어, 동등하다는 것은 동등 성숙 세린 프로테아제가 SEQ ID NO:8 의 아미노산 서열을 갖는 성숙 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 세린 프로테아제와 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및/또는 99% 이상의 서열 일치성을 포함하는 것을 의미한다.

[0114] 용어 "단리된" 또는 "정제된" 은 본래 환경 (예를 들어, 자연적으로 발생되는 경우 자연 환경) 으로부터 제거된 물질을 말한다. 예를 들어, 상기 물질은 자연적으로 발생하는 또는 야생형 유기체에 존재하는 것보다 높은 농도로 특정 조성물에 존재하거나 또는 자연 발생적 또는 야생형 유기체로부터 발현 시 정상적으로 존재하지 않는 성분과 함께 존재하는 경우 "정제된다" 라고 말한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 자연 발생적 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 단리되지 않으나, 자연계 중의 공존 물질의 일부 또는 모두로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나, 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 조성물의 일부일 수 있고, 또한, 이러한 벡터 또는 조성물은 자연 환경의 일부가 아닐수도 있다는 점에서 단리될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 핵산 또는 단백질은, 예를 들어, 전기영동 겔 또는 블롯에서 본질적으로 하나의 밴드로 나타나는 경우 정제되었다고 말한다.

[0115] DNA 서열을 참조로 사용되는 경우 용어 "단리된" 은, 자연적인 유전 환경으로부터 제거되어 다른 외부적인 또는

원치않는 코딩 서열이 없으며, 유전공학적 단백질 제조 시스템에서 사용하기에 적합한 형태의 DNA 서열을 말한다. 이러한 단리된 분자는 자연 환경으로부터 단리된 것들이고, cDNA 및 게놈 클론이 포함된다. 본 발명의 단리된 DNA 분자는 보통 관련 기타 유전자가 없고, 프로모터 및 종결자와 같은 자연 발생적 5' 및 3' 미번역 영역이 포함될 수 있다. 관련 영역의 확인은 당업자에게 명백할 것이다 (예를 들어, Dynan and Tijan, Nature 316:774-78 [1985] 참조). 용어 "단리된 DNA 서열" 은 대안적으로는 "클로닝된 DNA 서열" 로 언급된다.

[0116] 단백질을 참조로 하여 사용되는 경우, 용어 "단리된," 은, 천연 환경 이외의 상태에서 발견된 단백질을 말한다. 바람직한 형태에서, 단리된 단백질은 다른 단백질, 특히 다른 상동 단백질이 실질적으로 없다. 단리된 단백질은 SDS-PAGE 에 의해 측정된 바와 같이 10% 초과 순도, 바람직하게는 20% 초과 순도, 및 훨씬 더 바람직하게는 30% 초과 순도를 갖는다. 발명의 추가 양상은 SDS-PAGE 에 의해 측정된 바와 같이 고도로 정제된 형태 (즉, 40% 초과 순도, 60% 초과 순도, 80% 초과 순도, 90% 초과 순도, 95% 초과 순도, 97% 초과 순도, 및 심지어 99% 초과 순도) 의 단백질을 포함한다.

[0117] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "조합 돌연변이화" 는 출발 서열의 변이체의 라이브러리가 생성되는 방법을 말한다. 상기 라이브러리에서, 변이체는 미리 정의된 일련의 돌연변이로부터 선택된 하나 또는 여러 돌연변이 (예를 들어, 치환) 를 함유한다. 또한, 상기 방법은 미리 정의된 일련의 돌연변이의 일원이 아닌 랜덤 돌연변이 (예를 들어, 치환) 를 도입하기 위한 수단을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법에는 본원에 참조로서 인용된, 2000 년 10 월 26 일에 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 09/699,250 호에 언급된 것들이 포함된다. 대안적인 구현예에서, 조합 돌연변이화 방법은 시판되는 키트 (예를 들어, QuikChange® Multisite, Stratagene, San Diego, CA) 를 포함한다.

[0118] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "돌연변이체의 라이브러리" 는 게놈의 대부분이 일치하나, 하나 이상의 유전자의 상이한 상동이 포함되는 세포의 집단을 말한다. 이러한 라이브러리는 예를 들어, 개선된 특색을 갖는 유전자 또는 오펜을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0119] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "출발 유전자" 는 본 발명을 사용하여 개선 및/또는 변화된 관심의 단백질을 코딩하는 관심의 유전자를 말한다.

[0120] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "다중 서열 배열" ("MSA") 은 알고리즘 (예를 들어, Clustal W) 을 사용하여 배열된 출발 서열의 다중 상동 서열을 말한다.

[0121] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "보존 서열" 및 "정준 서열" 은 관심의 특정 단백질 또는 서열의 모든 변이체가 비교되는 것과는 대조되는 전형적인 아미노산 서열을 말한다. 상기 용어는 또한 관심의 DNA 서열에 대부분 종종 존재하는 뉴클레오티드를 언급하는 서열을 말한다. 유전자의 각 위치에 대해, 보존 서열은 MSA 중의 위치에 가장 풍부한 아미노산을 제공한다.

[0122] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "보존 돌연변이" 는 출발 유전자 및 보존 서열의 서열의 차이를 말한다. 보존 돌연변이는 MSA로부터 수득된 출발 유전자 및 보존 서열의 서열을 비교하여 확인된다. 일부 구현예에서, 보존 돌연변이가 출발 유전자 내에 도입되어, 보존 서열과 더욱 유사하게 된다. 보존 돌연변이에는 또한 출발 유전자 중의 아미노산의 빈도와 관련된 위치에서 출발 유전자 중의 아미노산이 MSA에서 더욱 종종 발견되는 아미노산으로 변경되는 아미노산 변경이 포함된다. 그러므로, 용어 보존 돌연변이는 출발 유전자의 아미노산을 MSA 중의 아미노산보다 더욱 풍부한 아미노산으로 대체하는 모든 단일 아미노산 변화를 포함한다.

[0123] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "초기 적중" 은 조합 보존 돌연변이화 라이브러리를 스크리닝하여 확인되는 변이체를 말한다. 바람직한 구현예에서, 초기 적중은 출발 유전자와 비교하여, 개선된 성능 특성을 갖는다.

[0124] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "개선된 적중" 은 향상된 조합 보존 돌연변이화 라이브러리를 스크리닝하여 확인되는 변이체를 말한다.

[0125] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "개선 돌연변이" 및 "성능-향상 돌연변이" ("개선 치환" 및 "성능-향상 치환") 은 출발 유전자 내로 도입되는 경우 성능을 개선시키는 돌연변이 (예를 들어, 치환) 을 말한다. 일부 바람직한 구현예에서, 이들 돌연변이 (예를 들어, 치환) 는 그러한 방법의 스크리닝 단계 동안 확인된 서열분석 적중에 의해 확인된다. 대부분의 구현예에서, 적중에서 더욱 종종 발견되는 돌연변이 (예를 들어, 치환) 는 비스크리닝된 조합 보존 돌연변이화 라이브러리에 비해 개선된 돌연변이 (예를 들어, 치환) 인 것 같다.

[0126] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "향상된 조합 보존 돌연변이화 라이브러리" 는 CCM 돌연변이화 및 스크리닝의

초기 조사로부터의 스크리닝 및/또는 서열분석 결과에 근거해 디자인 및 구축된 CCM 라이브러리를 말한다. 일부 구현예에서, 향상된 CCM 라이브러리는 CCM 의 초기 조사로부터 수득된 초기 적중의 서열을 근거로 한다.

부가적인 구현예에서, 향상된 CCM 은 돌연변이화 및 스크리닝의 초기 조사로부터의 초기 적중에서 종종 발견된 돌연변이가 바람직하도록 디자인된다. 일부 바람직한 구현예에서, 이것은 성능-감소 돌연변이를 코딩하는 프라이머를 생략하거나 초기 CCM 라이브러리에 사용된 다른 프라이머에 대해 성능-향상 돌연변이를 코딩하는 프라이머의 농도를 증가시켜 달성된다.

[0127] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "성능-감소 돌연변이" 는 비스크리닝된 조합 보존 돌연변이화 라이브러리와 비교하여 스크리닝으로부터 결과하는 적중에서 좀 덜 자주 발견된 조합 보존 돌연변이화 라이브러리 중의 돌연변이를 말한다. 바람직한 구현예에서, 스크리닝 방법은 "성능-감소 돌연변이" 를 함유하는 변이체의 풍부함을 제거 및/또는 감소시킨다.

[0128] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "기능성 검정법" 은 단백질의 활성을 유도시키는 검정법을 말한다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 용어는 단백질을 통상의 역량으로 기능하는 능력에 대해 분석하는 검정법 시스템을 말한다. 예를 들어, 효소의 경우, 기능성 검정법에는 반응을 촉진하는 효소의 유효성을 측정하는 것이 포함된다.

[0129] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "표적 특성" 은 변경되게 되는 출발 유전자의 특성을 말한다. 본 발명이 임의의 특정 표적 특성에 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 그러나, 일부 바람직한 구현예에서, 표적 특성은 유전자 생성물의 안정성 (예를 들어, 변성, 단백질가수분해 또는 다른 분해 인자에 대한 내성) 이고, 다른 구현예에서, 생성 숙주에서의 생성 수준은 변경된다. 게다가, 출발 유전자의 임의의 특성을 본 발명에서 발견할 수 있을 것으로 고려된다.

[0130] 본원에 사용되는 바와 같은 핵산의 문맥에서 용어 "특성" 또는 그의 문법적인 동의어는, 선택되거나 검출될 수 있는 핵산의 임의의 특성 또는 속성을 말한다. 이러한 특성에는 폴리펩티드에 대한 결합에 영향을 주는 특성, 특정 핵산을 포함하는 세포에 부여된 특성, 유전자 전사에 영향을 주는 특성 (예를 들어, 프로모터 강도, 프로모터 인지, 프로모터 조절, 증강자 기능), RNA 가공에 영향을 주는 특성 (예를 들어, RNA 스플라이싱, RNA 안정성, RNA 형태, 및 전사 후 개질), 전사에 영향을 주는 특성 (예를 들어, 수준, 조절, 리보솜 단백질에 대한 mRNA 의 결합, 번역 후 개질) 이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 핵산의 전사 인자, 폴리머라아제, 조절 인자 등에 대한 결합 부위는 바람직한 특성을 생성하거나 바람직하지 않은 특성을 확인하기 위해 변경될 수 있다.

[0131] 본원에 사용되는 바와 같은 폴리펩티드의 문맥에서 용어 "특성" 또는 그의 문법적인 동의어는, 선택되거나 검출될 수 있는 폴리펩티드의 임의의 특성 또는 속성을 말한다. 이러한 특성에는 산화 안정성, 기질 특이성, 촉매 활성, 열 안정성, 알칼리 안정성, pH 활성 프로파일, 단백질분해에 대한 내성, K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M 비율, 단백질 접힘, 번역 반응 유도, 리간드에 결합하는 능력, 수용체에 결합하는 능력, 분비되는 능력, 세포의 표면에 전시되는 능력, 올리고머를 형성하는 능력, 신호를 보내는 능력, 세포 증식을 촉진하는 능력, 세포 증식을 억제하는 능력, 세포자멸사를 유도하는 능력, 인산화 또는 글리코실화에 의해 개질되는 능력, 질환을 치료하는 능력이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0132] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "스크리닝" 은 당업계의 통상의 의미를 갖고, 일반적으로는 다단계 공정이다. 첫번째 단계에서, 돌연변이 핵산 또는 그로부터의 변이체 폴리펩티드를 제공한다. 두번째 단계에서, 돌연변이 핵산 또는 변이체 폴리펩티드의 특성을 측정한다. 세번째 단계에서, 측정된 특성을 상응하는 전구체 핵산의 특성, 상응하는 자연 발생적 폴리펩티드의 특성 또는 돌연변이 핵산 발생에 대한 출발 물질 (예를 들어, 초기 서열) 의 특성을 비교한다.

[0133] 변형된 특성을 갖는 핵산 또는 단백질의 수득을 위한 스크리닝 절차는 출발 물질의 특성에 따라 다르고, 이의 개질은 돌연변이체 핵산의 발생이 용이하게 의도된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 그러므로 당업자는 본 발명이 스크리닝될 임의의 특정 특성에만 제한되는 것이 아니며, 하기 특성 기재 목록은 단지 예시로서만 설명된다는 것을 인지할 것이다. 임의의 특정 특성을 위한 스크리닝 방법은 일반적으로 당업계에 기재되어 있다. 예를 들어, 돌연변이화 전후로 결합, pH, 특이성 등을 측정할 수 있으며, 이의 변화는 변경을 나타낸다. 바람직하게는, 스크리닝은 칩, 파지 디스플레이, 및 복합 기질 및/또는 표시자를 사용하는 검정법을 포함하나 이에 제한되지 않게 동시에 스크리닝되는 다중 샘플을 포함하는 고-처리량 방식으로 수행된다.

[0134] 본원에 사용되는 바와 같이, 일부 구현예에서, 스크리닝은 관심의 변이체를 변이체 집단으로부터 풍부하게 하는

선별 단계를 포함한다. 이들 구현예의 예에는 숙주 유기체에 대한 성장 유리성을 부여하는 변이체의 선별, 뿐만 아니라 파지 디스플레이 또는 임의의 기타 디스플레이 방법이 포함되며, 여기서 변이체는 결합 또는 촉매 특성에 근거한 변이체의 집단으로부터 포획될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 변이체의 라이브러리는 스트레스 (예를 들어, 열, 프로테아제, 변성, 등)에 노출되고, 이어서 여전히 미손상된 변이체가 스크리닝에서 확인되고 선별에 의해 풍부해진다. 상기 용어는 선별을 위해 임의의 적합한 수단을 포함하는 것으로 의도된다.

게다가, 본 발명이 임의의 특정 스크리닝 방법에 제한되는 것으로 의도되지는 않는다.

[0135] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "표적 랜덤화"는 하나 또는 여러 위치가 랜덤화된 다수의 서열을 생성하는 방법을 말한다. 일부 구현예에서, 랜덤화는 완료된다 (즉, 모든 4 개의 뉴클레오티드, A, T, G, 및 C는 랜덤화 위치에서 일어날 수 있다). 대안적인 구현예에서, 뉴클레오티드의 랜덤화는 4 개의 뉴클레오티드의 서브 세트에 제한된다. 표적된 랜덤화는 관심의 하나 또는 여러 단백질을 코딩하는, 하나 또는 여러 개의 서열 코돈에 적용할 수 있다. 발현되는 경우, 수득 라이브러리는 하나 이상의 아미노산 위치가 랜덤화 코돈의 랜덤화 계획에 의해 측정된 바와 같이, 모든 20 개의 아미노산의 혼합물 또는 아미노산의 서브세트를 함유할 수 있는 단백질 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 표적 랜덤화로부터 발생한 집단의 개별 일원은 코돈의 표적 또는 랜덤 삽입 또는 결실로 인해 아미노산의 수가 상이하다. 추가의 구현예에서, 합성 아미노산은 제조된 단백질 집단에 포함된다. 일부 바람직한 구현예에서, 표적 랜덤화로부터 생성된 집단의 대부분의 일원은 출발 유전자보다 보존 서열에 대해 더 큰 서열 상동성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 서열은 하나 이상의 관심의 단백질을 코딩한다. 대안적인 구현예에서, 단백질은 상이한 생물학적 기능을 갖는다. 일부 바람직한 구현예에서, 후임 서열은 하나 이상의 선별가능 마커를 포함한다.

[0136] 용어 "개질된 서열" 및 "개질된 유전자"는 자연 발생적 핵산 서열의 결실, 삽입 또는 개입을 포함하는 서열을 말하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 바람직한 구현예에서, 개질 서열의 발현 생성물은 절단된 단백질이다 (예를 들어, 개질이 서열의 결실 또는 개입인 경우). 일부 특히 바람직한 구현예에서, 절단된 단백질은 생물학적 활성을 보유한다. 대안적인 구현예에서, 개질 서열의 발현 생성물은 신장된 단백질이다 (예를 들어, 핵산 서열 내의 삽입을 포함하는 개질). 일부 구현예에서, 삽입은 절단된 단백질을 야기한다 (예를 들어, 삽입이 중지 코돈을 형성하는 경우). 그러므로, 삽입은 발현 생성물로서 절단된 단백질 또는 신장된 단백질을 야기할 수 있다.

[0137] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "치환"은 아미노산 서열 중의 하나의 아미노산을 아미노산 서열 중의 위치에서 또다른 아미노산으로 대체하는 것을 포함한다. 그러므로, 상기 용어는 아미노산 서열 중의 또다른 아미노산의 삽입 및/또는 결실이 서열 중의 아미노산의 관련 위치를 변경하는 상황을 포함한다. 그러므로, 아미노산은 (예를 들어, 본원에 기재된 방법을 사용하여) 치환에 대해 구체적으로 표적화되지 않을 수 있지만, 아미노산은 서열 중의 관련 위치에서의 변화로 인해 서열 중의 또다른 아미노산으로 "치환"될 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:8의 위치 1 및 2에서 아미노산 사이의 아미노산 삽입에 의해, 수득된 서열은 하나의 아미노산이 이동할 것이다 (즉, 본래 위치 2에 있던 아미노산은 이제 위치 3으로 이동함, 등). 상기 용어는 아미노산 서열 중의 다중 뿐 아니라, 단일 변경 (즉, 단일 또는 다중 치환)을 포함하는 것으로 의도된다. 또한 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 치환은 자연 발생적 아미노산, 그 다음 위치, 그 다음 치환된 아미노산으로 표시되는 것에 유념한다. 그러므로, N024E (또한 N24E로 표시됨)는 SEQ ID NO:8의 위치 24에서의 아스파라긴이 글루탐산으로 치환된 것으로 표시된다. 본원에서 지시되는 바와 같이, 다중 치환은 "/" 또는 "-"로 표시된다. 그러므로, "R127A-G65Q" 및 "R127A/G65Q"는 모두 위치 127 및 65에서의 아미노산이 치환된 것을 나타낸다 (즉, 위치 127에서의 아르기닌은 알라닌으로 치환되고, 위치 65에서의 글리신은 글루타민으로 치환되었다).

[0138] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "돌연변이 서열" 및 "돌연변이 유전자"는 상호교환적으로 사용되고, 숙주 세포의 야생형 서열에서 발생하는 하나 이상의 코돈에서 변경이 이루어진 서열을 말한다. 돌연변이 서열의 발현 생성물은 야생형과 비교해 변형된 아미노산 서열을 가진 단백질이다. 발현 생성물은 변경된 기능적 역할을 가질 수 있다 (예를 들어, 향상된 효소 활성).

[0139] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "상향 돌연변이"는 특성에 대한 $\Delta \Delta G$ 값이 모 단백질보다 나은 돌연변이를 말한다 ($\Delta \Delta G$ 값, <0).

[0140] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "하향 돌연변이"는 특성에 대한 $\Delta \Delta G$ 값이 모 단백질보다 낮은 돌연변이를 말한다 ($\Delta \Delta G$ 값, >0).

[0141] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "생산적 부위"는 제시된 특성에 대한 하나 이상의 상향 돌연변이를 갖는 위치

를 말한다.

- [0142] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "비생산적 부위" 는 제시된 특성에 대한 상향 돌연변이를 갖지 않는 위치를 말한다.
- [0143] 용어 "돌연변이유발 프라이머" 또는 "돌연변이유발 올리고뉴클레오타이드" (본원에서 상호교환적으로 사용됨) 는 주형 서열의 일부에 상응하고 그곳에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 조성물을 말하는 것으로 의도된다. 돌연변이유발 프라이머에 있어서, 프라이머는 주형 핵산에 정확하게 부합하지 않을 것이고, 프라이머에서의 미스매치(들) 은 핵산 라이브러리 내에 원하는 돌연변이를 도입하는데 사용된다. 본원에 사용되는 바와 같은, "비-돌연변이유발 프라이머" 또는 "비-돌연변이유발 올리고뉴클레오타이드" 는 주형 핵산에 정확하게 부합할 것인 올리고뉴클레오타이드 조성물을 말한다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 오직 돌연변이유발 프라이머만이 사용된다. 본 발명의 또다른 바람직한 구현예에서, 프라이머는 하나 이상의 영역에 돌연변이유발 프라이머가 포함되고, 올리고뉴클레오타이드 혼합물에 포함된 또한 비-돌연변이유발 프라이머가 있도록 고안된다. 돌연변이유발 프라이머 중 하나 이상에 상응하는 돌연변이유발 프라이머 및 비-돌연변이유발 프라이머의 혼합물을 첨가하여, 다양한 조합 돌연변이 패턴이 제시된 수득되는 핵산 라이브러리를 생성하는 것이 가능하다. 예를 들어, 돌연변이 핵산 라이브러리의 일원 중 일부는 특정 위치에서 그의 전구체 서열을 보존하는 반면, 다른 일원은 상기 위치에서 돌연변이되는 것이 바람직한 경우, 비-돌연변이유발 프라이머는 제시된 잔기에 대한 핵산 라이브러리 내 비-돌연변이 일원의 특정 수준을 수득하는 능력을 제공한다. 본 발명의 방법은 일반적으로 길이가 10-50 개 염기인, 더욱 바람직하게는 길이가 약 15-45 개 염기인 돌연변이유발 및 비-돌연변이유발 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 그러나, 원하는 돌연변이화 결과를 얻기 위해 10 개 염기보다는 짧거나 50 개 염기보다는 긴 길이의 프라이머를 사용하는 것이 필요할 수 있다. 해당하는 돌연변이유발 및 비-돌연변이유발 프라이머에 있어서, 상응하는 올리고뉴클레오타이드의 길이가 일치해야 할 필요는 없으나, 첨가되는 돌연변이에 상응하는 영역 중에 중복은 있다.
- [0144] 프라이머는 본 발명에 따른 미리 정의된 비율로 첨가될 수 있다. 예를 들어, 수득되는 라이브러리가 특정한 특이적인 돌연변이의 수준이 유의하고, 동일 또는 상이한 부위에서 상이한 돌연변이의 양이 더 적은 것이 바람직한 경우, 첨가되는 프라이머의 양을 조절하여, 원하는 방향의 라이브러리를 생성하는 것이 가능하다. 대안적으로는, 비-돌연변이유발 프라이머를 더 적게 또는 더 많이 첨가함으로써, 상응하는 돌연변이(들) 이 돌연변이 핵산 라이브러리에서 생성되는 빈도를 조정하는 것이 가능하다.
- [0145] 본원에 사용되는 바와 같은, 어구 "인접 돌연변이" 는 동일한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 내에 존재하는 돌연변이를 말한다. 예를 들어, 인접 돌연변이는 서로 인접하거나 근처에 있을 수 있으나, 이들은 동일한 프라이머에 의해 수득되는 돌연변이 주형 핵산 내에 도입될 것이다.
- [0146] 본원에 사용되는 바와 같은, 어구 "비인접 돌연변이" 는 별도의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 내에 존재하는 돌연변이를 말한다. 예를 들어, 비인접 돌연변이는 별도로 생성된 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 의해 수득되는 돌연변이 주형 핵산 내에 도입될 것이다.
- [0147] 용어 "야생형 서열," 또는 "야생형 유전자" 는 숙주 세포에서 천연 또는 자연 발생하는 서열을 말하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 야생형 서열은 단백질 공학 계획의 시작점인 관심의 서열을 말한다. 야생형 서열은 상동 또는 이종 단백질을 코딩할 수 있다. 상동 단백질은 숙주 세포가 개입 없이 생성할 단백질이다. 이종 단백질은 숙주 세포가 개입이 없다면 생성하지 않을 단백질이다.
- [0148] 본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "항체" 는 면역글로불린을 말한다. 항체에는 항체를 생성하기에 바람직한 임의의 종으로부터 직접적으로 수득되는 면역글로불린이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명은 개질 항체를 포함한다. 또한 상기 용어는 미손상 항체가 결합하는 에피토프에 결합하는 능력을 보유하고, 폴리클론 항체, 단일클론 항체, 키메라성 항체, 항-개체특이형 (항-ID) 항체를 포함하는 항체 조각을 말한다. 항체 조각에는 상보성 결정 영역 (CDR), 단쇄 조각 가변 영역 (scFv), 중쇄 가변 영역 (VH), 경쇄 가변 영역 (VL) 이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리클론 및 단일클론 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 바람직하게는, 항체는 단일클론 항체이다.
- [0149] 용어 "산화에 안정한" 은 단백질분해, 가수분해, 세정 또는 본 발명의 다른 절차, 예를 들어 표백제 또는 산화제에 노출되거나 이와 접촉하는 동안 널리 행해지는 조건 하에서 제시된 시간에 걸쳐 특이적 양의 효소 활성을 보유하는 본 발명의 프로테아제를 말한다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 예를 들어, 적어도 1 분, 3 분, 5 분, 8 분, 12 분, 16 분, 20 분 등의 제시된 시간에 걸쳐 표백제 또는 산화제와 접촉한 후, 적어도 50%, 60%,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 단백질분해 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, 안정성은 실시예에 기재되는 바와 같이 측정된다.

[0150] 용어 "킬레이트제에 안정한" 은 단백질분해, 가수분해, 세정 또는 본 발명의 다른 절차, 예를 들어 킬레이트제에 노출되거나 이와 접촉하는 동안 널리 행해지는 조건 하에서 제시된 시간에 걸쳐 특이적 양의 효소 활성을 보유하는 본 발명의 프로테아제를 말한다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 예를 들어, 적어도 10 분, 20 분, 40 분, 60 분, 100 분 등의 제시된 시간에 걸쳐 킬레이트제와 접촉한 후, 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 단백질분해 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, 킬레이트제 안정성은 실시예에 기재되는 바와 같이 측정된다.

[0151] 용어 "열적으로 안정한" 및 "열안정성" 은 단백질분해, 가수분해, 세정 또는 본 발명의 다른 절차, 예를 들어 변형된 온도에 노출되는 동안 널리 행해지는 조건 하에서 제시된 시간에 걸쳐 확인된 온도에 노출 후 특이적 양의 효소 활성을 보유하는 본 발명의 프로테아제를 말한다. 변형된 온도에는 증가 또는 감소된 온도가 포함된다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 예를 들어, 적어도 60 분, 120 분, 180 분, 240 분, 300 분 등의 제시된 시간에 걸쳐 변형된 온도에 노출된 후, 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 단백질분해 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, 열안정성은 실시예에 기재되는 바와 같이 측정된다.

[0152] 산화, 킬레이트제, 열 및/또는 pH 에 안정한 프로테아제의 문맥에서 용어 "향상된 안정성" 은 다른 세린 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 프로테아제) 및/또는 야생형 효소와 비교하여 시간에 걸쳐 보다 높은 단백질분해 활성을 보유하는 것을 말한다.

[0153] 산화, 킬레이트제, 열 및/또는 pH 에 안정한 프로테아제의 문맥에서 용어 "감소된 안정성" 은 다른 세린 프로테아제 (예를 들어, 서브틸리신 프로테아제) 및/또는 야생형 효소와 비교하여 시간에 걸쳐 보다 낮은 단백질분해 활성을 보유하는 것을 말한다.

[0154] 용어 "세정 활성" 은 단백질분해, 가수분해, 세정 또는 본 발명의 다른 절차 동안 널리 행해지는 조건 하에서 프로테아제에 의해 달성되는 세정력을 말한다. 일부 구현예에서, 세정 성능은 표준 세정 조건에 적용 후 다양한 크로마토그래프, 분광광도계 또는 다른 정량 방법론에 의해 측정된 바와 같이 예를 들어 잔디, 혈액, 우유, 또는 계란 단백질과 같은 효소 민감성 얼룩과 관련된 다양한 세정 검정법의 적용에 의해 측정된다. 예시적 검정법에는 WO 99/34011, 및 미국 특허 6,605,458 (둘 다 본원에 참조로서 인용됨) 호에 기재된 것들 뿐 아니라, 실시예에 포함된 방법들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0155] 용어 프로테아제의 "세정에 효과적인 양" 은 특정 세정 조성물의 원하는 수준의 효소 활성을 달성하는 본원에서 이전에 기재된 프로테아제의 양을 말한다. 이러한 효과량은 당업자에 의해 쉽게 확인되며, 많은 인자, 예컨대 사용되는 특정 프로테아제, 세정 적용, 세정 조성물의 특정 조성, 및 액체 또는 건조 (예를 들어, 과립, 막대) 조성물이 필요한지의 여부 등에 근거한다.

[0156] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "세정 보조 물질" 은, 특정 유형의 바람직한 세정 조성물 및 생성물 형태 (예를 들어, 액체, 과립, 분말, 막대, 페이스트, 스프레이, 정제, 젤; 또는 발포 조성물) 로부터 선택되는 임의의 액체, 고체 또는 기체 물질을 의미하고, 상기 물질은 또한 바람직하게는 조성물에 사용되는 프로테아제 효소와 상용가능하다. 일부 구현예에서, 과립 조성물은 "압축" 형태이고, 다른 구현예에서, 액체 조성물은 "농축" 형태이다.

[0157] 세정 활성의 문맥에서 용어 "향상된 성능" 은 표준 세정 사이클 및/또는 복합 세정 사이클 후 통상의 평가에 의해 측정된 바와 같은 달걀, 우유, 잔디 또는 혈액과 같은 특정 효소 민감성 얼룩의 증가된 또는 더 큰 세정 활성을 말한다.

[0158] 세정 활성의 문맥에서 용어 "감소된 성능" 은 표준 세정 사이클 후 통상의 평가에 의해 측정된 바와 같은 달걀, 우유, 잔디 또는 혈액과 같은 특정 효소 민감성 얼룩의 감소된 또는 더 적은 세정 활성을 말한다.

[0159] 세정 활성의 문맥에서 용어 "비교 성능" 은 OPTIMASE™ 프로테아제 (Genencor), PURAFECT™ 프로테아제 제품 (Genencor), SAVINASE™ 프로테아제 (Novozymes), BPN'-변이체 (예를 들어 미국 특허 번호 Re 34,606 호 참조), RELASE™, DURAZYME™, EVERLASE™, KANNASE™ 프로테아제 (Novozymes), MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™ 프로테아제 (Genencor; 또한 미국 특허 번호 Re 34,606 호, 및 미국 특허 번호 5,700,676 호; 5,955,340 호; 6,312,936 호; 및 6,482,628 호 참조), 및 B. 렌투스 (B. lentus) 변이체 프로테아제 제품 (예를 들어, WO 92/21760 호, WO 95/23221 호 및/또는 WO 97/07770 호에 기재된 것들) 을 포함하나 이에 제한되지

않는 비교 서브틸리신 프로테아제 (예를 들어, 시판 프로테아제) 의 세정 활성의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상을 말한다. 예시적 서브틸리신 프로테아제 변이체에는 BPN' 의 위치 76, 101, 103, 104, 120, 159, 167, 170, 194, 195, 217, 232, 235, 236, 245, 248, 및/또는 252 에 동등한 잔기 위치에 서 치환 또는 결실을 갖는 것들이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 세정 성능은 표준 세정 사이클 조건 후 통상의 분광광도계 또는 분석 방법론에 의해 측정된 바와 같은 잔디, 혈액 또는 우유와 같은 효소 민감성 얼룩과 관련된 다양한 세정 검정법에서 본 발명의 프로테아제를 상기 서브틸리신 프로테아제와 비교하여 측정할 수 있다.

[0160] 본원에 사용되는 바와 같은, "저 세제 농도" 시스템에는 약 800 ppm 미만의 세제 성분이 세정수에 존재하는 세제가 포함된다. 일본 세제는 통상 대략 667 ppm 의 세제 성분이 세정수에 존재하기 때문에 전형적으로 저 세제 농도 시스템으로 간주된다.

[0161] 본원에 사용되는 바와 같은, "중 세제 농도" 시스템에는 약 800 ppm 내지 약 2000 ppm 의 세제 성분이 세정수에 존재하는 세제가 포함된다. 북미 세제는 통상 대략 975 ppm 의 세제 성분이 세정수에 존재하기 때문에 일반적으로 중 세제 농도 시스템인 것으로 간주된다. 브라질 세제는 전형적으로 대략 1500 ppm 이 세제 성분이 세정수에 존재한다.

[0162] 본원에 사용되는 바와 같은, "고 세제 농도" 시스템에는 약 2000 ppm 초과와 세제 성분이 세정수에 존재하는 세제가 포함된다. 유럽 세제는 대략 3000-8000 ppm 의 세제 성분이 세정수에 존재하기 때문에 일반적으로 고 세제 농도 시스템인 것으로 간주된다.

[0163] 본원에 사용되는 바와 같은, "섬유 세정 조성물" 에는 얼룩진 섬유 (예를 들어, 옷감, 린넨, 및 기타 직물 물질) 의 적시기 및/또는 예비처리에 사용하기에 적합한 조성물 및 세탁 첨가 조성물을 포함하는 손세탁 및 기계세탁 세제 조성물이 포함된다.

[0164] 본원에 사용되는 바와 같은, "비-섬유 세정 조성물" 에는 식기세정 세제 조성물, 구강 세정 조성물, 양치 세정 조성물, 및 개인 세정 조성물을 포함하나 이에 제한되지 않는 비-직물 (즉, 섬유) 표면 세정 조성물이 포함된다.

[0165] 본원의 세정 조성물의 "압축" 형태는 밀도에 의해, 그리고 조성에 있어서 무기 충전제 염의 양에 의해 가장 잘 반영된다. 무기 충전제 염은 분말 형태의 세제 조성물이 통상적인 성분이다. 통상적인 세제 조성물에서, 충전제 염은 상당한 양으로, 전형적으로 총 조성의 17 내지 35 중량% 로 존재한다. 반대로, 압축 조성물에서, 충전제 염은 총 조성의 15% 를 넘지 않는 양으로 존재한다. 일부 구현예에서, 충전제 염은 조성의 10 중량% 를 넘지 않는 양으로, 또는 더욱 바람직하게는 5 중량% 로 존재한다. 일부 구현예에서, 무기 충전제 염은 술페이트 및 클로라이드의 알칼리 및 알칼리 토금속 염으로부터 선택된다. 바람직한 충전제 염은 나트륨 술페이트이다.

[0166] II. 본 발명의 세린 프로테아제 효소 및 그의 서열

[0167] 본 발명은 변이체 프로테아제를 코딩하는 아미노산 서열을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 그 전체가 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호는 야생형 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 세린 프로테아제 뿐 아니라, 수 많은 변이체 프로테아제, 신호 펩티드 코딩 서열, 및 아미노산 서열을 포함하는 다양한 프로테아제를 제공한다. 본 발명의 일부 바람직한 구현예에서, 셀룰로모나스 종 (Cellulomonas spp.) 은 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 기재된 바와 같은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM16035) 이다.

[0168] A. 세린 프로테아제

[0169] 제시된 유기체 중에서 자연적으로 발생하는 효소의 서열에 변이가 있을 수 있지만, 동일한 종의 유기체에 의해 제조된 특이적 유형의 효소는 제시된 조건 (예를 들어, 온도, pH, 물 경도, 산화 상태, 길레이트화 상태, 및 농도) 하에서의 기질 특이성 및/또는 단백질분해 활성 수준, 등에 있어 실질적으로 일치한다. 그러므로, 본 발명의 목적을 위해, 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 의 다른 균주 및 종이 또한 본 발명의 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 프로테아제를 생성하여 본 발명의 프로테아제를 위한 유용한 공급원을 제공하는 것이 계획된다.

게다가, 본원에 제시되는 바와 같이, 마이크로코시네아에 (Micrococccineae) 의 다른 일원이 본 발명에 사용될 수 있을 것이라고 계획된다.

[0170] 일부 구현예에서, 본 발명의 가수분해 폴리펩티드는 물리화학적으로 특징화되는 반면, 다른 구현예에서는, 이들

은 그들의 기능성을 근거로 특징화되고, 추가의 구현예에서는, 이들은 그의 일련의 특성을 사용하여 특징화된다. 물리화학적 특성은 잘 알려진 기술, 예컨대 SDS 전기영동, 겔 여과, 아미노산 조성, 질량 분석 (예를 들어, MALDI-TOF-MS, LC-ES-MS/MS, 등), 및 단백질의 분자량을 측정하기 위한 침강, 단백질의 pI 를 측정하기 위한 등전위 집중, 단백질의 아미노산 서열을 측정하기 위한 아미노산 서열분석, 단백질의 3 차 구조를 측정하기 위한 결정학 연구, 및 단백질에 존재하는 항원 에피토프를 측정하기 위한 항체 결합을 이용한다.

[0171] 일부 구현예에서, 기능 특성은 프로테아제 분야의 당업자에게 잘 공지된 기술에 의해 측정되며, 다양한 시판 기질, 예컨대 디-메틸 카세인 ("DMC") 및/또는 AAPF-pNA 의 가수분해가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 기능 특성에 대한 상기 바람직한 기술은 본원에 제공되는 실시예에서 더욱 상세히 기재된다.

[0172] 또한 성숙 프로테아제는 단백질분해 활성 (예를 들어, 펩티드 연결을 갖는 기질에 대한 가수분해 활성), 예컨대 DMC 를 나타낸다. 추가 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 확인된 조건 하에서 향상된 세정력을 제공한다. 본 발명이 본원에 기재된 프로테아제 69B4 를 포함하지만, 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 69B4 의 단백질분해 활성과 비교하여 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 단백질분해 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 동일한 조건 하에서 상표명 SAVINASE® (Novzymes) 또는 PURAFECT® (Genencor) 로 판매되는 프로테아제의 단백질분해 활성과 비교하여 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 단백질분해 활성을 나타낸다.

일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 동일한 조건 하에서 69B4 와 비교하여, 확인된 조건 하에서 필적하는 또는 향상된 세정력을 나타낸다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 동일한 조건 하에서 상표명 SAVINASE® (Novzymes) 또는 PURAFECT® (Genencor) 로 판매되는 프로테아제와 비교하여, 확인된 조건 하에서 필적하는 또는 향상된 세정력을 나타낸다.

[0173] 또다른 추가의 구현예에서, 본 발명의 프로테아제를 코딩하는 프로테아제 및/또는 폴리뉴클레오티드는 정제된 형태 (즉, 자연 발생적 또는 야생형 유기체에 존재하는 것보다 높은 또는 낮은 농도로 특정 조성물에 존재함), 또는 자연 발생적 또는 야생형 유기체로부터 발현시 정상적으로 존재하지 않는 성분과 조합으로 제공된다. 그러나, 본 발명의 프로테아제가 적합한 다양한 적용에 사용되는 프로테아제 순도의 범위와 같은 임의의 특정 순도 수준의 프로테아제에 본 발명이 제한되는 것으로 의도되는 것은 아니다.

[0174] B. 세린 프로테아제의 핵산 및 아미노산 서열

[0175] 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035)로부터 유래된 asp 유전자의 DNA 서열 (SEQ ID NO: 1) 이 하기에 제공된다. 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 프로테아제의 신호 펩티드를 코딩하는 시작 폴리뉴클레오티드는 굵은 글씨로 표현된다 (ATG). 상기 서열에는 또한 신호 펩티드 및 전구체 세린 프로테아제가 포함된다.

[0176] 하기 DNA 서열 (SEQ ID NO:2) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035)로부터 유래된 전구체 프로테아제 (SEQ ID NO:7) 에 작동적으로 연결된 신호 펩티드 (SEQ ID NO:9) 를 코딩한다. 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 프로테아제의 신호 펩티드를 코딩하는 시작 폴리뉴클레오티드는 굵은 글씨로 표현된다 (ATG). 종결 코돈 (TGA) 은 잔기 1486 으로부터 시작된다. 잔기 85, 595, 및 1162 는 N 말단 전-서열 (prosequence), 성숙 서열 및 카르복시 말단 전-서열의 시작 잔기에 각각 관련되고, 굵은 글씨로 표현되고 밑줄쳐있다.

ATGACACCAC	GCACAGTCAC	GCGGGCCCTG	GCCGTGGCCA	CCGCAGCCGC	CACACTCCTG	60
GCAGGCGGCA	TGGCCGCCCA	GGCCAACGAG	CCCGCACCAC	CCGGGAGCGC	GAGCGCACCG	120
CCACGCCCTGG	CCGAGAAGCT	CGACCCCGAC	CTCCTCGAGG	CCATGGAGCG	CGACCTGGGC	180
CTCGACGCGG	AGGAAGCCGC	CGCCACCCCTG	GCGTTCAGC	ACGACGCAGC	CGAGACCGGC	240
GAGGCCCTCG	CCGAAGAGCT	CGACGAGGAC	TTGCGCCGCA	CCTGGGTCGA	GGACGACGTC	300
CTGTACGTCTG	CCACCACCGA	CGAGGACGCC	GTCGAGGAGG	TCGAGGGCGA	AGGCGCCACG	360
GCCGTCACCG	TCGAGCACTC	CCTGGCCGAC	CTCGAGGCCT	GGAAGACCGT	CCTCGACGCC	420
GCCCTCGAGG	GCCACGACGA	CGTGCCCAAC	TGGTACGTCG	ACGTCGCCGAC	CAACAGCGTC	480
GTCGTCGCGG	TCAAGGCCCG	AGCCAGGAC	GTCGCCGCGG	GCCTCGTCGA	AGGTGCCGAC	540
GTCCCGTCCG	ACGCCGTGAC	CTTCGTCGAG	ACCGACGAGA	CCCCGCGGAC	CATGTTGAC	600
GTGATCGGCG	GCAACGCCCTA	CACCATCGGG	GGGCGCAGCC	GCTGCTCGAT	CGGGTTCCGCG	660
GTCAACGGCG	GGTTCATCAC	CGCCGGCCAC	TGCGGCCGCA	CCGGCGCCAC	CACCGCCAAC	720
CCCACCGGGA	CCTTCGCCCG	GTCCAGCTTC	CCGGGCAACG	ACTACGCGTT	CGTCCGTACC	780
GGGGCCGGCG	TGAACCTGCT	GGCCAGGTC	AACAACACT	CCGGTGGCCG	CGTCCAGGTC	840
GCCGGGCACA	CCGCGGCCCC	CGTCGGCTCG	GCCGTGTGCC	GGTCCGGGTC	GACCACCGGG	900
TGGCACTGCG	GCACCATCAC	TGCGCTCAAC	TCCTCGGTCA	CCTACCCCGA	GGGCACCGTC	960
CGCGGCCTGA	TCCGCACCAC	CGTCTGCGCC	GAGCCCGGCG	ACTCCGGTGG	CTCGCTGCTC	1020

[0177]

GCCGGCAACC AGGCCCAGGG CGTCACGTCC GCGGGCTCCG GCAACTGCCG CACCGGTGGC 1080
 ACCACGTTCT TCCAGCCGGT CAACCCCATC CTCCAGGCGT ACGGCCTGAG GATGATCACC 1140
 ACGGACTCGG GCAGCAGCCC GGGCCCTGCA CCGACCTCCT GCACCGGCTA CGCCCGCACC 1200
 TTCACCGGA CCTCGCGGC CGGCGGGGCC GCGGCCAGC CCAACGGGTC CTACGTGCAG 1260
 GTCACCGGT CCGGGACCCA CAGCGTGTGC CTCACGGGC CCTCCGGTGC GGACTTCGAC 1320
 CTCCTACGTG AGCGCTGGAA CCGCAGCTCC TGGGTGACCG TCGCCAGAG CACCTCCCC 1380
 GGCTCCAACG AGACCATCAC CTACCGCGGC AACGCGGGCT ACTACCGCTA CGTGGTCAAC 1440
 GCCGCTCCG GCTCCGGTGC CTACACCATG GGGCTCACC TCCCTGA 1488
 (SEQ ID NO:2)

[0178]

[0179]

하기 DNA 서열 (SEQ ID NO:3) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 전구체 프로테아제를 코딩한다.

1 AACGAGCCCC CACCACCCGG GAGCGCGAGC GCACCGCCAC GCCTGGCCGA GAAGCTCGAC
 TTGCTCGGGC GTGGTGGGCC CTCGCGCTCG CGTGGCGGTG CGGACCGGCT CTTCGAGCTG
 61 CCCGACTTCC TCGAGGCCAT GGAGCGGAC CTGGGCCTCG ACGCGGAGGA AGCCGCGGCC
 GGGCTGGAGG AGCTCCGGTA CCTCGCGCTG GACCCGGAGC TGCGCCTCCT TCGGCGGGCG
 121 ACCCTGGCGT TCCAGCACGA CGCAGCCGAG ACCGGCGAGG CCCTCGCCGA AGAGCTCGAC
 TGGGACCCGA AGGTCGTGCT GCGTCGGCTC TGGCCGCTCC GGGAGCGGCT TCTCGAGCTG
 181 GAGGACTTCG CCGGCACCTG GGTTCGAGGAC GACGTCCTGT ACGTCGCCAC CACCGACGAG
 CTCCTGAAGC GGCGTGGAC CCAGCTCCTG CTGCAGGACA TGCAGCGGTG GTGGCTGCTC
 241 GACGCGCTCG AGGAGGTCTGA GGGCGAAGGC GCCACGGCCG TCACCGTCGA GCACTCCCTG
 CTGCGGCAGC TCCTCCAGCT CCGCTTCCG CGGTGCCGGC AGTGGCAGCT CGTGAGGGAC
 301 GCCGACCTCG AGGCTTGGAA GACCGTCTC GACGCGGCC TCGAGGGCCA CGACGACGTG
 CGGCTGGAGC TCCGGACCTT CTGGCAGGAG CTGCGCGGG AGCTCCCGGT GCTGCTGCAC
 361 CCCACCTGGT ACGTCGACGT CCCGACCAAC AGCGTCGTG TCGCCGTCAA GGCCGGAGCC
 GGGTGGACCA TGCACTGCA GGGCTGGTTG TCGCAGCAGC AGCGGCAGTT CCGGCCTCGG
 421 CAGGACGTG CCGCCGGCCT CGTCGAAGGT GCCGACGTCC CGTCCGACGC CGTGACCTTC
 GTCCTGCAGC GCGCGCCGGA GCAGCTTCCA CCGGTGCAGG GCAGGTGCG GCACTGGAAG
 481 GTCGAGACCG ACGAGACCCC GCGGACCATG TTCGACGTGA TCGGCGGCAA CGCCTACACC
 CAGCTCTGGC TGCTCTGGG CGCTTGGTAC AAGCTGCACT AGCCCGCGTT GCGGATGTGG
 541 ATCGGGGGGC GCAGCGCTG CTCGATCGGG TTCGCGGTCA ACGGCGGGTT CATCACCGCC
 TAGCCCCCGC CGTCGGGAC GAGCTAGCCC AAGCGCCAGT TGCCGCCCAA GTAGTGGCGG
 601 GGCCACTGCG GCCGACCCG CGCCACCACC GCCAACCACA CCGGGACCTT CGCCGGGTCC
 CCGGTGACGC CGGCGTGGCC GCGGTGGTGG CGGTGGGGT GGCCCTGGAA GCGGCCCAGG
 661 AGCTTCCCGG GCAACGACTA CGCGTTCGTC CGTACCGGG CCGGCGTGAA CCTGCTGGCC
 TCGAAGGGCC CGTGTCTGAT GCGCAAGCAG GCATGGCCCC GGCCGCACTT GGACGACCGG
 721 CAGGTCAACA ACTACTCCG TGGCCGCGTC CAGGTGCGCG GGCACACCGC GGCCCCCGTC
 GTCCAGTTGT TGATGAGGCC ACCGGCGCAG GTCCAGCGGC CCGTGTGGCG CCGGGGGCAG
 781 GGCTCGGCGG TGTGCCGGTC CCGGTGCACC ACCGGGTGGC ACTGCGGCAC CATCACTGCG
 CCGAGCCGGC ACACGGCCAG GCCCAGCTGG TGGCCACCG TGACGCGGTG GTAGTGACGC
 841 CTCAACTCCT CGGTACCTA CCGCGAGGG ACCGTCCGCG GCCTGATCCG CACCACCGTC
 GAGTTGAGGA GCCAGTGGAT GGGCTCCCG TGGCAGGCGC CGGACTAGGC GTGGTGGCAG
 901 TGCGCCGAGC CCGGCGACTC CGGTGGCTCG CTGCTCGCG GCAACAGGCG CCGGGCGTGC
 ACGCGGCTCG GCGCGCTGAG GCCACCGAGC GACGAGCGGC CGTTGGTCCG GGTCCCGCAG
 961 ACGTCCGGCG GCTCCGGCAA CTGCGCGACC GGTGGCACA CGTTCTTCCA GCCGGTCAAC
 TGCAGGCCCG CGAGGCCGTT GACGGCGTGG CCACCGTGGT GCAAGAAGGT CGGCCAGTTG
 1021 CCCATCTTCC AGGCGTACGG CCTGAGGATG ATCACCACGG ACTCGGGCAG CAGCCCGGCC
 GGGTAGGAGG TCCGATGCC GGAATCTTAC TAGTGGTGCC TGAGCCCGTC GTCGGGCCGG
 1081 CCGTACCCGA CGTCTGACAC CGGCTACGCC CGCACCTTCA CCGGGACCTT CGCGGCCGGC
 GGACGTGGCT GGAGGACGTG GCCGATGCGG GCGTGGAAGT GGCCCTGGGA GCGCCGGCCG
 1141 CCGGCGCGCC CCCAGCCCAA CGGCTCCTAC GTGCAGGTCA ACCGGTCCGG GACCCACAGC
 GCGCGCGGCG GGGTCGGGTT GCCCAGGATG CACGTCCAGT TGGCCAGGCC CTGGGTGTCG
 1201 GTGTGCTTCA ACGGGCCCTC CGGTGCGGAC TTCGACCTT ACGTGCAGCG CTGGAACGGC
 CACACGGAGT TGCCCGGGAG GCCACGCTG AAGCTGGAGA TGCAGGTCGC GACCTTGCCG
 1261 AGCTCTCTGG TGACCGTCCG CCAGAGCACC TCCCGCGGCT CCAACGAGAC CATCACCTAC
 TCGAGGACCC ACTGGCAGCG GGTCTCGTGG AGGGGGCCGA GGTGCTCTG GTAGTGGATG

[0180]

1321 CGCGGCAACG CCGGCTACTA CCGCTACGTG GTCAACGCCG CGTCCGGCTC CGGTGCTTAC
 GCGCCGTTGC GGCCGATGAT GCGGATGCAC CAGTTGCGGC GCAGGCCGAG GCCACGGATG
 1381 ACCATGGGGC TCACCTTCCC CTGA (SEQ ID NO:3)
 TGGTACCCCG AGTGGGAGG GACT

[0181]

[0182]

하기 DNA 서열 (SEQ ID NO:4) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 성숙 프로테아제를 코딩한다.

```

1      TTCGACGTGA TCGGCGGCAA CGCCTACACC ATCGGGGGGC GCAGCCGCTG CTCGATCGGG
AAGCTGCACT AGCGCCCGTT GCGGATGTGG TAGCCCCCG CGTCGGCGAC GAGCTAGCCC
61     TTCGCGGTCA ACGGCGGGTT CATCACCGCC GGCCACTGCG GCCGCACCGG CGCCACCACC
AAGCGCCAGT TGCCGCCCAA GTAGTGCGCG CCGGTGACGC CGGCGTGGCC GCGGTGGTGG
121    GCCAACCCCA CCGGGACCTT CGCCGGGTCC AGCTTCCCG GCAACGACTA CGCGTTCGTC
CGGTTGGGGT GGCCTTGAA GCGGCCCAGG TCGAAGGGCC CGTTGCTGAT GCGCAAGCAG
181    CGTACCGGG CCGGCGTGAA CCTGCTGGCC CAGGTCAACA ACTACTCCG TGGCCGCGTC
GCATGGCCCC GGGCGCACTT GGACGACCGG GTCCAGTTGT TGATGAGGCC ACCGGCGCAG
241    CAGGTCGCGG GGCACACCGC GGCCCCCGTC GGCTCGGCGG TGTGCCGCTC CCGGTGCGAC
GTCCAGCGGC CCGTGTGGCG CCGGGGGCAG CCGAGCCGCG ACACGGCCAG GCCCAGCTGG
301    ACCGGGTGGC ACTGCGGCAC CATCACTGCG CTCAACTCCT CGGTACCTA CCCGAGGGC
TGGCCCCACC TGACGCCGTG GTAGTGACGC GAGTTGAGGA GCCAGTGGAT GGGGCTCCCG
361    ACCGTCCGCG GCCTGATCCG CACCACCGTC TGCGCCGAGC CCGGCGACTC CGGTGGCTCG
TGGCAGGCGC CGGACTAGGC GTGGTGGCAG ACGCGGCTCG GGCCGCTGAG GCCACCGAGC
421    CTGCTCGCCG GCAACCGAGC CCAGGGCGTC ACGTCCGCGC GCTCCGGCAA CTGCCGCACC
GACGAGCGGC CGTTGGTCCG GGTCCCGCAG TGCAGGCCGC CGAGGCCGTT GACGGCGTGG
481    GGTGGACCA CGTTCTTCCA GCCGGTCAAC CCCATCCTCC AGGCGTACCG CCTGAGGATG
CCACCGTGGT GCAAGAAGGT CGGCCAGTTG GGGTAGGAGG TCCGCATGCC GGACTCCTAC
561    ATCACACCG ACTCGGGCAG CAGCCCG (SEQ ID NO:4)
TAGTGGTGCC TGAGCCCGTC GTCGGGC

```

[0183]

[0184]

하기 DNA 서열 (SEQ ID NO:5) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 신호 펩티드를 코딩한다.

```

1      ATGACACCAC CACAGTCAAC GCGGGCCCTG GCCGTGGCCA CCGCAGCCGC CACACTCCTG
TACTGTGGTG CGTGTCTAGT CGCCCCGGAC CGGCACCGGT GCGCTCGGCG GTGTGAGGAC
61     GCAGGCGGCA TGGCCGCCCA GGCC (SEQ ID NO:5)
CGTCCGCGGT ACCGGCGGGT CCGG

```

[0185]

[0186]

하기 서열은 SEQ ID NOS: 1, 2, 3 및 4 에 언급된 DNA 서열에 의해 코딩된 신호 서열 [분절 1a-c] (잔기 1-28 [-198 내지 -171]), N-말단 전-서열 [분절 2a-r] (잔기 29-198 [-170 내지 -1]), 성숙 프로테아제 [분절 3a-t] (잔기 199-387 [1-189]), 및 C-말단 전-서열 [분절 4a-l] (잔기 388-495 [190-398]) 을 포함하는, 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 신호 서열 및 전구체 프로테아제의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6) 이다. 성숙 프로테아제 아미노산 서열의 N-말단 서열은 굵은 글씨로 표시된다.

```

1      MTPRTVTRAL AVATAAATLL AGGMAAQA NE PAPPGSASAP PRLAEKLDPD
1a      1b      1c      2a 2b      2c
51     LLEAMERDLG LDAEEAAATL AFOHDAETG EALAEELDED FAGTWVEDDV
2d      2e      2f      2g      2h
101    LYVATDDEDA VEEVEGEGAT AVTVEHSLAD LEAWKTVLDA ALEGHDDVPT
2i      2j      2k      2l      2m
151    WYVDVPTNSV VVAVKAGAQD VAAGLVEGAD VPSDAVTFVE TDETPRTM FD

2n      2o      2p      2q      2r      3a
201    VIGGNAYTIG GRSRCSIGFA VNGGFITAGH CGRTGATTAN PTGTFAGSSF
3b      3c      3d      3e      3f
251    PGNDYAFVRT GAGVNLLAQV NNYSGGRVQV AGHTAAPVGS AVCRSGSTTG
3g      3h      3i      3j      3k
301    WHCGTITALN SSVTYPEPTV RGLIRTTVCA EPGDSGGSLL AGNQAGVTS
3l      3m      3n      3o      3p
351    GSGNCRTGG TTFQPVNPI LQAYGLRMIT TDSGSSP APA PTSCTGYART
3q      3r      3s      3t      4a 4b
401    FTGTLAAGRA AAQPNGSYVQ VNRSGTHSVC LNGPSGADFD LYVQRWNGSS
4c      4d      4e      4f      4g
451    WVTVAQSTSP GSNETITYRG NAGYYRYVVN AASGSGAYTM GLTLP (SEQ ID
NO:6)
4h      4i      4j      4k      4l

```

[0188]

[0189]

하기 서열 (SEQ ID NO:7) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 전구체 프로테아제의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7) 이다.

```

1   NEPAPPGSAS APPRLAEKLD PDLLEAMERD.LGLDAEEAAA.TLAFQHDAAE
51  TGEALAEELD EDFAGTWVED DVLYVATTDE DAVEEVEGEG ATAVTVEHSL
101 ADLEAWKTVL DAALEGHDDV PTWYVDVPTN SVVVAVKAGA QDVAAGLVEG
151 ADVPSDAVTF VETDETPTM FDVIGGNAYT IGGRSRCSIG FAVNGGFITA
201 GHCGRGTGATT ANPTGTTFAGS SFPGN DYAFV RTGAGVNLLA QVNNYSGGRV
251 QVAGHTAAPV GSAVCRSGST TGWHCGTITA LNSSVTYPEG TVRGLIRTTV
301 CAEPGDSGGS LLAGNQAQGV TSGGSGNCRT GGTTFQFVN PILQAYGLRM
351 ITTDSGSSPA PAPTSCTGYA RTFTGTLAG RAAQPNNGSY VQVNRSGTHS
401 VCLNGPSGAD FDLYVQRWNG SSWVTVAQST SPGSNETITY RGNAGYYRYV
451 VNAASGSGAY TMGLTLP (SEQ ID NO:7)

```

[0190]

[0191]

하기 서열 (SEQ ID NO:8) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 성숙 프로테아제의 아미노산 서열이다. 촉매 3 개조 잔기 H32, D56 및 S132 는 굵은 글씨로 표현되고 밑줄쳐있다.

```

1   FDVIGGNAYT IGGRSRCSIG FAVNGGFITA GHCGRGTGATT ANPTGTTFAGS
51  SFPGN DYAFV RTGAGVNLLA QVNNYSGGRV QVAGHTAAPV GSAVCRSGST
101 TGWHCGTITA LNSSVTYPEG TVRGLIRTTV CAEPGDSGGS LLAGNQAQGV
151 TSGGSGNCRT GGTTFQFVN PILQAYGLRM ITTDSGSSP (SEQ ID NO:8)

```

[0192]

[0193]

하기 서열 (SEQ ID NO:9) 은 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 균주 69B4 (DSM 16035) 유래의 프로테아제의 신호 펩티드의 아미노산 서열이다.

```

1   MTPRTVTRAL AVATAAATLL AGGMAAQA (SEQ ID NO:9)

```

[0194]

[0195]

일부 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1 에 언급된 폴리뉴클레오티드 길이 대략 1621 개 염기 쌍의 적어도 일부를 포함하는 변이체를 포함한다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 야생형 (예를 들어, "모") 세린 프로테아제와 비교하여 다중 돌연변이를 갖는 변이체를 제공한다. 이들 더욱 특히 바람직한 구현예 중 일부에서, 이들 다중 돌연변이 변이체는 야생형 (예를 들어, "모") 세린 프로테아제와 비교하여, 개선된 성능을 나타낸다.

[0196]

당업자에 의해 이해될 것과 같이, 유전 코드의 퇴행으로 인해, 다양한 폴리뉴클레오티드가 본원에 및/또는 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호 (예를 들어, 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호의 SEQ ID NOS:6, 7, 및/또는 8) 에 제공된 신호 펩티드, 전구체 프로테아제 및/또는 성숙 프로테아제 또는 상기 기재된 % 서열 일치성을 갖는 프로테아제를 코딩할 수 있다. 본 발명의 또다른 구현예는 각각, 신호 펩티드 및 전구체 프로테아제, 전구체 프로테아제 및/또는 성숙 프로테아제를 각각 코딩하는 SEQ ID NOS:2, 3, 및/또는 4 의 폴리뉴클레오티드 서열과 70% 이상의 서열 일치성, 75% 이상의 서열 일치성, 80% 이상의 서열 일치성, 85% 이상의 서열 일치성, 90% 이상의 서열 일치성, 92% 이상의 서열 일치성, 95% 이상의 서열 일치성, 97% 이상의 서열 일치성, 98% 이상의 서열 일치성 및 99% 이상의 서열 일치성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0197]

부가적인 구현예에서, 본 발명은 코딩된 조각이 단백질분해 활성을 보유한다면 프로테아제를 코딩하는 DNA 의 조각 또는 일부를 제공한다. 본 발명의 또다른 구현예는 전구체 프로테아제를 코딩하는 SEQ ID NO: 1 의 폴리뉴클레오티드 서열의 20% 이상의 서열 길이, 30% 이상의 서열 길이, 40% 이상의 서열 길이, 50% 이상의 서열 길이, 60% 이상의 서열 길이, 70% 의 서열 길이, 75% 이상의 서열 길이, 80% 이상의 서열 길이, 85% 이상의 서열 길이, 90% 이상의 서열 길이, 92% 이상의 서열 길이, 95% 이상의 서열 길이, 97% 이상의 서열 길이, 98% 이상의 서열 길이 및 99% 이상의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 대안적인 구현예에서, 서열 길이의 이러한 조각 또는 일부는 재조합 DNA 서열 중 DNA 서열의 뒤섞기에 유용한 서열 길이의 연속 부분이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,132,970 호 참조).

[0198]

본 발명의 또다른 구현예에는 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 로부터 본원에 기재된 성숙 프로테아제 효소를 코딩할 수 있는 폴리뉴클레오티드, 또는 단백질분해 활성을 갖는 그의 분절을 단리 또는 확인하는데 사용할 수 있는 DNA 조각 일부 길이를 수득하는데 당업계에 인지된 기술에 따라 사용되는 본원에 기재된 DNA 의 조각이 포함된다. 더욱이, SEQ ID NO:1 에 제공된 DNA 는 단백질분해 활성을 갖는 프로테아제 또는 그의 일부를 코딩하는 기타 종으로부터, 특히 셀룰로모나스 종 (Cellulomonas spp.) 으로부터의 DNA 의 상동 조각을 확인하는데 사용된다.

[0199]

또한, 본 발명은 게놈 또는 cDNA 기원의 핵산을 스크리닝하기 위한 탐침 또는 프라이머로서, SEQ ID NO: 1 로부터 구축된 프라이머 또는 탐침 서열, 또는 그의 적합한 일부 또는 조각 (예를 들어, 적어도 약 5-20 또는 10-15

개의 연속 뉴클레오타이드)을 사용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 DNA SEQ ID NO: 1의 서열에 근거한, 바람직한 길이의 DNA 탐침 (즉, 일반적으로 길이 100 내지 1000 개의 염기)을 제공한다.

[0200] 일부 구현예에서, 전기이동으로 DNA 조각을 단리하고, 젤로부터 절단하고, 젤의 아가 매트릭스에서 이를 회수한다. 바람직한 구현예에서, 그 다음, 상기 DNA의 정제된 조각을 표지화하여 (예를 들어, 제조자의 지침에 따라 Megaprime 표지 시스템을 사용), DNA 중에 P³²를 혼입시킨다. 표지된 탐침은 제시된 시간 동안 (예를 들어, 5 분) 95°C로 가열하여 변성하고, 즉시 막 및 예비혼성화 용액에 첨가한다. 적합한 시간 동안 적합한 조건 하에서 (예를 들어, 37°C에서 18 시간), 약하게 진탕 또는 회전시키면서 혼성화 반응을 진행한다. 막을 행군다음 (예를 들어, SSC/0.3% SDS로 2 회), 적절하게 진탕하면서 적합한 세정 용액으로 세정한다. 바람직한 엄격함은 막 (필터)을 세정하는 조건의 반영이다. 본원의 일부 구현예에서, "저-엄격함" 조건에는 20°C에서 15 분 동안 0.2X SSC/0.1% SDS 용액으로의 세정이 포함되고, 다른 구현예에서, "중간-엄격함" 조건에는, 37°C에서 30 분 동안 0.2X SSC/0.1 % SDS 용액으로의 세정을 포함하는 세정 단계가 추가로 포함되고, 다른 구현예에서, "고-엄격함" 조건에는 37°C에서 45 분 동안 0.2X SSC/0.1% SDS 용액으로의 세정을 포함하는 세정 단계가 추가로 포함되고, 추가 구현예에서, "최대-엄격함" 조건에는 37°C에서 60 분 동안 0.2X SSC/0.1% SDS 용액으로의 세정을 포함하는 세정 단계가 추가로 포함된다. 그러므로, 본 발명의 다양한 구현예는 중간, 고 및/또는 최대 엄격함의 조건 하에서 SEQ ID NOS: 1 또는 2에 제공된 뉴클레오타이드 서열로부터 유래되는 탐침에 혼성화될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0201] 세정 후, 막을 건조하고, 결합된 탐침을 검출한다. 표지제로서 P³² 또는 또다른 방사능동위원소가 사용되는 경우, 결합된 탐침은 자가방사법으로 검출된다. 다른 탐침의 가시화를 위한 기타 기술은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 결합된 탐침의 검출은 핵산 서열이 원하는 상동을 갖는다는 것을 나타내고, 그러므로 본원에 제공된 임의의 관심의 서열에 대한 일치성은 본 발명에 의해 포함된다. 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 일부 또는 모두를 게놈 또는 cDNA 기원의 다른 핵산과 혼성화시키는 것을 포함하는 본 발명에 의해 포함되는 프로테아제를 코딩하는 핵산의 검출 방법을 제공한다.

[0202] 상기 지시된 바와 같이, 다른 구현예에서, 혼성화 조건은 하기 설명되는 바와 같이 정의된 "엄격함"을 부여하기 위한, 핵산 결합 복합체의 용융 온도 (T_m)에 근거한다. "최대 엄격함"은 전형적으로 약 T_m-5°C (탐침의 T_m의 5°C 미만)에서 일어나고; "고 엄격함"은 T_m의 약 5°C 내지 10°C 미만에서 일어나고; "중간 엄격함"은 T_m의 약 10°C 내지 20°C 미만에서 일어나고; "저 엄격함"은 T_m의 약 20°C 내지 25°C 미만에서 일어난다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 중간, 고 및/또는 최대 엄격함 혼성화는 폴리뉴클레오타이드 서열과 상동인 또는 동등한 폴리뉴클레오타이드 서열을 확인 또는 검출하기에 최적화된 상태로 선택된다.

[0203] 또다른 부가적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 프로테아제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 구축물 (즉, 발현 벡터)을 제공한다. 추가 구현예에서, 본 발명은 상기 벡터 중 하나 이상으로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[0204] 추가 구현예에서, 본 발명은 그 전체가 참조로서 인용된 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 기재된 신호 서열을 추가로 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 제공한다. 이러한 구현예 중 일부에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 신호 서열과 동일한 신호 활성을 실질적으로 갖는 추정 신호 서열을 갖는 서열을 제공하고, 폴리뉴클레오타이드는 중간, 고 및/또는 최대 엄격함의 조건 하에서 SEQ ID NO: 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열로부터 유래된 탐침에 혼성화할 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, 신호 활성은 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 기재된 바와 같이, 출발 물질로서 발효 배지 내로의 프로테아제의 분비가 실질적으로 동일한 수준에 의해 표시된다. 그램-양성 숙주 세포에서의 이종 또는 상동 단백질의 분비 수준을 측정하고 분비된 단백질을 검출하기 위한 부가적인 수단에는 단백질에 특이적인 폴리클론 또는 단일클론 항체를 사용하는 것이 포함된다. 예에는 당업자에게 잘 알려진 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA), 방사능면역검정법 (RIA) 및 형광 활성화 세포 분류 (FACS)가 포함된다.

[0206] 본 발명의 추가 양상은 SEQ ID NOS: 7 또는 8의 아미노산 서열, 및 본원 및 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 기재된 아미노산 서열에 대해 65% 아미노산 서열 일치성, 70% 이상의 서열 일치성, 75% 이상의 아미노산 서열 일치성, 80% 이상의 아미노산 서열 일치성, 85% 이상의 아미노산 서열 일치성, 90% 이상의 아미노산 서열 일치성, 92% 이상의 아미노산 서열 일치성, 95% 이상의 아미노산 서열 일치성, 97% 이상의 아미노산 서열 일치성, 98% 이상의 아미노산 서열 일치성 및 99% 이상의 아미노산 서열 일치성을 포함하는 단백질분해 활성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 상기 폴리펩티드의 단백질분해 활성은 당업계에 공지된 방법을 사용하여

측정되고, 여기에는 세제 기능을 평가하는데 사용되는 방법과 같은 방법이 포함된다. 추가 구현예에서, 폴리펩티드가 단리된다.

[0207] **III. 본 발명의 마이크로코시네아에 (Micrococcineae) (예를 들어, 셀룰로모나스 (Cellulomonas)) 프로테아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 수득**

[0208] 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제를 코딩하는 핵산은 당업계에 공지된 표준 절차, 예를 들어, 클로닝된 DNA (예를 들어, DNA "라이브러리"), 화학 합성, cDNA 클로닝, PCR, 게놈 DNA 또는 그의 조각의 클로닝, 또는 박테리아 또는 진균 종과 같은 원하는 세포로부터의 정제 (예를 들어, Sambrook et al, supra [1989]; 및 Glover and Hames (eds.), *DNA Cloning: A Practical Approach*. Vols. 1 and 2, Second Edition 참조) 에 의해 수득된다. 폴리뉴클레오티드 서열의 합성은 자동화 합성기의 사용 (예를 들어, Needham-VanDevanter et al., Nucl. Acids Res., 12:6159-6168 [1984] 참조) 을 포함하여, 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Lett., 22:1859-1862 [1981] 참조). DNA 서열은 또한 다양한 시판 공급원으로부터 주문 및 주문 제작될 수 있다. 본원에 더욱 상세히 기재되는 바와 같이, 일부 구현예에서, 게놈 DNA 유래의 핵산 서열은 코딩 영역 외에도 조절 영역을 함유한다.

[0209] 게놈 DNA 로부터의 유전자의 분자 클로닝을 포함하는 일부 구현예에서, DNA 조각이 발생되고, 이 중 몇몇은 원하는 유전자의 일부 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, DNA 는 다양한 제한 효소를 사용하여 특이적 부위에서 분할된다. 일부 대안적인 구현예에서, DNA 를 조각으로 만들기 위해 망간의 존재하에 DNase 가 사용되거나, DNA 는 물리적으로 (예를 들어, 초음파분쇄에 의해) 전단된다. 그 다음 제작된 선형 DNA 조각은, 아가로오스 및 폴리아크릴아미드 젤 전기영동, PCR 및 컬럼 크로마토그래피를 포함하나 이에 제한되지 않는 표준 기술에 의해 크기에 따라 분리되고 증폭된다.

[0210] 일단 핵산 조각이 생성되면, 프로테아제를 코딩하는 특이적 DNA 조각의 확인을 다수의 방식으로 달성할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, asp 유전자 또는 그의 특이적 RNA, 또는 그의 조각, 예컨대 탐침 또는 프라이머를 코딩하는 가수분해 효소를 단리하고, 표지한 다음, 당업계에 잘 공지된 혼성화 검정법에 사용하여, 발생된 유전자를 검출한다 (예를 들어, Benton and Davis, Science 196:180 [1977]; 및 Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961 [1975] 참조). 바람직한 구현예에서, 탐침과 실질적인 서열 유사성을 공유하는 DNA 조각은 중간 ~ 고 엄격함 하에서 혼성화된다.

[0211] 일부 바람직한 구현예에서, 당업계에 공지된 바와 같이 PCR 를 사용하여 증폭시킨다. 일부 바람직한 구현예에서, SEQ ID NOS: 1-5 로부터의 약 4 개 이상의 뉴클레오티드에서 약 60 개의 뉴클레오티드 (즉, 조각), 바람직하게는 약 12 내지 30 개의 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 약 25 개의 뉴클레오티드의 핵산 서열이 PCR 프라이머로서 임의의 적합한 조합으로 사용된다. 상기 동일한 조각은 또한 혼성화 및 생성물 검출 방법에서 탐침으로 사용된다.

[0212] 일부 구현예에서, cDNA 또는 게놈 라이브러리로부터 본 발명의 핵산 구축물의 단리는 단백질의 아미노산 서열에 근거하여 제작된 퇴행 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 PCR 을 이용한다. 이러한 프라이머는 임의의 분절 길이, 예를 들어 뉴클레오티드 길이가 4 개 이상, 5 개 이상, 8 개 이상, 15 개 이상, 20 개 이상일 수 있다.

[0213] 상기 관점에서, 본원에 제시되고 SEQ ID NOS: 1-5 에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 근거한 폴리뉴클레오티드 서열이 프로테아제 69B4 에 의해 발현되는 세린 프로테아제 활성을 갖는 효소를 코딩하는 다른 종, 특히 박테리아로부터의 폴리뉴클레오티드의 동일 또는 상동 조각을 수득하는데 유용하다는 것이 인정될 것이다. 부가적인 서열이 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 제시된다.

[0214] **IV. 본 발명의 세린 프로테아제의 다중 돌연변이 변이체**

[0215] 본원에 지시된 바와 같이, 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 세린 프로테아제의 다중 돌연변이 변이체를 제공한다. 일부 가장 특히 바람직한 구현예에서, 이들 변이체는 모 (예를 들어, 야생형) 프로테아제와 비교하여 개선된 성능을 나타낸다. 상기 가장 특히 바람직한 구현예 중 일부에서, 변이체는 개선된 세정력, LAS 안정성, 및/또는 단백질분해 활성을 갖는다. 그러므로, 이들 변이체는 식기세정 세제, 세탁 세제, 및 표면 세정 세제를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 적용에 사용된다.

[0216] **V. 본 발명의 세린 프로테아제의 발현 및 회수**

[0217] 본 발명의 세린 프로테아제의 발현 및 회수를 위한 임의의 적합한 수단이 본원에 사용된다. 게다가, 당업자

는 단백질분해 활성을 갖는 셀룰로모나스 (Cellulomonas)-유래의 폴리펩티드 뿐 아니라 부가적인 효소 (예를 들어, 단백질분해 활성을 갖는 두번째 펩티드, 예컨대 프로테아제, 셀룰라아제, 만난나아제, 또는 아밀라아제 등) 의 클로닝에 적합한 많은 방법을 알고 있다. 또한 숙주 세포의 유전자 또는 게놈 내로, 바람직한 임의의 부가적인 서열과 함께, 본 발명의 효소(들) 을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들) 의 하나 이상의 (예를 들어, 다중) 카피를 도입하기 위해 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다.

[0218] 일반적으로, 유전자의 클로닝 및 상기 유전자 내로의 외생 프로테아제 엔코딩 영역 (외생 엔코딩 영역의 다중 커피 포함) 의 도입을 위한 표준 절차가 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 69B4 프로테아제 유도체 또는 그의 상동 을 획득하는데 사용된다. 게다가, 실시예를 포함한 본 명세서는 이러한 교시를 제공한다. 그러나, 당업계에 알려진 부가적인 방법이 또한 적합하다 (예를 들어, Sambrook et al. supra (1989); Ausubel et al., supra [199S]; 및 Harwood and Cutting, (eds.) Molecular Biological Methods for Bacillus," John Wiley and Sons, [1990]; 및 WO 96/34946 참조).

[0219] 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 적합한 발현 벡터에서 이들을 발현 조절 서열에 작동적으로 연결하여 발현되고, 당업계에 잘 성립된 기술에 따라 적합한 숙주를 형질전환하기 위한 발현 벡터를 사용한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 DNA 서열 발현시 생성된 폴리펩티드는 세포 배양물의 발효로부터 분리되고, 당업계에 잘 성립된 기술에 따른 다양한 방식으로 정제된다. 당업자는 가장 적합한 분리 및 정제 기술을 선택할 수 있다.

[0220] 더욱 특히, 본 발명은 구축물, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 이러한 벡터로 형질전환된 숙주 세포, 이러한 숙주 세포에 의해 발현된 프로테아제, 미생물, 특히, 셀룰로모나스 (Cellulomonas) 종을 포함하나 이에 제한되지 않는 마이크로코시네아에 (Micrococccineae) 의 일원으로부터 유래하는 세린 프로테아제 효소의 생성을 위한 발현 방법 및 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 세린 프로테아제(들) 을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들) 는 세린 프로테아제(들) 의 발현에 적합한 재조합 숙주 세포를 생성하기 위해 사용된다. 일부 바람직한 구현예에서, 발현 숙주는 상업적으로 실용적인 양으로 프로테아제(들) 을 생성할 수 있다. 부가적인 사항은 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 제시되어 있다.

[0221] VI. 재조합 벡터 및 숙주 세포

[0222] 상기 지시되는 바와 같이, 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 언급된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 프로테아제를 코딩하는 본 발명의 벡터 (즉, 구축물) 는 게놈 기원이다 (예를 들어, 게놈 라이브러리를 사용하고 표준 기술에 따라 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하는 혼성화에 의한 프로테아제를 모두 또는 일부에 대해 코딩하는 DNA 서열의 스크리닝을 통해 제작됨). 상기 벡터는 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0223] 상기 지시되는 바와 같이, 일부 구현예에서, 본 발명은 또한 상기 기재된 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다. 부가적인 숙주 세포는 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0224] VII. 세린 프로테아제 효소의 적용

[0225] 본원에 더욱 상세히 기재되는 바와 같이, 본 발명의 프로테아제는 이들을 특정 적용에 매우 적합하게 만드는 중요한 특성을 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 프로테아제는 향상된 열 안정성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 효소는 또한 일부 현재 사용되는 프로테아제와 비교하여, 향상된 산화 안정성, 및 향상된 킬레이트제 안정성을 나타낸다. 그러므로, 이러한 프로테아제는 세정 조성물에 사용한다. 게다가, 특정 세정 조건하에서, 본 프로테아제는 현재 사용되는 서브틸리신 프로테아제와 비교하여, 이에 필적할만한 또는 향상된 세정력을 나타낸다. 그러므로, 본 발명의 세정 및/또는 효소 조성물은 다양한 세정 조성물로 제공될 것으로 계획된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 서브틸리신 프로테아제 (즉, 현재 사용되는 프로테아제) 와 동일한 방식으로 이용된다. 그러므로, 본 프로테아제는 다양한 세정 조성물 뿐 아니라 동물 먹이 적용, 가죽제품 가공 (예를 들어, 베이팅 (bating)), 단백질분해, 및 식물 용도로 사용된다. 확인된 프로테아제는 또한 개인 케어 적용에 사용된다.

[0226] 그러므로, 본 발명의 프로테아제는 다수의 산업적 적용, 특히 세정, 소독, 동물 먹이, 및 식물/가죽 산업에서 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제(들) 은 세제, 결합제, 표백제 및 기타 통상의 성분과 조합되어, 세탁 및 기타 세정 분야에 유용한 다양한 신규 세정 조성물, 예를 들어, 세탁 세제 (분말 및 액체 모두), 세탁 전-담금제, 모든 섬유 표백제, 자동 식기세정 세제 (액체 및 분말 모두), 가정 세정제, 특히 막대 및 액체 비누 적용, 및 배수구 막힘방지제를 생성한다. 또한, 프로테아제는 콘택트 렌즈 뿐 아니라 기타 물

건에 세정 조성물 수용액을 접촉시켜, 콘택트 렌즈 뿐 아니라 기타 물건의 세정에 사용된다. 또한 상기 자연 발생적 프로테아제는 예를 들어 펩티드 가수분해, 폐기물 처리, 직물 적용, 의료 장치 세정, 바이오필름 제거 및 단백질 제조에서의 융합-절단 효소 등으로 사용될 수 있다. 상기 생성물의 조성은 프로테아제(들)이 사용되는 설정에서 그의 기능을 유지하기만 한다면, 본 발명에서는 그리 결정적이지 않다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 세정에 효과적인 양의 프로테아제 또는 프로테아제 효소 제제를 포함하는 효소 조성물을 이러한 조성물의 통상의 성분과 이러한 분야에 인지된 양으로 조합하여 쉽게 제조된다.

[0227] 본 발명의 프로테아제는 세탁 및 식기 세제를 포함하나 이에 제한되지 않는 세정 산업에 특히 사용된다. 이들 적용은 다양한 환경 스트레스 하에서의 효소이다. 본 발명의 프로테아제는 다양한 조건하에서의 그의 안정성으로 인해, 많은 현재 사용되는 효소에 비해 장점을 제공한다.

[0228] 게다가, 세정에 포함되는 프로테아제가 노출되는 다양한 세제 제형, 세정수 부피, 세정수 온도, 및 세정시간을 포함하여 세정 조건은 다양하다. 또한, 상이한 지리학적 영역에서 사용되는 세제 제형은 세정수에 존재하는 관련 성분 농도가 상이하다. 예를 들어, 유럽 세제에는 전형적으로 약 4500-5000 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재하고, 일본 세제에는 전형적으로 대략 667 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재한다. 북미에서, 특히 미국에서, 세제에는 전형적으로 약 975 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재한다.

[0229] 저 세제 농도 시스템에는 약 800 ppm 미만의 세제 성분이 세정수에 존재하는 세제가 포함된다. 일본 세제는 대략 667 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재하므로 전형적으로 저 세제 농도 시스템으로 간주된다.

[0230] 중간 세제 농도에는 약 800 ppm 내지 약 2000 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재하는 세제가 포함된다. 북미 세제는 대략 975 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재하므로 일반적으로 중간 세제 농도 시스템으로 간주된다. 브라질 세제에는 전형적으로 대략 1500 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재한다.

[0231] 고 세제 농도 시스템에는 약 2000 ppm 초과인 세제 성분이 세정수에 존재하는 세제가 포함된다. 유럽 세제는 대략 4500-5000 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재하므로 일반적으로 고 세제 농도 시스템으로 간주된다.

[0232] 남미 세제는 일반적으로 고 비누 인산염 세척강화제(suds phosphate builder) 세제이며, 남미에서 사용되는 세제의 범위는 1500 내지 6000 ppm 범위의 세제 성분이 세정수에 존재하므로 중간 및 고 세제 농도 모두라고 볼 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 브라질 세제에는 전형적으로 대략 1500 ppm의 세제 성분이 세정수에 존재한다. 그러나, 기타 남미 국가에 제한되지 않는 기타 고 비누 인산염 세척강화제 세제 지역은, 약 6000 ppm 이하의 세제 성분이 세정수에 존재하는 고 세제 농도 시스템을 가질 수 있다.

[0233] 이에 비추어 보아, 세계적으로 전형적인 세정액 중의 세제 조성물의 농도가 약 800 ppm 미만의 세제 조성물("저 세제 농도 지역"), 예를 들어 일본에서는 약 667 ppm, 미국에서는 약 800 ppm 내지 약 2000 ppm("중간 세제 농도 지역"), 예를 들어 약 975 ppm, 그리고 브라질에서는 약 1500 ppm, 유럽에서는 약 2000 ppm 초과("고 세제 농도 지역"), 예를 들어 약 4500 ppm 내지 약 5000 ppm 및 고 비누 인산염 세척강화제 지역에서는 약 6000 ppm으로 다양하다는 것이 명백하다.

[0234] 전형적인 세정액의 농도는 경험적으로 측정된다. 예를 들어, 미국에서는 전형적인 세탁기는 약 64.4 L 부피의 세정액을 담는다. 따라서, 세정액 중에 약 975 ppm의 세제 농도를 수득하기 위해서는, 약 62.79 g의 세제 조성물을 64.4 L의 세정액에 첨가해야만 한다. 이 양은 세제와 함께 제공될 수 있는 계량컵을 사용하여 소비자가 세정수로 측정한 전형적인 양이다.

[0235] 추가 예로서, 상이한 지역은 상이한 세정 온도를 사용한다. 일본에서의 세정수의 온도는 전형적으로 유럽에서 사용되는 온도보다 낮다. 예를 들어, 북미 및 일본에서의 세정수의 온도는 10℃ 내지 30℃(예를 들어, 약 20℃)일 수 있는 반면, 유럽에서의 세정수의 온도는 전형적으로 30℃ 내지 60℃(예를 들어, 약 40℃)이다.

[0236] 추가 예로서, 상이한 지역은 전형적으로 물 경도가 상이하다. 물 경도는 일반적으로 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 껌론 당 그레인(grain)으로 표현된다. 경도는 물 중의 칼슘(Ca^{2+}) 및 마그네슘(Mg^{2+})의 양의 측정이다. 미국의 대부분의 물은 경질이나, 경도 값은 다양하다. 중간 경질(60-120 ppm)에서 경질(121-181 ppm)인 물은 백만 당 60 내지 181 부(미국 껌론 당 그레인으로 전환된 백만 당 부는 껌론 당 17.1에 동일한 그레인으로 나뉜 ppm #이다)의 경질 광물(표 13-1 참조)을 함유한다.

[0237] 유럽의 물 경도는 전형적으로 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 껌론 당 약 10.5 초과(예를 들어, 10.5-20.0)의 그레인(예를

들어, 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 겔론 당 약 15 그레인)이다. 북미의 물 경도는 전형적으로 일본의 물 경도보다 크나, 유럽의 물 경도보다는 적다. 예를 들어, 북미의 물 경도는 3 내지 10 그레인, 3-8 그레인 또는 약 6 그레인일 수 있다. 일본의 물 경도는 전형적으로 북미의 물 경도보다 낮으며, 일반적으로 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 겔론 당 4 미만, 예를 들어 3 그레인이다.

[0238] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 하나 이상의 세정 조건 설정 (예를 들어, 물 온도, 물 경도, 및/또는 세제 농도)에서 놀라운 세정 성능을 보여주는 프로테아제를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 그 세정 성능이 서브틸리신 프로테아제와 필적할만하다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 서브틸리신 프로테아제와 비교하여 향상된 세정 성능을 나타낸다. 그러므로, 본 발명의 일부 바람직한 구현예에서, 본원에 제공된 프로테아제는 향상된 산화 안정성, 향상된 열 안정성, 및/또는 향상된 킬레이트제 안정성을 나타낸다.

[0239] 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명은 ASP 프로테아제 뿐 아니라, 프로테아제의 상동 및 변이체를 제공한다. 특히 바람직한 구현예에서, ASP 변이체는 야생형 ASP 프로테아제 서열 중에 다중 치환을 포함한다. 상기 프로테아제는 식물 또는 섬유로부터 단백질 기재 얼룩을 세정하기를 바라는 임의의 적용에 사용된다.

[0240] 일부 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 세탁 첨가 조성물, 및 얼룩진 섬유의 예비처리에 사용되는데 적합한 조성물을 포함하는 손세탁 및 기계 세탁 세제 조성물, 행굼 첨가 섬유 유연제 조성물, 및 일반적으로 가정용 바닥·타일 (hard surface) 세정 작업 뿐 아니라, 식기세정 작업에 사용되는 조성물로서 제형화된다. 당업자는 세정 조성물로 사용될 수 있는 상이한 제형에 대해 익숙하다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 세제 조성물 (즉, 다른 프로테아제와 비교하여)의 필적할만한 또는 향상된 성능을 포함한다. 일부 구현예에서, 세정력은 표준 방법으로 달걀, 잔디, 혈액, 우유, 등과 같은 효소-민감성 얼룩을 이용하는 다양한 세정 검정법으로 본 발명의 프로테아제를 서브틸리신 프로테아제와 비교하여 평가한다. 게다가, 당업자는 표준 세정 사이클 조건 하에서 세제 성능을 평가하기 위해 사용되는 분광광도계 및 기타 분석 방법론에 친숙하다.

[0241] 본 발명에서 사용되는 검정법에는 WO 99/34011, 및 미국 특허 번호 6,605,458 호 (예를 들어, 실시예 3 참조)에 기재된 방법을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 미국 특허 번호 6,605,458 호의 실시예 3에서는, pH 10.5에서 세제 농도 3.0 g/l, 세정 시간 15 분, 15°C, 물 경도 6° dH, 교반 막대가 있는 150 ml 유리 비이커에 10 nM 효소 농도, 50 ml 중의 5 식물 조각 (phi 2.5 cm), [Center for Test Materials Holland]로부터의 EMPA 117 시험 물질을 사용하였다. 시험 물질에 대한 반사율 "R"의 측정은 Macbeth ColorEye 7000 광도계를 사용하여 460 nm에서 수행하였다. 부가적인 방법은 본원의 실시예에서 제공된다. 그러므로, 상기 방법은 또한 본 발명에 사용된다.

[0242] 통상의 세정 조성물에 본 발명의 프로테아제를 첨가하는 것은 임의의 특별한 사용 제한을 두지 않는다. 다른 말로 하면, 세제에 적합한 임의의 온도 및 pH는, pH가 본원에 언급된 범위 내에 있고, 온도가 기재된 프로테아제의 변성 온도 미만이라면 또한 본 발명에 적합하다. 또한, 본 발명의 프로테아제는 세제를 포함하지 않는 세정 조성물에, 그리고 단독으로 또는 강화제 및 안정화제와 조합으로 사용된다.

[0243] 세정 조성물 또는 세제에 사용되는 경우, 산화 안정성은 추가 고려사항이다. 그러므로, 일부 적용에서, 다양한 용도에 요구되는 서브틸리신 프로테아제에 대해 안정성은 향상되고, 감소하거나 그에 필적할만하다. 일부 바람직한 구현예에서, 향상된 산화 안정성이 요구된다. 본 발명의 프로테아제 중 일부는 이러한 적용에 특히 사용된다.

[0244] 세정 조성물 또는 세제에 사용되는 경우, 열 안정성은 추가 고려사항이다. 그러므로, 일부 적용에서, 다양한 용도에 요구되는 서브틸리신 프로테아제에 대해 안정성은 향상되고, 감소하거나 그에 필적할만하다. 일부 바람직한 구현예에서, 향상된 열 안정성이 요구된다. 본 발명의 프로테아제 중 일부는 이러한 적용에 특히 사용된다.

[0245] 세정 조성물 또는 세제에 사용되는 경우, 킬레이트제 안정성은 추가 고려사항이다. 그러므로, 일부 적용에서, 다양한 용도에 요구되는 서브틸리신 프로테아제에 대해 안정성은 향상되고, 감소하거나 그에 필적할만하다. 일부 바람직한 구현예에서, 향상된 킬레이트제 안정성이 요구된다. 본 발명의 프로테아제 중 일부는 이러한 적용에 특히 사용된다.

[0246] 본 발명의 일부 구현예에서, 자연 발생적 프로테아제는 서브틸리신 프로테아제와 비교하는 경우 상이한 pH에서 개질된 촉매 활성을 나타내는 것으로 제공된다. pH-활성 프로파일은 효소 활성에 대한 pH의 그래프이고,

실시예에 기재되는 바와 같이 및/또는 당업계에 공지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 일부 구현예에서, 좀 더 넓은 프로파일을 갖는 자연 발생적 프로테아제 (즉, 필적할만한 서브틸리신 프로테아제보다 pH 범위에서 더 큰 디메틸카세인 검정법을 갖는 것들)를 수득하는 것이 요구된다. 다른 구현예에서, 효소는 임의의 pH 에서 유의하게 좀 더 큰 활성을 갖지 않거나, 또는 좀더 좁은 프로파일을 갖는 자연 발생적 상동 (즉, 제시된 pH 에서 서브틸리신 프로테아제와 비교하는 경우 향상된 활성을 갖고, 그 밖에는 더 적은 활성을 갖는 것)을 갖는다. 그러므로, 다양한 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 pH 최적 조건 및/또는 범위가 상이하다. 본 발명이 임의의 특정 pH 또는 pH 범위에 제한되는 것으로는 의도되지 않는다.

[0247] 본 발명의 일부 구현예에서, 세정 조성물은 본 발명의 프로테아제를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 수준으로 69B4 및/또는 본 발명의 기타 프로테아제를 포함하고, 조성물의 나머지는 (예를 들어, 99.999중량% 내지 90.0중량%) 세정 보조 물질을 포함한다. 본 발명의 다른 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 69B4 및/또는 기타 프로테아제를 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 69B4 또는 본 발명의 기타 프로테아제 수준으로 포함하고, 세정 조성물의 나머지는 (예를 들어, 99.9999중량% 내지 90.0중량%, 99.999중량% 내지 98중량%, 99.995중량% 내지 99.5중량%) 세정 보조 물질을 포함한다.

[0248] 일부 구현예에서, 바람직한 세정 조성물은, 본 발명의 프로테아제 제제 외에도 세정력 및/또는 섬유 케어 이점을 제공하는 하나 이상의 부가적인 효소 또는 효소 유도체를 포함한다. 이러한 효소에는 기타 프로테아제, 리파아제, 큐티나아제, 아밀라아제, 셀룰라아제, 펙속시다아제, 옥시다아제 (예를 들어, 락카아제), 및/또는 만 난나아제가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0249] 알칼리 용액에서 사용하기에 적합한 임의의 기타 프로테아제가 본 발명의 조성물에 사용된다. 적합한 프로테아제에는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것들이 포함된다. 특히 바람직한 구현예에서, 미생물 프로테아제가 사용된다. 일부 구현예에서, 화학적으로 또는 유전학적으로 개질된 돌연변이체가 포함된다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 세린 프로테아제, 바람직하게는 알칼리 미생물 프로테아제 또는 트립신 유사 프로테아제이다. 알칼리 프로테아제의 예에는 서브틸리신, 특히 바실러스 (*Bacillus*) (예를 들어, 서브틸리신, 렌투스, 아밀로리케파시엔스, 서브틸리신 칼스베르그 (*Carlsberg*), 서브틸리신 309, 서브틸리신 147 및 서브틸리신 168)로부터 유래된 것들이 포함된다. 부가적인 예에는 모두 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 번호 RE 34,606 호, 5,955,340 호, 5,700,676 호, 6,312,936 호, 및 6,482,628 호에 기재된 돌연변이체 프로테아제가 포함된다. 부가적인 프로테아제의 예에는 트립신 (예를 들어, 돼지 또는 소 기원의 것), 및 WO 89/06270 호에 기재된 h프로테아제가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바람직한 시판 프로테아제 효소에는 상표명 MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT® 및 PURAFECT® OXP (Genencor) 로 판매되는 것들, 상표명 ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYM™, RELEASE® 및 ESPERASE® (Novozymes) 로 판매되는 것들; 및 상표명 BLAP™ (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Duesseldorf, Germany) 로 판매되는 것들이 포함된다. 다양한 프로테아제는 WO 95/23221 호, WO 92/21760 호, 및 미국 특허 번호 5,801,039 호, 5,340,735 호, 5,500,364 호, 5,855,625 호에 기재되어 있다. 부가적인 BPN' 변이체 (본원에 언급되는 바로는 "BPN'-var 1" 및 "BPN'-변이체 1")는 US RE 34,606 호에 기재되어 있다. 부가적인 GG36-변이체 (본원에 언급되는 바로는 "GG36-var.1" 및 "GG36-변이체 1")는 US 5,955,340 호 및 5,700,676 호에 기재되어 있다. 추가의 GG36-변이체는 미국 특허 6,312,936 호 및 6,482,628 호에 기재되어 있다. 본 발명의 하나의 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 부가적인 프로테아제 효소를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 수준으로 포함하고, 조성물의 99.999중량% 내지 90.0중량% 로 세정 보조 물질을 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 69B4 프로테아제 (또는 그의 상동 또는 변이체)를 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 69B4 프로테아제 수준으로 포함하고, 세정 조성물의 나머지는 (예를 들어, 99.9999중량% 내지 90.0중량%, 99.999중량% 내지 98중량%, 99.995중량% 내지 99.5중량%) 세정 보조 물질을 포함한다.

[0250] 또한, 알칼리 용액에 사용하기에 적합한 임의의 리파아제가 본 발명에서 사용된다. 적합한 리파아제에는 박테리아 또는 진균 기원의 것들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적으로 또는 유전학적으로 개질된 돌연변이도 본 발명에 포함된다. 유용한 리파아제의 예에는 휴미콜라 라누기노사 (*Humicola lanuginosa*) 리파아제 (예를 들어, EP 258 068 호, 및 EP 305 216 호 참조), 리조무코르 미에헤이 (*Rhizomucor miehei*) 리파아제 (예를 들어, EP 238 023 호 참조), 칸디다 (*Candida*) 리파아제, 예컨대 C. 안타르크티카 (*C. antarctica*) 리파아제 (예를 들어, C. 안타르크티카 (*C. antarctica*) 리파아제 A 또는 B; 예를 들어, EP 214 761 호 참조), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 리파아제, 예컨대 P. 알칼리제네스 (*P. alcaligenes*) 및 P. 슈도알칼

리제네스 (*P. pseudoalcaligenes*) 리파아제 (예를 들어, EP 218 272 호 참조), *P. 세파시아* (*P. cepacia*) 리파아제 (예를 들어, EP 331 376 호 참조), *P. 스투트제리* (*P. stutzeri*) 리파아제 (예를 들어, GB 1,372,034 호 참조), *P. 플루오레세인* (*P. fluoresceins*) 리파아제, 바실러스 (*Bacillus*) 리파아제 (예를 들어, *B. 서브틸리스* (*B. subtilis*) 리파아제 [Dartois et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1131:253-260 [1993]]; *B. 스테아로테르모필러스* (*B. stearothermophilus*) 리파아제 [예를 들어, JP 64/744992 호 참조]; 및 *B. 푸밀러스* (*B. pumilus*) 리파아제 [예를 들어, WO 91/16422 호 참조]) 가 포함된다.

[0251] 게다가, 페니실리움 카멤베르티 (*Penicillium camembertii*) 리파아제 (Yamaguchi et al., *Gene* 103:61-67 [1991] 참조), 제오트리쿰 칸디둠 (*Geotricum candidum*) 리파아제 (Schimada et al., *J. Biochem.*, 106:383-388 [1989] 참조), 및 다양한 리조푸스 (*Rhizopus*) 리파아제, 예컨대 *R. 텔레마르* (*R. delemar*) 리파아제 (Hass et al., *Gene* 109:117-113 [1991] 참조), *R. 니베우스* (*R. niveus*) 리파아제 (Kugimiya et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:716-719 [1992]) 및 *R. 오리자에* (*R. oryzae*) 리파아제를 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 클로닝된 리파아제가 본 발명의 일부 구현예에서 사용된다.

[0252] 또한 슈도모나스 멘도시나 (*Pseudomonas mendocina*) 유래의 큐티나아제 (WO 88/09367 호 참조), 또는 푸사리움 솔라니피시 (*Fusarium solanipisi*) 유래의 큐티나아제 (WO 90/09446 호 참조) 를 포함하나 이에 제한되지 않는 큐티나아제와 같은 다른 유형의 지방분해 효소가 본 발명의 일부 구현예에서 사용된다.

[0253] 부가적인 적합한 리파아제에는 시판 리파아제, 예컨대 M1 LIPASE™, LUMA FAST™, 및 LIPOMAX™ (Genencor); LIPOLASE® 및 LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); 및 LIPASE P™ "Amano" (Amano Pharmaceutical Co; Ltd., Japan) 가 포함된다.

[0254] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 리파아제를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 의 부가적인 리파아제 수준으로, 조성물의 나머지 중량% 는 세정 보조 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 다른 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 리파아제를, 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 리파아제 수준으로 포함한다.

[0255] 알칼리 용액에서 사용하기에 적합한 임의의 아밀라아제 (알파 및/또는 베타) 는 또한 본 발명의 일부 구현예에서 사용된다. 적합한 아밀라아제에는 박테리아 또는 진균 기원의 것들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적으로 또는 유전학적으로 개질된 돌연변이도 일부 구현예에 포함된다. 본 발명에 사용되는 아밀라아제에는 *B. 리체니포르미스* (*B. licheniformis*) 로부터 수득된 α-아밀라아제 (예를 들어, GB 1,296,839 호 참조) 가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 사용되는 시판 아밀라아제에는 DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, 및 BAN™ (Novozymes) 및 RAPIDASE®, 및 MAXAMYL® P (Genencor International) 가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 아밀라아제를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 의 부가적인 아밀라아제 수준으로, 조성물의 나머지 중량% 는 세정 보조 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 다른 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 아밀라아제를, 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 아밀라아제 수준으로 포함한다.

[0256] 알칼리 용액에서 사용하기에 적합한 임의의 셀룰라아제는 본 발명의 구현예에서 사용된다. 적합한 셀룰라아제에는 박테리아 또는 진균 기원의 것들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적으로 또는 유전학적으로 개질된 돌연변이도 일부 구현예에 포함된다. 적합한 셀룰라아제에는 휴미콜라 인솔렌 (*Humicola insolens*) 셀룰라아제 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,435,307 호 참조) 가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특히 적합한 셀룰라아제는 색조 케어 장점을 가진 셀룰라아제 (예를 들어, EP 0 495 257 호 참조) 이다.

[0257] 본 발명에 사용되는 시판 셀룰라아제에는 CELLUZYME® (Novozymes), 및 KAC-500(B)™ (Kao Corporation) 이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 셀룰라아제는 N-말단 부분이 결실된, 성숙 야생형의 일부 또는 조각 또는 변이체 셀룰라아제로서 혼입된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,874,276 호 참조).

[0258] 일부 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 셀룰라아제를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 의 부가적인 셀룰라아제 수준으로, 조성물의 나머지 중량% 는 세정 보조 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 셀룰라아제를, 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 셀룰라아제 수준으로 포함한다.

[0259] 세제 조성물 및 또는 알칼리 용액에서 사용하기에 적합한 임의의 만난나아제는 본 발명에서 사용된다. 적합

한 만난나아제에는 박테리아 또는 진균 기원의 것들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적으로 또는 유전학적으로 개질된 돌연변이도 일부 구현예에 포함된다. 다양한 만난나아제는 본 발명에서 사용되는 것으로 알려져 있다 (예를 들어, 모두 참조로서 본원에 인용된 미국 특허 번호 6,566,114 호, 미국 특허 번호 6,602,842 호, 및 미국 특허 번호 6,440,991 호 참조).

[0260] 일부 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 만난나아제를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 의 부가적인 만난나아제 수준으로, 조성물의 나머지 중량% 는 세정 보조 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 만난나아제를, 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 만난나아제 수준으로 포함한다.

[0261] 일부 구현예에서, 퍼옥시다아제는 과산화수소 또는 그의 공급원 (예를 들어, 퍼카르보네이트, 퍼보레이트 또는 퍼술펜이트) 과 함께 사용된다. 대안적인 구현예에서, 옥시다아제는 산소와 조합으로 사용된다. 양쪽 유형의 효소는 바람직하게는 강화제 (예를 들어, WO 94/12621 호 및 WO 95/01426 호 참조) 와 함께, "용액 표백" (즉, 세정액에서 섬유를 함께 세정할 때, 염색된 섬유에서 또다른 섬유로 직물 염료가 물드는 것을 방지하기 위함) 에 사용된다. 적합한 퍼옥시다아제/옥시다아제에는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것들이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학적으로 또는 유전학적으로 개질된 돌연변이도 일부 구현예에 포함된다.

[0262] 일부 구현예에서, 본 발명의 세정 조성물은 퍼옥시다아제 및/또는 옥시다아제 효소를 조성물의 0.00001중량% 내지 10중량% 의 부가적인 퍼옥시다아제 및/또는 옥시다아제 효소 수준으로, 조성물의 나머지 중량% 는 세정 보조 물질을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 양상에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 퍼옥시다아제 및/또는 옥시다아제 효소를, 조성물의 0.0001중량% 내지 10중량%, 0.001중량% 내지 5중량%, 0.001중량% 내지 2중량%, 0.005중량% 내지 0.5중량% 퍼옥시다아제 및/또는 옥시다아제 효소 수준으로 포함한다.

[0263] 상기 언급된 효소의 혼합물, 특히 69B4 효소, 하나 이상의 부가적인 프로테아제, 하나 이상의 아밀라아제, 하나 이상의 리파아제, 하나 이상의 만난나아제, 및/또는 하나 이상의 셀룰라아제의 혼합물이 본원에 포함된다. 게다가, 상기 효소의 다양한 혼합물이 본 발명에 사용될 것으로 계획된다.

[0264] 프로테아제와 하나 이상의 부가적인 효소의 수준 변화는 모두 독립적으로 10% 범위일 수 있고, 세정 조성물의 나머지는 세정 보조 물질인 것으로 계획된다. 특이적인 세정 보조 물질의 선택은 세정되어야 할 표면, 물품 또는 섬유, 및 사용 동안의 세정 조건 동안 (예를 들어, 세정 세제 사용 동안) 조성물의 원하는 형태를 고려하여 쉽게 이루어질 수 있다.

[0265] 적합한 세정 보조 물질의 예에는 계면활성제, 강화제, 표백제, 표백 활성화제, 표백 촉매, 기타 효소, 효소 안정화 시스템, 킬레이트물질 (chelant), 형광 증백제, 오염 방출 중합체, 염료 전이제, 분산제, 비누 (suds) 억제제, 염료, 향수, 착색제, 충전제 염, 히드로트롭 (hydrotrope), 광활성화제, 형광물질, 섬유 컨디셔너, 가수분해가능 계면활성제, 방부제, 향산화제, 향수촉제, 향구김제, 살균제, 살진균제, 색조 얼룩, 실버케어 (silvercare), 항변색제 및/또는 항부식제, 알칼리성 공급원, 가용화제, 담체, 가공 보조제, 안료, 및 pH 조절제 (예를 들어, 모두 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 번호 6,610,642 호, 6,605,458 호, 5,705,464 호, 5,710,115 호, 5,698,504 호, 5,695,679 호, 5,686,014 호 및 5,646,101 호 참조) 가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 특이적 세정 조성물 물질의 구현예는 하기에 상세히 예시된다.

[0266] 세정 보조 물질이 세정 조성물 중에서 본 발명의 프로테아제와 비상용성이지 않다면, 세정 보조 물질과 프로테아제(들) 을 이 두 성분의 조합이 적절할 때까지 분리된 채로 유지하는 (즉, 서로 접촉되지 않음) 적합한 방법이 사용된다. 이러한 분리 방법에는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법이 포함된다 (예를 들어, 젤리캡슐 (gelcap), 캡슐화, 정제, 물리적인 분리, 등).

[0267] 바람직하게는 본원에 제시된 유효량의 하나 이상의 프로테아제(들) 는 단백질성 얼룩 제거가 필요한 다양한 표면의 세정에 유용한 조성물에 포함된다. 이러한 세정 조성물에는 딱딱한 표면, 섬유 및 접시 세정과 같은 적용을 위한 세정 조성물이 포함된다. 게다가, 일부 구현예에서, 본 발명은 섬유 세정 조성물을 제공하는 반면, 다른 구현예에서, 본 발명은 비-섬유 세정 조성물을 제공한다. 현저하게, 본 발명은 또한 구강 케어 (덴트리피스 (dentrifice), 치약, 구강 세정제, 등 뿐 아니라, 의치 세정 조성물 포함) 를 포함하는 개인 케어에 적합한 세정 조성물, 피부, 및 모발 세정 조성물을 제공한다. 본 발명은 임의의 형태 (즉, 액체, 파립, 막대, 반고체, 젤, 에멀전, 정제, 파립 등) 의 세제 조성물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0268] 예를 들어, 본 발명의 프로테아제가 사용되는 여러 세정 조성물은 이하에 더욱 상세히 기재되어 있다. 본

발명의 세정 조성물이 세탁기 세정법(들)에서 사용하기에 적합한 조성물로 제형화되는 구현예에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 하나 이상의 계면활성제 및 하나 이상의 강화제 화합물 뿐 아니라, 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 표백제, 부가적인 효소, 비누 억제제, 분산제, 석회-비누 (soap) 분산제, 오물 현탁 및 항-재침 전제 및 부식억제제로부터 선택되는 하나 이상의 세정 보조 물질을 함유한다. 일부 구현예에서, 세탁 조성물은 또한 연화제 (즉, 부가적인 세정 보조 물질로서)를 함유한다.

- [0269] 또한 본 발명의 조성물은 고체 또는 액체 형태의 세제 첨가제 생성물을 사용한다. 이러한 첨가제 생성물은 통상의 세제 조성물의 성능을 보충 및/또는 강화시키는 것으로 의도되고, 세정 과정의 임의의 단계에서 첨가될 수 있다.
- [0270] 설것이에 사용하기 위한 조성물로서 제형화된 구현예에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 하나 이상의 계면활성제, 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 비누 향상제, II 군 금속 이온, 용매, 히드로트롭 및 부가적인 효소로부터 선택되는 하나 이상의 부가적인 세정 보조 물질을 함유한다.
- [0271] 일부 구현예에서, 본원의 세탁 세제 조성물의 밀도는 400 내지 1200 g/리터의 범위이고, 다른 구현예에서, 밀도는 20℃에서 측정된 조성물의 500 내지 950 g/리터 범위이다.
- [0272] 일부 구현예에서, 다양한 세정 조성물, 예컨대 미국 특허 번호 6,605,458 호에 제시된 조성물이 본 발명의 프로테아제와 사용된다. 그러므로, 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 조성물은 압축 과립 섬유 세정 조성물이고, 다른 구현예에서, 상기 조성물은 색조 섬유의 세탁에 유용한 과립 섬유 세정 조성물이고, 추가의 구현예에서, 상기 조성물은 세정 용량을 통해 연화시키는 과립 섬유 세정 조성물이고, 부가적인 구현예에서, 상기 조성물은 강력 (heavy duty) 액체 섬유 세정 조성물이다.
- [0273] 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 번호 6,610,642 호 및 미국 특허 번호 6,376,450 호에 기재된 것과 같은 섬유 세정 조성물이다. 부가적으로, 본 발명의 프로테아제는 유럽 또는 일본 세정 조건 하에서 특정 유용성의 과립 세탁 세제 조성물 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,610,642 호 참조)에 사용된다.
- [0274] 대안적인 구현예에서, 본 발명은 본원에 제공된 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 바닥·타일 세정 조성물을 제공한다. 그러므로, 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 번호 6,610,642 호, 미국 특허 번호 6,376,450 호, 및 미국 특허 번호 6,376,450 호에 기재된 것과 같은 바닥·타일 세정 조성물이다.
- [0275] 또다른 추가의 구현예에서, 본 발명은 본원에 제공된 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 식기세정 조성물을 제공한다. 그러므로, 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 번호 6,610,642 호, 및 미국 특허 번호 6,376,450 호에 기재된 것과 같은 바닥·타일 세정 조성물이다.
- [0276] 또다른 추가의 구현예에서, 본 발명은 본원에 제공된 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 식기세정 조성물을 제공한다. 그러므로, 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 번호 6,376,450 호, 및 미국 특허 번호 6,376,450 호에 기재된 것과 같은 구강 케어 세정 조성물을 포함한다.
- [0277] 상기 언급된 미국 특허 번호 6,376,450 호; 6,605,458 호; 6,605,458 호; 및 6,610,642 호에 포함된 화합물 및 세정 보조 물질에 대한 제형 및 기재는 본원에 참조로서 표현적으로 인용된다. 또다른 추가의 예가 하기 실시예에 언급된다.
- [0278] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 프로테아제를 음식 또는 동물 먹이와 혼합하는 것을 특징으로 하는, 음식 또는 동물 먹이의 제조를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 가공 전 건조 생성물로서 첨가되나, 다른 구현예에서는 이것은 가공 전 또는 후에 액체로서 첨가된다. 일부 구현예에서, 건조 분말이 사용되는 경우, 효소는 제분된 낱알과 같은 건조 담체에 액체로서 희석된다. 본 발명의 프로테아제는 동물 먹이의 성분 및/또는 첨가제, 예컨대 본원에 모두 참조로서 인용되는 미국 특허 번호 5,612,055 호, 미국 특허 번호 5,314,692 호, 및 미국 특허 번호 5,147,642 호에 기재된 것들로서 사용된다.
- [0279] 본 발명에 따른 효소 먹이 첨가제는 다수의 방법으로 제조하기에 적합하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이것은 적합한 활성을 갖는 상이한 효소를 혼합하여 효소 믹스를 제조하여 간단히 제조된다. 일부 구현예에서, 상기 효소 믹스는 먹이와 직접 혼합되나, 다른 구현예에서는, 이것은 제분된 밀가루, 옥수수가루 또는 콩가루와 같은 곡물-기재 담체 물질에 함침된다. 또한 본 발명은 효소 먹이 첨가제로 사용되므로, 상기 함침된 담체를 포함한다.

- [0280] 일부 대안적인 구현예에서, 곡물-기재 담체 (예를 들어, 제분된 밀 또는 옥수수) 는 적합한 활성을 갖는 효소와 동시에 또는 순차적으로 함침된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 제분된 밀 담체에 첫번째로 자일라나아제, 두번째로 프로테아제, 및 임의로 β -글루카나아제를 분산시켰다. 또한 본 발명은 효소 먹이 첨가제로서 사용되므로 상기 함침된 담체를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 함침된 담체는 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함한다.
- [0281] 일부 구현예에서, 본 발명의 먹이 첨가제는 동물 먹이와 직접적으로 혼합되고, 대안적인 구현예에서, 이는 비타민 먹이 첨가제, 미네랄 먹이 첨가제, 및/또는 아미노산 먹이 첨가제와 같은 하나 이상의 기타 먹이 첨가제와 혼합된다. 그 다음 여러가지 다양한 종류의 성분을 포함하는 수득된 먹이 첨가제는 먹이와 적합한 양으로 혼합된다.
- [0282] 일부 바람직한 구현예에서, 곡물-기재 담체를 포함하는 본 발명의 먹이 첨가제는 통상 먹이 1 킬로그램 당 0.01 내지 50 g, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 10 g/킬로그램, 가장 바람직하게는 약 1 g/킬로그램의 양으로 혼합된다.
- [0283] 대안적인 구현예에서, 본 발명의 효소 먹이 첨가제는 원하는 효소(들) 을 원하는 상대적인 양으로 생성하는 재조합 미생물의 구조물을 포함한다. 일부 구현예에서, 이것은 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 코딩하는 유전자의 카피수 증가에 의해, 및/또는 프로테아제(들) 을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 적합하게 강한 프로모터의 사용에 의해 달성된다. 추가 구현예에서, 재조합 미생물 균주는 원하는 바와 같은 소실된 특정 효소 활성 (예를 들어, 셀룰라아제, 엔도글루카나아제 등) 을 갖는다.
- [0284] 부가적 구현예에서, 본 발명에 의해 제공되는 효소 먹이 첨가제에는 또한 자일라나아제, α -아밀라아제, 글루코아밀라아제, 펙티나아제, 만난나아제, α -갈락토시다아제, 파이타아제, 및/또는 리파아제 중 적어도 하나를 포함하나 이에 제한되지 않는 기타 효소가 포함된다. 일부 구현예에서, 원하는 활성을 갖는 효소는 자일라나아제 및 프로테아제와 곡물-기재 담체 상에 이들을 함침시키기 전에 혼합하거나 대안적으로는 이러한 담체를 이러한 곡물-기재 담체 상에 동시에 또는 순차적으로 함침시킨다. 그 다음 담체를 차례로 곡물-기재 먹이와 혼합하여 최종 먹이를 제조한다. 대안적인 구현예에서, 효소 먹이 첨가제를 개별적인 효소 활성의 용액으로 제형화한 다음, 펠렛 또는 곤죽으로 미리 형성된 먹이 재료와 혼합한다.
- [0285] 또다른 추가의 구현예에서, 효소 먹이 첨가제를 두번째 (즉, 상이한) 먹이 또는 동물 식수에 혼입하여 동물의 식이에 포함시킨다. 따라서, 본 발명에 의해 제공된 효소 믹스가 곡물-기재 먹이 그 자체에 혼입되는 것이 필수적인 것은 아니지만, 이러한 혼입은 본 발명의 특히 바람직한 구현예를 형성한다. 먹이 첨가제 1 g 당 자일라나아제 활성 단위 대 먹이 첨가제 1 g 당 프로테아제 활성 단위의 비는 바람직하게는 1:0.001-1,000, 더욱 바람직하게는 1:0.01-100, 가장 바람직하게는 1:0.1-10 이다. 상기 지시된 바와 같이, 본 발명에 의해 제공된 효소 믹스는 바람직하게는 곡물-기재 먹이의 제조에 먹이 첨가제로서 사용된다.
- [0286] 일부 구현예에서, 곡물-기재 먹이는 25중량% 이상, 또는 더욱 바람직하게는 35 중량% 이상의, 밀 또는 옥수수 또는 이들 곡물 모두의 조합을 포함한다. 먹이는 프로테아제 (즉, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제) 를, 먹이가 1 kg 당 100-100,000 프로테아제 활성 단위를 포함하는 양으로 포함하는 양으로 추가로 포함한다.
- [0287] 본 발명에 따라 본 발명에서 제공되는 곡물-기재 먹이는 가금류 (예를 들어, 칠면조, 거위, 오리, 닭, 등), 가축 (예를 들어, 돼지, 양, 소, 염소, 등), 및 반려 동물 (예를 들어, 말, 개, 고양이, 토끼, 쥐, 등) 을 포함하는 다양한 비-인간 동물을 위한 먹이로 사용된다. 먹이는 특히 가금류 및 돼지, 특히 브로일러 (broiler) 닭에 적합하다.
- [0288] 또한 본 발명은 본 발명의 프로테아제 중 하나 이상을 포함하는 식물 처리 용 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제는 실크 또는 울 처리에 적합한 조성물의 성분이다 (예를 들어, 미국 RE 특허 번호 216,034 호, EP 134,267 호, 미국 특허 번호 4,533,359 호, 및 EP 344,259 호 참조).
- [0289] 또한, 본 발명의 프로테아제는 파이테이트로부터 인을 분리하는 것이 바람직한 다양한 적용에 사용된다. 따라서, 또한 본 발명은 개선된 특성을 갖는 울 또는 동물 모발 물질을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 바람직한 구현예에서, 이들 방법은 플라즈마 처리 공정 및 델헤이 (Delhey) 공정으로 이루어진 군으로부터 선택된 공정에서 울, 울 섬유 또는 동물 모발 물질을 예비처리하는 단계; 및 예비처리된 울 또는 동물 모발 물질을 특성 개선에 효과적인 양으로 단백질분해 효소 (예를 들어, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제) 로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질분해 효소 처리는 플라즈마 처리 전에 일어나는 반면, 다른 구현예에서는, 플라즈마 처리 후에 일어난다. 일부 추가의 구현예에서는, 별도의 단계로 수행되는 반면, 다른 구현

예에서는, 울 또는 동물 모발 물질의 세척 (scouring) 또는 염색과 함께 수행된다. 부가적인 구현예에서, 하나 이상의 계면활성제 및/또는 하나 이상의 유연제가 효소 처리 단계 동안 존재하고, 다른 구현예에서, 계면활성제(들) 및/또는 유연제(들)은 울 또는 동물 모발 물질을 연화 처리에 적용하는 별도의 단계에 혼입된다.

- [0290] *일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 울 섬유의 방축 가공법 (예를 들어, JP 4-327274 호 참조)에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 섬유에 저온 플라즈마 처리를 한 후, 블록-우레탄 수지, 폴리아미드 에폭실로로 히드린 수지, 글리옥살산 수지, 에틸렌-우레아 수지 또는 아크릴레이트 수지와 같은 방축 가공 수지로 처리한 다음, 연화 효과를 획득하기 위한 중량 감소 단백질분해 효소로의 처리에 의한 울의 방축 가공법에 사용된다. 일부 구현예에서, 플라즈마 처리 단계는 저온 처리는, 바람직하게는 코로나 방전 처리 또는 글로우 방전 처리이다.
- [0291] 일부 구현예에서, 저온 플라즈마 처리는 기체, 바람직하게는 공기, 산소, 질소, 암모니아, 헬륨 또는 아르곤으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기체를 사용하여 수행된다. 통상적으로는, 공기가 사용되나, 다른 언급된 기체 중 임의의 것을 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0292] 바람직하게는, 저온 플라즈마 처리는 약 2 초 내지 약 300 초, 바람직하게는 약 5 초 내지 약 100 초, 더욱 바람직하게는 약 5 초 내지 약 30 초 동안 약 0.1 torr 내지 5 torr 사이의 압력에서 수행된다.
- [0293] 상기 지시된 바와 같이, 본 발명은 델헤이 (Delhey) 공정 (예를 들어, DE-A-43 32 692 호 참조)과 같은 방법과 함께 사용된다. 상기 공정에서, 울을 가용성 볼프람의 존재하에 과산화수소 수용액으로 처리하고, 임의로 울의 항-펠팅 (felting) 특성 개선을 위해 합성 중합체의 용액 또는 분산액에서 처리한다. 상기 방법에서, 울을 2-60% (w/w), 바람직하게는 8-20% (w/w)의 촉매 (바람직하게는 Na_2WO_4)의 존재, 및 비이온성 습윤제의 존재하에서, 과산화수소 수용액 (0.1-35% (w/w), 바람직하게는 2-10% (w/w))에서 처리한다. 바람직하게는, 처리는 pH 8-11, 및 실온에서 수행된다. 처리 시간은 과산화수소 및 촉매의 농도에 따라 상이하나, 바람직하게는 2 분 이하이다. 산화 처리 후, 울을 물로 행군다. 잔류 과산화수소의 제거를 위해, 그리고 부가적인 표백을 위해, 울을 환원제의 산성 용액 (예를 들어, 술폰이트, 포스파이트 등)으로 추가로 처리한다.
- [0294] 일부 구현예에서, 효소 처리 단계는 약 1 분 내지 약 120 분 동안 수행된다. 상기 단계는 바람직하게는 약 20°C 내지 약 60°C, 더욱 바람직하게는 약 30°C 내지 약 50°C 사이의 온도에서 수행된다. 대안적으로는, 울을 효소 수용액에 담그거나 또는 효소 수용액으로 채워넣은 다음, 통상의 온도 및 압력에서, 전형적으로 약 30 초 내지 약 3 분 동안 증기 처리한다. 일부 바람직한 구현예에서, 단백질분해 효소 처리는 완충액을 포함할 수 있는 산성 또는 중성 또는 알칼리 매질에서 수행된다.
- [0295] 대안적인 구현예에서, 효소 처리 단계는 하나 이상의 통상적인 음이온성, 비이온성 (예를 들어, Dobanol; Henkel AG) 또는 양이온성 계면활성제의 존재하에서 수행된다. 유용한 비이온성 계면활성제의 예는 Dobanol (Henkel AG)이다. 추가 구현예에서, 단백질분해 효소로의 처리 전 또는 이와 동시에, 울 또는 동물 모발 물질을 초음파 처리에 적용한다. 일부 바람직한 구현예에서, 초음파 처리는 약 50°C의 온도에서 약 5 분 동안 수행된다. 일부 바람직한 구현예에서, 효소 처리 단계에서 사용되는 가수분해 효소의 양은 울 또는 동물 모발 물질의 중량에 대해 약 0.2 w/w % 내지 약 10 w/w %이다. 일부 구현예에서, 처리 단계 횟수를 위하여, 효소 처리는 울 또는 동물 모발 물질의 염색 및/또는 세척 동안, 간단히 프로테아제를 염색, 헹굼 및/또는 세척 배스에 첨가하여 수행된다. 일부 구현예에서, 효소 처리는 플라즈마 처리 후에 수행되나, 다른 구현예에서, 두 가지 처리 단계는 반대 순서로 수행된다.
- [0296] 통상적으로 울에 사용되는 유연제는 종종 유기 양이온성 유연제 또는 실리콘 기재 제품인 양이온성 유연제이나, 음이온성 또는 비이온성 유연제도 또한 유용하다. 유용한 유연제의 예에는 폴리에틸렌 유연제 및 실리콘 유연제 (즉, 디메틸 폴리실록산 (실리콘 오일)), H-폴리실록산, 실리콘 엘라스토머, 아미노작용기 디메틸 폴리실록산, 아미노작용기 실리콘 엘라스토머, 및 에폭시작용기 디메틸 폴리실록산, 및 유기 양이온성 유연제 (예를 들어, 알킬 4 차 암모늄 유도체)가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0297] 부가적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 프로테아제가 포함된 동물 가죽의 처리용 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 프로테아제는 WO 03/00865 (Insect Biotech Co., Taejeon-Si, Korea)에 기재된 것들과 같은 동물 가죽의 처리용 조성물에 사용된다. 부가적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 프로테아제로 가죽 또는 피부의 효소적 처리를 포함하는 가죽 및/또는 피부의 가죽제품 (leather)으로의 가공 방법을 제공한다 (예를 들어, WO 96/11285 호 참조). 부가적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상

의 프로테아제를 포함하는, 동물 피부 또는 가죽을 가죽제품으로 처리하기 위한 조성물을 제공한다.

[0298] 가죽 및 피부에는 염처리된 (salted) 또는 건조된 미가공 가죽 또는 피부의 형태로 무두질을 처리한다. 가죽 및 피부의 가죽제품으로의 가공은 담금, 털 제거 및 베이팅 (bating) 단계를 포함하는 여러 상이한 공정 단계를 포함한다. 상기 단계는 습윤 공정을 구성하고, 빔하우스 (beamhouse) 에서 수행된다. 본 발명의 프로테아제를 이용하는 효소적 처리는 가죽제품의 가공에 포함된 공정 동안의 임의의 시간에 적용할 수 있다.

그러나, 프로테아제는 습윤 가공 (즉, 담금, 털 제거 및/또는 베이팅 동안) 동안 통상 사용된다. 그러므로, 일부 바람직한 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제로의 효소적 처리는 습윤 공정 단계 동안 일어난다.

[0299] 일부 구현예에서, 본 발명의 담금 공정은 통상의 담금 조건하에서 (예를 들어, pH 6.0-11 의 범위의 pH 에서) 수행된다. 일부 바람직한 구현예에서, 범위는 pH 7.0-10.0 이다. 대안적인 구현예에서, 온도는 20-30℃ 의 범위인 반면, 다른 구현예에서는 바람직하게는 24-28℃ 의 범위이다. 또다른 추가의 구현예에서, 반응 시간은 2-24 시간 범위이고, 바람직한 범위는 4-16 시간이다. 부가적인 구현예에서, 텐사이드 (tensides) 및/또는 방부제가 필요하면 제공된다.

[0300] 베이팅 단계의 두번째 상은 베이트 (bate) 그 자체의 첨가로 시작된다. 일부 구현예에서, 효소적 처리는 베이팅 동안 일어난다. 일부 바람직한 구현예에서, 효소적 처리는 탈회 (deliming) 상 후, 베이팅 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 본 발명의 베이팅 공정은 통상의 조건 (예를 들어, pH 6.0-9.0 범위의 pH 에서) 을 사용하여 수행된다. 일부 바람직한 구현예에서, pH 범위는 6.0 내지 8.5 이다. 추가 구현예에서, 온도는 20-30℃ 의 범위이고, 바람직한 구현예에서, 온도는 25-28℃ 의 범위이다. 일부 구현예에서, 반응 온도는 20-90 분의 범위이고, 다른 구현예에서는, 40-80 분의 범위이다. 가죽 제품의 제조 공정은 당업자에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, 모두 본원에 참조로서 인용된 WO 94/069429 호, WO 90/1121189 호, 미국 특허 번호 3,840,433 호, EP 505920 호, GB 2233665 호, 및 미국 특허 번호 3,986,926 호 참조).

[0301] 추가의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 베이트를 제공한다. 베이트는 빔하우스 공정, 특히 가죽 제품의 제조 공정의 베이팅 단계에 사용하기 위한 화학적 활성 성분을 포함하는 작용제 또는 효소-함유 제제이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 프로테아제 및 적합한 부형제를 포함하는 베이트를 제공한다. 일부 구현예에서, 작용제는 당업계에 공지되고 사용되는 화학약품, 예를 들어, 희석제, 연화제, 탈회제 및 담체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 프로테아제를 포함하는 베이트는 당업계에 공지된 바와 같이 제형화된다 (예를 들어, GB-A2250289 호, WO 96/11285 호, 및 EP 0784703 호 참조).

[0302] 일부 구현예에서, 본 발명의 베이트는 베이트 1 g 당 0.00005 내지 0.01 g 의 활성 프로테아제를 함유하고, 다른 구현예에서, 베이트는 베이트 1 g 당 0.0002 내지 0.004 g 의 활성 프로테아제를 함유한다.

[0303] 그러므로, 본 발명의 프로테아제는 수많은 적용 및 설정에 사용된다.

[0304] [실시예]

[0305] 본 발명은 어떤식으로든 청구되는 본 발명의 범주를 제한하지 않도록 의도되는 이하 실시예에서 더욱 상세히 기재되고 있다. 첨부된 도면은 본 발명의 명세서 및 기재의 완전한 일부로서 고려되는 것으로 의미된다. 언급된 모든 참조는 본원에서 그곳에 기재된 모두에 대한 참조로서 구체적으로 인용된다. 하기 실시예는 청구된 본 발명을 설명하기 위해 제공되나 이를 제한하려는 것은 아니다.

[0306] 하기 실험 설명에 있어서, 하기 약어가 적용된다: PI (프로테이나아제 억제제), ppm (백만 당 부); M (몰농도); mM (밀리몰농도); μ M (마이크로몰농도); nM (나노몰농도); mol (몰); mmol (밀리몰); μ mol (마이크로몰); nmol (나노몰); gm (그램); mg (밀리그램); μ g (마이크로그램); pg (피코그램); L (리터); ml 및 mL (밀리리터); μ l 및 μ L (마이크로리터); cm (센티미터); mm (밀리미터); μ m (마이크로미터); nm (나노미터); U (단위); V (볼트); MW (분자량); sec (초); min(s) (분(s)); h(s) 및 hr(s) (시간(s)); °C (섭씨온도); QS (충분한 품질); ND (수행하지 않음); NA (이용불가능); rpm (분 당 회전수); H₂O (물); dH₂O (탈이온수); HCl (염산); aa (아미노산); bp (염기쌍); kb (킬로염기쌍); kD (킬로달톤); cDNA (카피 또는 상보성 DNA); DNA (데옥시리보핵산); ssDNA (단일 가닥 DNA); dsDNA (이중 가닥 DNA); dNTP (데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트); RNA (리보핵산); MgCl₂ (염화마그네슘); NaCl (염화나트륨); w/v (중량 대 부피); v/v (부피 대 부피); g (중력); OD (광학 밀도); 둘베코 인산염 완충 용액 (DPBS); SOC (2% Bacto-Tryptone, 0.5%

Bacto Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl); Terrific Broth (TB; 12 g/l Bacto Tryptone, 24 g/l 글리세롤, 2.31 g/l KH_2PO_4 , 및 12.54 g/l K_2HPO_4); OD_{280} (280 nm 에서의 광학 밀도); OD_{600} (600 nm 에서의 광학 밀도); A_{405} (405 nm 에서의 흡광도); $V_{\text{최대}}$ (효소 촉매 반응의 최대 초기 속도); PAGE (폴리아크릴아미드 젤 전기영동); PBS (인산염 완충 식염수 [150 mM NaCl, 10 mM 나트륨 인산염 완충액, pH 7.2]); PBST (PBS+0.25% TWEEN® 20); PEG (폴리에틸렌 글리콜); PCR (폴리머라아제 연쇄 반응); RT-PCR (역전사 PCR); SDS (나트륨 도데실 황산염); Tris (트리스(히드록시메틸)아미노메탄); HEPES (N-[2-히드록시에틸]피페라진-N-[2-에탄술포산]); HBS (HEPES 완충 식염수); Tris-HCl (트리스[히드록시메틸]아미노메탄-히드로클로라이드); Tricine (N-[트리스-(히드록시메틸)-메틸]-글리신); CHES (2-(N-시클로-헥실아미노)에탄-술포산); TAPS (3-[[트리스-(히드록시메틸)-메틸]-아미노]-프로판술포산); CAPS (3-(시클로-헥실아미노)-프로판-술포산; DMSO (디메틸 황폭시드); DTT (1,4-디티오-DL-트레이톨); SA (시나핀산 (s,5-디메톡시-4-히드록시 신남산); TCA (트리클로로아세트산); Glut 및 GSH (환원 글루타티온); GSSG (산화 글루타티온); TCEP (트리스[2-카르복시에틸]포스핀); Ci (큐리); mCi (밀리큐리); μCi (마이크로큐리); HPLC (고압 액체 크로마토그래피); RP-HPLC (역상 고압 액체 크로마토그래피); TLC (박층 크로마토그래피); MALDI-TOF (매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화법-비행시간형); Ts (토실); Bn (벤질); Ph (페닐); Ms (메실); Et (에틸); Me (메틸); Taq (테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus*) DNA 폴리머라아제); Klenow (DNA 폴리머라아제 I 대형 (Klenow) 조각); EGTA (에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르) N,N,N',N'-테트라아세트산); EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산); bla (β -락타마아제 또는 암피실린-내성 유전자); HDL (고밀도 액체); MJ Research (MJ Research, Reno, NV); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, the Netherlands); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San Jose, CA); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, NJ); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Germany); Pall (Pall Corp., East Hills, NY); EMPA Testmaterialien AG (EMPA Testmaterialien AG, St. Gallen-Winkeln, Switzerland); Warwick Equest (Warwick Equest Limited, Durham, UK); Minolta (Konica Minolta, Inc., Japan); United States Testing (United States Testing Co, Inc, Hoboken, NJ); Spectrum (Spectrum Laboratories, Dominguez Rancho, CA); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, TX); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, CA); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canada); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, NJ); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, the Netherlands); Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Ireland); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finland); Kelco (CP Kelco, Wilmington, DE); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Norway); Dynal (Dynal, Oslo, Norway); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA); BD Biosciences 및/또는 Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, NC); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, OR); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); Mediatech (Mediatech, Herndon, VA); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ); GIBCO BRL 또는 Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Millipore (Millipore, Billerica, MA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japan); Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA); Sorvall (Sorvall brand, from Kendro Laboratory Products, Asheville, NC); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA); R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY); Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Germany); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT); (Biacore

(Biacore, Inc., Piscataway, NJ); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ); SynPep (SynPep, Dublin, CA); New Objective (New Objective brand; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ); Waters (Waters, Inc., Milford, MA); Matrix Science (Matrix Science, Boston, MA); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, CA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Germany); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, Spain); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, the Netherlands); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI); 및 Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA).

[0307] 하기 실시예에 사용되는 야생형 세린 프로테아제는 둘다 본원에 전체가 참조로서 인용된 US04/39006 호 및 US04/39066 호에 상세히 기재되어 있다. 또한, 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호의 실시예 2 는 그 램-양성 진알칼리성 박테리아 69B4 로부터 69B4 프로테아제의 생성을 위한 설명이 제시되어 있다. 본 출원 전반적으로 지시된 바와 같이, 우선권 출원은 본원에 전체가 참조로서 인용된다.

[0308] **실시예 1**

[0309] **검정법**

[0310] 하기 실시예에서, 다양한 검정법, 예컨대 단백질 측정, 적응-기재 시험, 및 안정성-기재 시험이 사용되었다. 관독의 용이성을 위해, 하기 검정법은 이하 열거되며, 각 실시예를 참조로 한다. 본 발명의 전개 동안 수행된 실험 중 임의의 것에서 하기 제시된 프로토콜로부터의 임의의 변경은 실시예에 제시되어 있다.

[0311] 하기 실시예에서 사용된 세제 중 일부는 하기 조성을 갖는다. 조성물 I 및 II 에서, 잔량 (balance) (100% 로 맞춤) 은 향수/염료 및/또는 물이다. 상기 조성물의 pH 는 조성물 I 에 대해서는 약 5 내지 약 7 이었고, 조성물 II 에 대해서는 약 7.5 내지 약 8.5 이었다. 조성물 III 에서, 잔량 (100% 로 맞춤) 은 물 및/또는 미량의 향수, 염료, 증백제/SRP1/나트륨 카르복시메틸셀룰로오스/광표백제/MgSO₄/PVPVI/비누 억제제/고분자량 PEG/점토로 구성된다.

세제 조성물		
	조성물 I	조성물 II
LAS	24.0	8.0
C₁₂-C₁₅AE_{1.8}S	-	11.0
C₈-C₁₀ 프로필 디메틸 아민	2.0	2.0
C₁₂-C₁₄ 알킬 디메틸 아민 옥시드	-	-
C₁₂-C₁₅ AS	-	7.0
CFAA	-	4.0
C₁₂-C₁₄ 지방 알코올 에톡실레이트	12.0	1.0
C₁₂-C₁₈ 지방산	3.0	4.0
시트르산 (무수)	6.0	3.0
DETPMP	-	1.0
모노에탄올아민	5.0	5.0
나트륨 히드록시드	-	1.0
1 N HCl 수용액	#1	-
프로판디올	12.7	10.
에탄올	1.8	5.4
DTPA	0.5	0.4
펙틴 리아제	-	0.005
리파아제	0.1	-
아밀라아제	0.001	-
셀룰라아제	-	0.0002
프로테아제 A	-	-
알도오스 옥시다아제	-	-
DETBCHD	-	0.01
SRP1	0.5	0.3
붕산	2.4	2.8
나트륨 자일렌 술포네이트	-	-
DC 3225C	1.0	1.0
2-부틸 -옥탄올 증백제 1	0.03 0.12	0.03 0.08

[0312]

세제 조성물 III	
C ₁₄ -C ₁₅ AS 또는 나트륨 우지 알킬 술페이트	3.0
LAS	8.0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	1.0
C ₁₂ -C ₁₅ E ₃ 또는 E ₃	5.0
QAS	-
제올라이트 A	11.0
SKS-6 (건조첨가)	9.0
MA/AA	2.0
AA	-
3Na 시트레이트 2H ₂ O	-
시트르산 (무수)	1.5
DTPA	-
EDDS	0.5
HEDP	0.2
PBI	-
퍼카르보네이트	3.8
NOBS	-
NACA OBS	2.0
TAED	2.0
BB1	0.34
BB2	-
무수 Na 카르보네이트	8.0
술페이트	2.0
실리케이트	-
프로테아제 B	-
프로테아제 C	-
리파아제	-
아밀라아제	-
셀룰라아제	-
펙틴 리아제	0.001
알도오스 옥시다아제	0.05
PAAC	-

[0313]

[0314]

A. 96 웰 마이크로타이터 플레이트에서 단백질 함량 측정을 위한 TCA 검정법

[0315]

상기 검정법을 230 RPM 에서의 진탕 및 습윤화 통기를 하며 33℃ 에서 4 일 동안 성장시킨 마이크로타이터 플레이트로부터의 여과 배양 상청액을 사용하여 시작하였다. 신규 96 웰 평판 플레이트를 상기 검정법을 위해 사용하였다. 먼저, 웰에 0.25 N HCl 100 μL/웰을 넣었다. 그 다음, 50 μL 의 여과 배양 브로쓰를 웰에 첨가하였다. 그 다음 "빈칸" 판독을 제공하기 위해, 405 nm 에서의 광산란/흡광도 (플레이트 판독기에서 5 초 혼합 방식을 사용함) 를 측정하였다.

[0316]

시험을 위해, 100 μL/웰 15% (w/v) TCA 를 플레이트에 넣고 실온에서 5 내지 30 분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 405 nm 에서의 광산란/흡광도 (플레이트 판독기에서 5 초 혼합 방식을 사용함) 를 측정하였다.

[0317]

TCA 로의 시험 판독으로부터 빈칸 (즉, TCA 없음) 을 빼서 계산하였다. 원한다면, 공지된 변환 인자로 클론의 AAPF 검정법에서의 TCA 판독을 검정하여 표준 곡선을 작성할 수 있다. 그러나, TCA 결과는 50 내지 500 ppm 의 단백질 농도에 대해 선형이므로, 양호한 성능의 변이체를 선택하려는 목적에 대해 효소 성능에 대하여 직접적으로 작성될 수 있다.

[0318]

B; 96 웰 마이크로타이터 플레이트에서의 프로테아제의 suc-AAPF-pNA 검정법

[0319]

상기 검정법 시스템에서, 사용된 시약 용액은 하기와 같았다:

[0320]

1. 100 mM Tris/HCl, pH 8.6, 0.005% TWEEN®-80 (Tris 완충액) 함유

[0321]

2. 100 mM Tris 완충액, pH 8.6, 10 mM CaCl₂ 및 0.005% TWEEN®-80 (Tris 완충액) 함유

[0322]

3. DMSO 중 160 mM suc-AAPF-pNA (suc-AAPF-pNA 저장 용액) (Sigma: S-7388)

[0323]

suc-AAPF-pNA 작동 용액을 제조하기 위해, 1 ml 의 AAPF 저장액을 100 ml 의 Tris 완충액에 첨가하고, 10 초 이상 잘 혼합하였다.

[0324] 10 μ l 의 희석 프로테아제 용액을 각 웰에 첨가한 후, 190 μ l 의 1 mg/ml AAPF-작동 용액을 첨가 (빠르게) 하여 검정법을 수행하였다. 상기 용액을 5 초 동안 혼합하였고, 흡광도 변화를 25℃, MTP 판독기에서 410 nm 에서 판독하였다. 프로테아제 활성을 AU (활성 = $\Delta OD \cdot \text{분}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) 로 나타내었다.

[0325] **C. 케라틴 가수분해 검정법**

[0326] 상기 검정법 시스템에서, 사용된 화학약품 및 시약은 하기와 같았다:

[0327] 케라틴 ICN 902111

[0328] 세제 1.6 g 의 세제를 1000 ml 물에 용해하였다 (pH = 8.2)

[0329] 10,000 gpg 의, 0.6 ml 의 $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ 및 1190 mg 의

[0330] HEPES 를 또한 첨가하여, 6 gpg 및 5 mM 의

[0331] 경도 및 완충액 강도를 각각 산출하였다.

[0332] NaOH 로 pH 를 8.2 로 조정하였다.

[0333] 피크릴술포산 (TNBS)

[0334] Sigma P-2297 (5% 수용액)

[0335] 시약 A 45.4 g 의 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6308) 및

[0336] 15 ml 의 4N NaOH 를 함께 용해하여, 1000 ml 의

[0337] 최종 부피 (필요하다면 가열에 의함) 를 산출하였다.

[0338] 시약 B 35.2 g 의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346) 및 0.6 g 의 Na_2SO_3

[0339] (Merck 6657) 를 함께 용해하여, 1000 ml 의 최종 부피를

[0340] 산출하였다.

[0341] **방법:**

[0342] 인큐베이션 전에, 케라틴을 동시에 소량씩 100 μ m 체에 걸렀다. 그 다음, 10 g 의 100 μ m 미만의 케라틴을 pH 를 8.2 로 표준 조정하며, 실온에서 20 분 이상 동안 세제 용액에서 교반하였다. 마지막으로, 상기 현탁액을 실온에서 20 분 동안 원심분리하였다 (Sorvall, GSA rotor, 13,000 rpm). 그 다음 상기 절차를 반복하였다. 마지막으로 습윤 침전물을 총 부피 200 ml 로 세제에 현탁시키고, 현탁액을 파이펫 작업 동안 교반되도록 유지하였다. 인큐베이션 전에, 마이크로타이터 플레이트 (MTP) 를 Biohit 멀티채널 파이펫 및 1200 μ l 팁 (200 μ l 짜리 6 개 일회용 및 팁에 케라틴이 가라앉는 것을 방지하기 위해 가능한 한 빨리 처분함) 으로 웰 당 200 μ l 의 기질로 채웠다. 그 다음, 10 μ l 의 여과 배양액을 MTP 를 함유하는 기질에 첨가하였다. 테이프를 플레이트를 덮고, 인큐베이터에 넣고, 350 rpm (Innova 4330 [New Brunswick]) 에서 3 시간 동안 20℃ 에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 플레이트를 3000 rpm (iSigma 6K 15 원심분리기) 에서 3 분 동안 원심분리하였다. 약 15 분 후 인큐베이터에서 첫번째 플레이트를 제거하고, 50 ml 의 시약 A 당 1 ml 의 TNBS 용액을 첨가하여 TNBS 시약을 제조하였다.

[0343] MTP 를 웰 당 60 μ l 의 TNBS 시약 A 로 채웠다. 인큐베이션된 플레이트로부터, 10 μ l 을 TNBS 시약 A 이 있는 MTP 로 옮겼다. 테이프를 플레이트를 덮고, 실온에서 500 rpm 으로 벤치 셰이커 (BMG ThermoStar) 에서 20 분 동안 진탕하였다. 마지막으로, 200 μ l 의 시약 B 를 웰에 첨가하고, 셰이커에서 1 분 동안 혼합하고, 405 nm 에서의 흡광도를 MTP-판독기로 측정하였다.

[0344] **케라틴 가수분해 활성의 계산:**

[0345] 수득된 흡광도 값을 빈칸 값 (효소 없이 기질만) 에 대해 정정하였다. 수득 흡광도는 가수분해 활성에 대한 측정을 제공한다. 각 샘플 (변이체) 로부터, 성능 지수를 계산하였다. 성능 지수를 동일한 단백질 농도에서 변이체의 성능 (실제 값) 과 표준 효소 (이론 값) 와 비교한다. 또한, 표준 효소의 Langmuir 방정식의 파라미터를 사용하여 이론 값을 계산할 수 있다. 1 보다 큰 성능 지수 (PI) ($PI > 1$) 는 (표준 [예를 들어, 야생형] 보다) 더욱 양호한 변이체를 확인시켜주며, 1 의 PI ($PI = 1$) 는 표준과 동일한 성능을 하는 변이체를 확

인시켜주며, 1 미만의 PI ($PI < 1$) 는 표준보다 열악한 성능의 변이체를 확인시켜준다.

[0346] 그러므로, PI 는 특정 환경 하에서 사용하기에 덜 바람직한 변이체 뿐 아니라 승자 변이체를 확인시켜준다.

[0347] **D. 프로테아제 성능 시험을 위한 마이크로천조각 (Microswatch) 검정법**

[0348] 상기 검정법에 사용되는 모든 세제는 효소를 함유하지 않았다.

[0349] **세제 제조:**

[0350] **1. 냉수 액체 세제 (US 조건):**

[0351] Milli-Q 물을 6 gpg 물 경도 ($Ca/Mg=3/1$) 로 조정하고, 1.60 g/l 의 세제를 첨가하였고, 세제 용액을 15 분 이상 동안 강하게 교반하였다.

[0352] 그 다음, 5 mM 의 HEPES 완충액을 첨가하고 pH 를 8.2 로 조정하였다. 세제를 검정법에 사용하기 전 0.22 μ m 필터 (예를 들어, Nalgene 탑 바틀 (top bottle) 필터) 를 통해 여과하였다.

[0353] **2. 저 pH 액체 세제 (US 조건):**

[0354] Milli-Q 물을 6 gpg 물 경도 ($Ca/Mg=3/1$) 로 조정하고, 1.60 g/l 의 세제 TIDE®-LVJ-I 또는 TIDE® 2005) 또는 1.50 g/l 의 세제 (TIDE®-SNOW) 를 첨가하였고, 세제 용액을 15 분 이상 동안 강하게 교반하였다. 1N NaOH 용액을 사용하여 pH 를 6.0 으로 조정하였다. 세제를 검정법에 사용하기 전 0.22 μ m 필터 (예를 들어, Nalgene 탑 바틀 필터) 를 통해 여과하였다.

[0355] **마이크로천조각:**

[0356] CFT Vlaardingen 에서 ¼" 원 직경의 마이크로천조각을 주문하였다. 하기 기재되는 고정법을 사용하여 마이크로천조각을 예비처리하였다. 단일 마이크로천조각을 전체 표면적이 노출되도록 수직으로 (즉, 웰의 바닥에 평평하지 않게) 96 웰 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 놓았다.

[0357] **"3K" 천조각 고정:**

[0358] 실온에서 상기 특정 천조각 고정을 수행하였다. 그러나, 첨가된 30% H_2O_2 의 양은 과고정화 천조각 고정법 (즉, 유럽 조건으로 사용되는 60°C 에서 수행됨) 에서의 10 배이다. 기포 형성 (거품화: frothing) 이 보일 것이므로, 이를 고려하여 좀더 큰 비이커를 사용하는 것이 필요하다. 먼저, 8 리터의 증류수를 10 L 비이커에 넣고, 80 ml 의 30% 과산화수소를 첨가하였다. 물과 퍼옥사이드를 국자로 잘 혼합하였다. 그 다음, 균일하게 고정시키기 위해 용액에 첨가하기 전에 40 개 조각의 EMPA 116 천조각을 팬에 펼쳐놓았다. 용액 중에서 천조각을 30 분 동안, 처음 5 분 동안은 지속적으로, 그리고 25 분 동안은 가끔 놔두면서 휘휘 저었다 (국자를 사용함). 상기 용액을 버리고 천조각을 매회 대략 6 리터의 증류수로 6 회 행구었다. 천조각을 종이 타올 위에 올려두고 건조시켰다. 압출 프레스 상의 ¼" 원형 다이를 사용하여 공기에 건조된 천조각에 구멍을 냈다. 단일 마이크로천조각을 전체 표면적이 노출되도록 수직으로 (즉, 웰의 바닥에 평평하지 않게) 96 웰 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 놓았다.

[0359] **효소 샘플:**

[0360] 각 지형에 적합한 농도에서 효소 샘플을 시험하고, 10 mM NaCl, 0.005% TWEEN®-80 용액에 희석하였다.

[0361] **시험법:**

[0362] 인큐베이터를 원하는 온도로 설정하였다: 냉수 액체 조건에서는 20°C 또는 저-pH 액체 조건에서는 30°C. 예비처리되고 미리 절단된 천조각을 상기 기재된 바와 같이 96 웰 MTP 의 웰에 두었다. 필요하다면 효소 샘플을 10 mM NaCl, 0.005% TWEEN®-80 에 20x 원하는 농도로 희석하였다. 원하는 세제 용액을 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 그 다음, 190 μ l 의 세제 용액을 MTP 의 각 웰에 첨가하였다. 상기 혼합물에, 10 μ l 의 효소 용액을 각 웰에 첨가하였다 (총 부피를 200 μ l/웰로 제공함). MTP 를 플레이트 봉인지로 봉인하고, 350 rpm 에서 진탕하면서 인큐베이터에 60 분 동안 두었다. 적합한 조건하에서의 인큐베이션 후, 각 웰로부터 100 μ l 의 용액을 제거하고 신규 MTP 에 두었다. 100 μ l 의 용액/웰을 함유하는 새로운 MTP 를 MTP 판독기로 405 nm 에서 판독하였다. 빈칸 대조군 뿐 아니라, 마이크로천조각 및 세제를 함유하나 효소는 함유하지 않는 대조군을 또한 포함시켰다. 15,000 gpg (Ca/Mg 3:1 ($1.92 \text{ M Ca}^{2+} = 282.3 \text{ g/L CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

0.64 M Mg^{2+} = 30.1 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 의 농도로 저장 용액을 사용하였다.

표 1-1 μ 천조각 검정법에서의 세제 조성물과 인큐베이션 조건.

세제	참조 효소	세제	물 경도	효소 용량 [ppm]	온도 (°C.)	천조각
냉수 액체	ASP	1.5또는1.6 g/l 세제	6 gpg - Ca/Mg :3/1	0.3 - 4	20°	3K
저 pH 액체 세제	ASP	1.6 g/l 세제	6 gpg - Ca/Mg:3/1	0.5 - 4	30°	3K

BMI 성능의 계산:

수득된 흡광도 값을 빈칸 값 (효소의 부재하에 마이크로천조각의 인큐베이션 후 수득됨) 에 대해 정정하였다. 수득 흡광도는 가수분해 활성에 대한 측정이었다. 각 샘플로부터 (변이체), 성능 지수를 계산하였다. 성능 지수를 동일한 단백질 농도에서 변이체의 성능 (실제 값) 과 표준 효소 (이론 값) 와 비교한다. 또한, 표준 효소의 Langmuir 방정식의 파라미터를 사용하여 이론 값을 계산할 수 있다. 1 보다 큰 성능 지수 (PI) (PI>1) 는 (표준 [예를 들어, 야생형] 보다) 더욱 양호한 변이체를 확인시켜주며, 1 의 PI (PI=1) 는 표준과 동일한 성능을 하는 변이체를 확인시켜주며, 1 미만의 PI (PI<1) 는 표준보다 열악한 성능의 변이체를 확인시켜준다.

그러므로, PI 는 특정 환경 하에서 사용하기에 덜 바람직한 변이체 뿐 아니라 승자 변이체를 확인시켜준다.

D. 디메틸카세인 가수분해 검정법 (96 웰)

상기 검정법 시스템에서, 사용된 화학약품 및 시약은 하기와 같았다:

디메틸카세인 (DMC):

Sigma C-9801

TWEEN®-80: Sigma P-8074

PIPES 완충액 (산 없음):

Sigma P-1851; 15.1 g 을 약 960 ml 의 물에 용해하고;

4N NaOH 로 pH 를 7.0 로 조정하고, 1 ml 의

5% TWEEN®-80 을 첨가하고, 부피를 1000 ml 로 맞췄다.

PIPES 및 TWEEN®-80 의 최종 농도는

각각 50 mM 및 0.005% 이다.

피크릴술포산 (TNBS):

Sigma P-2297 (5% 수용액)

시약 A 45.4 g 의 $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ (Merck 6308) 및

15 ml 의 4N NaOH 를 함께 용해하여, 1000 ml 의

최종 부피 (필요하다면 가열에 의함) 를 산출하였다.

시약 B 35.2 g 의 $NaH_2PO_4 \cdot 1 H_2O$ (Merck 6346) 및

0.6 g 의 Na_2SO_3 (Merck 6657) 를 함께 용해하여,

1000 ml 의 최종 부피를 산출하였다.

방법:

기질을 제조하기 위해, 4 g 의 DMC 를 400 ml 의 PIPES 완충액에 용해하였다. 여과된 배양 상청액을 PIPES

완충액으로 희석하였고; 성장 플레이트 중의 대조군의 최종 농도는 20 ppm 였다. 그 다음, MTP 의 웰 중에 각 희석 상청액 10 μ l 을 200 μ l 의 기질에 첨가하였다. 테이프로 MTP 플레이트를 덮고, 몇 초간 진탕하고, 진탕 없이 2 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 오븐에 두었다.

[0389] 약 15 분 후 오븐으로부터 첫번째 플레이트 제거하고, 50 ml 의 시약 A 당 1 ml 의 TNBS 용액을 혼합하여 TNBS 시약을 제조하였다. MTP 를 웰 당 60 μ l 의 TNBS 시약 A 로 채웠다. 인큐베이션된 플레이트를 몇 초간 진탕하고, 이 후 10 μ l 을 TNBS 시약 A 가 담긴 MTP 로 옮겼다. 테이프로 플레이트를 덮고, 실온에서 500 rpm 으로 벤치 셰이커 (BMG ThermoStar) 에서 20 분 동안 진탕하였다. 마지막으로, 200 μ l 의 시약 B 를 웰에 첨가하고, 셰이커에서 1 분 동안 혼합하고, MTP-판독기를 사용하여 405 nm 에서의 흡광도를 측정하였다.

[0390] **디메틸카세인 가수분해 활성의 계산:**

[0391] 수득된 흡광도 값을 빈칸 값 (효소 없이 기질만) 에 대해 정정하였다. 수득 흡광도는 가수분해 활성에 대한 측정이다. 샘플의 (임의의) 특이적 활성을 흡광도 및 측정된 단백질 농도를 나누어 계산하였다.

[0392] **E. 열안정성 검정법**

[0393] 상기 검정법은 완충 배양 상청액의 가열 진후에, 디메틸카세인 가수분해에 기반한다. 디메틸카세인 가수분해 검정법에 기재된 바와 같은 동일한 화학약품 및 시약 용액을 사용하였다.

[0394] **방법:**

[0395] 여과된 배양 상청액을 PIPES 완충액 중 20 ppm (성장 플레이트 중의 대조군의 농도에 기반함) 으로 희석하였다. 먼저, 디메틸카세인 검정법 중의 초기 활성을 측정하기 위해 각 희석 효소 샘플 10 μ l 을 취하고 하기 기재되는 바와 같이 처리하였다. 그 다음, 각 희석 상청액 50 μ l 을 MTP 의 빈 웰에 넣었다. MTP 플레이트를 iEMS 인큐베이터/셰이커 HT (Thermo Labsystems) 에 90 분 동안 60 $^{\circ}$ C 및 400 rpm 에서 인큐베이션하였다. 상기 플레이트를 5 분 동안 빙상에서 냉각시켰다. 그 다음, 10 μ l 의 용액을 200 μ l 의 디메틸카세인 기질/웰을 함유하는 새로운 MTP 에 첨가하여, 인큐베이션 후 최종 활성을 측정하였다. 테이프로 상기 MTP 를 덮고, 몇 초간 진탕하고, 37 $^{\circ}$ C 오븐에서 진탕 없이 2 시간 동안 두었다. DMC 가수분해 검정법에 사용된 것과 동일한 검출법이 사용되었다.

[0396] **열안정성의 계산:**

[0397] 샘플의 잔류 활성을 최종 흡광도 및 초기 흡광도의 비로서 표현하였다 (모두 빈칸에 대해 정정됨).

[0398] **F. LAS 안정성 검정법**

[0399] 0.06% LAS (도데실벤젠술포네이트 나트륨) 의 존재하에서 시험 프로테아제의 인큐베이션 후 LAS 안정성을 측정하고, AAPF 검정법을 사용하여 잔류 활성을 측정하였다.

[0400] **시약:**

[0401] 도데실벤젠술포네이트, 나트륨 염 (=LAS): Sigma D-2525

[0402] TWEEN[®]-80: Sigma P-8074

[0403] TRIS 완충액 (산 없음): Sigma T-1378; 6.35 g 을 약 960 ml 의 물에 용해하고; 4N HCl 로 pH 를 8.2 로 조정하였다. TRIS 의 최종 농도는 52.5 mM 이다.

[0404] LAS 저장 용액: MQ 물 중 10.5% LAS 용액 (=100 ml MQ 당 10.5 g) 을 제조하였다.

[0405] TRIS 완충액-100 mM / pH 8.6 (100 mM Tris/0.005% Tween80)

[0406] TRIS-Ca 완충액, pH 8.6 (100 mM Tris/10 mM CaCl₂/0.005% Tween80)

[0407] **기자재:**

[0408] Flat bottom MTP: Costar (#9017)

[0409] Biomek FX

[0410] ASYS Multipipettor

[0411] Spectramax MTP Reader

[0412] iEMS Incubator/Shaker

[0413] Innova 4330 Incubator/Shaker

[0414] Biohit multichannel pipette

[0415] BMG ThermoStar Shaker

[0416] **방법:**

[0417] 52.5 mM Tris 완충액 pH 8.2 로 0.063% LAS 용액을 제조하였다. 100 mg/ml AAPF 저장 용액 (DMSO 중) 1 ml 을 100 ml 의 (100 mM) TRIS 완충액, pH 8.6 에 첨가하여 AAPF 작동 용액을 제조하였다. 상청액을 희석하기 위해, 평판 플레이트를 희석 완충액으로 채우고, 상청액의 분취액을 혼합하고 잘 혼합하였다. 희석 비율은 성장 플레이트 중의 ASP-대조군의 농도 (AAPF 활성) 에 따라 다르게 하였다. 바람직한 단백질 농도는 80 ppm 이었다.

[0418] 희석 상청액 10 μ l 을 190 μ l 의 0.063% LAS 완충액/웰에 첨가하였다. 테이프 MTP 를 덮고, 몇 초 동안 진탕하고, 25 $^{\circ}$ C 또는 35 $^{\circ}$ C 인큐베이터 (Innova 4230) 에서 200 rpm 으로 진탕하며 60 분 동안 두었다. 190 μ l 의 AAPF 작동 용액을 함유하는 신규 MTP 로 각 웰 중의 10 μ l 의 혼합물을 옮겨 인큐베이션 10 분 후에 초기 활성 (t=10 분) 을 측정하였다. 상기 용액을 잘 혼합하고, MTP Reader (5 분 및 25 $^{\circ}$ C 에서 20 회 판독) 를 사용하여 AAPF 활성을 측정하였다.

[0419] 인큐베이션 60 분 후 인큐베이션 플레이트로부터 또다른 10 μ l 의 용액을 제거하여 최종 활성 (t=60 분) 을 측정하였다. 그 다음 AAPF 활성을 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. 계산은 다음과 같이 수행하였다:

[0420] % 잔류 활성은 $[t=60 \text{ 값}] * 100 / [t=10 \text{ 값}]$ 이었다.

[0421] **실시예 2**

[0422] **B. 서브틸리스 (B. subtilis) 에서의 ASP 프로테아제 생성**

[0423] 본 실시예에서는, B. 서브틸리스 (B. subtilis) 에서 69B4 프로테아제 (또한 본원에서 "ASP," "Asp," 및 "ASP 프로테아제," 및 "Asp 프로테아제" 로 언급됨) 를 생성하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다. 본 실시예에서는, B. 서브틸리스 (B. subtilis) 로의 플라스미드 pHPLT-ASP-C1-2 (도 1 참조) 의 형질전환이 기재되어 있다. 형질전환은 당업계에서 공지된 바와 같이 수행하였다 (예를 들어, 본원에 참조로서 인용된 WO 02/14490 참조). B. 서브틸리스 (B. subtilis) 중의 ASP 발현을 최적화하기 위해, 합성 DNA 서열을 DNA2.0 에 의해 생성하고, 상기 발현 실험에 이용하였다. 바실러스 (Bacillus) 종에 대해 적용된 코돈 사용빈도 (usage) 를 가진 하기 제시되는 DNA 서열 (합성 ASP DNA 서열) 은, 야생형 ASP 전구체 단백질을 코딩한다:

ATGACACCACGAAGCTGTCACAAGAGCTCTGGCTGTGGCAACAGCAGCTGCTACACTCTTG
GCTGGGGGTATGGCAGCACAAAGCTAACGAAACCGGCTCCTCCAGGATCTGCATCAGCCCC
TCCACGATTAGCTGAAAACTTGACCTGACTTACTTGAAGCAATGGAACGCGATCTGGG
GTTAGATGCAGAGGAAGCAGCTGCAACGTTAGCTTTTCAGCATGACGCAGCTGAAACGG
GAGAGGCTCTTGCTGAGGAACTCGACGAAGATTTTCGCGGGCACGTGGGTTGAAGATGAT
GTGCTGTATGTTGCAACCACTGATGAAGATGCTGTTGAAGAAGTCGAAGGCGAAGGAGC
AACTGCTGTGACTGTTGAGCATTCTCTTGCTGATTTAGAGGCGTGGAAGACGGTTTTGGA

[0424]

TGCTGCGCTGGAGGGTCATGATGATGTGCCTACGTGGTACGTGCGACGTGCCTACGAATTC
GGTAGTCGTTGCTGTAAAGGCAGGAGCGCAGGATGTAGCTGCAGGACTTGTGGAAGGCG
CTGATGTGCCATCAGATGCGGTCACTTTTGTAGAAACGGACGAAACGCCTAGAACGATG
TTCCACGTAATTGGAGGCAACGCATATACTATTGGCGGCCGGTCTAGATGTTCTAT
CGGATTTCGAGTAAACGGTGGCTTCATTACTGCCGGTCACTGCGGAAGAACAGGAG
CCACTACTGCCAATCCGACTGGCACATTTGCAGGTAGCTCGTTTCCGGGAAATGAT
TATGCATTTCGTCCGAACAGGGGCAGGAGTAAATTTGCTTGCCCAAGTCAATAACTA
CTCGGGCGGCAGAGTCCAAGTAGCAGGACATACGGCCGCACCAGTTGGATCTGCTG
TATGCCGCTCAGGTAGCACTACAGGTTGGCATTGCGAACTATCACGGCGCTGAAT
TCGTCTGTACAGTATCCAGAGGGAACAGTCCGAGGACTTATCCGCACGACGGTTTG
TGCCGAACCAGGTGATAGCGGAGGTAGCCTTTTAGCGGGAAATCAAGCCCAAGGTG
TCACGTCAGGTGGTTCTGGAAATTGTGCGACGGGGGGAACAACATTCTTTCAACCA
GTCAACCCGATTTTGCAGGCTTACGGCCTGAGAATGATTACGACTGACTCTGGAAG
TTCCCCTGCTCCAGCACCTACATCATGTACAGGCTACGCAAGAACGTTACAGGAACCC
TCGCAGCAGGAAGAGCAGCAGCTCAACCGAACGGTAGCTATGTTCAAGGTCAACCGGAGC
GGTACACATTCCGCTCTGTCTCAATGGACCTAGCGGTGCGGACTTTGATTTGTATGTGCAG
CGATGGAATGGCAGTAGCTGGGTAACCGTCGCTCAATCGACATCGCCGGGAAGCAATGA
AACCATTACGTACCGCGGAAATGCTGGATATTATCGCTACGTGGTTAACGCTGCGTCAGG
ATCAGGAGCTTACACAATGGGACTCACCTCCCTCGA (SEQ ID NO:10).

[0425]

[0426]

상기 서열에서, 굵은 글씨체는 성숙 프로테아제를 코딩하는 DNA 를 표시하고, 일반 글씨체는 선도자 서열을 표시하고, 밑줄은 N-말단 및 C-말단 전서열 (prosequence) 을 표시한다.

[0427]

합성 ASP 유전자의 발현

[0428]

Asp 발현 카세트를 pXX-KpnI (도 2 참조) 벡터에서 구축하고, 이어서 B. 서브틸리스 (B. subtilis) 에서 ASP 의 발현을 위해 pHPLT 벡터 (도 3 참조) 내로 클로닝하였다. pXX-KpnI 은 발현 추진 aprE 프로모터 (B. 서브틸리스 (B. subtilis)), cat 유전자, 및 B. 서브틸리스 (B. subtilis) 에서 카피 수의 증폭을 위한 복제본 aprE 프로모터를 가진 pUC 기재 벡터이다. bla 유전자는 E. 콜라이 (E. coli) 에서 선택적인 성장을 가능하게 한다. aprE 프로모터 영역의 하위스트림에 있는 리보솜 결합 부위에 도입된 KpnI 은, HindIII 부위와 함께 pXX-KpnI 에서의 Asp 발현 카세트의 클로닝을 가능하게 한다. pHPLT 의 유도체인 pHPLT-EBS2c2 (Solingen et al., Extremophiles 5:333-341 [2001]) 는 바실러스 리체니포르미스 (Bacillus licheniformis) 의 열안정성 아밀라아제 LAT 프로모터 (P_{LAT}) 와 그 뒤쪽으로, ASP 발현 구축물의 클로닝을 위한 XbaI 및 HpaI 제한 부위를 함유한다.

[0429]

Asp 발현 카세트를 25 개의 Asp C-말단 신호 펩티드 아미노산에 융합된 5 개의 서브틸리신 AprE N-말단 신호 펩티드 아미노산의 구축된 잡종 신호 펩티드를 코딩하는 DNA 를 함유하는 pXX-KpnI 벡터에서 클로닝하였다:

[0430]

(MRSKKRTVTRALAVATAAATLLAGGMAAQA; SEQ ID NO:11).

[0431]

pXX-KpnI 벡터에서 클로닝된 Asp 발현 카세트를 E. 콜라이 (E. coli) (Electromax DH10B, Invitrogen, Cat.No. 12033-015) 내로 형질전환시켰다. 사용된 프라이머 및 클로닝 전략은 표 2-1 에 제시된다. 그 결과, 발현 카세트는 상기 벡터로부터 클로닝되고, B. 서브틸리스 (B. subtilis) (ΔaprE, ΔnprE, oppA, ΔspoIIIE, degUHy32, ΔamyE:: (xylR,pxyIA-comK) 균주 내로의 형질전환을 위해 pHPLT 발현 벡터에 도입되었다. pHPLT 에서의 ASP 발현 카세트 클로닝을 위한 프라이머 및 클로닝 전략은 표 2-2 에 제시된다. B. 서브틸리스 (B. subtilis) 내로의 형질전환은 본원에 참조로서 인용된 WO 02/14490 에 기재된 바와 같이 수행하였다.

표 2-1. pXX-KpnI 및 p2JM103-DNNDPI 중의 ASP						
벡터 구축물	신호 펩티드	ASP C- 말단 전서열	프라이머	DNA 주형	숙주 벡터	클로닝에 사용되는 제한부위
pXX- ASP-4	MRSK KRTVT RALA VATA AATLL AGGM AAQA (SEQ ID NO:11)	도입되지 않음	ASP-PreCross-I-FW TCATGCAGGGTACCATG AGAAGCAAGAAGCGAA CTGTCACAAGAGCTCTG GCT (SEQ ID NO:12) ASP-syntc- 성숙 -RV GTGTGCAAGCTTTCAAG GGGAAGTTCCAGAGTCA GTC (SEQ ID NO:13)	ASP 합성 DNA 서열	pXX- KpnI	KpnI 및 HindIII

표 2-2. pHPLT 중의 ASP 발현 카세트				
벡터 구축물	프라이머	DNA 주형	숙주 벡터	클로닝에 사용되는 제한부위
pHPLT-ASP -C1-2	ASP-Cross-1&2-FW TGAGCTGCTAGCAAAAGGAGAGGG TAAAGAATGAGAAGCAAGAAG (SEQ ID NO:14) pHPLT-ASPmat-RV CATGCATCCCGGGTTAAGGGGAAC TTCCAGAGTCAGTC (SEQ ID NO:15)	pXX-ASP-4	PHPLT- EBS2c2 (XbaI x HpaI)	NheI x SmaI

프라이머는 MWG 및 Invitrogen 에서 수득하였다. Invitrogen 의 프로토콜에 따라 PCR 증폭 (0.2 μ M 프라이머, 25 내지 30 회 사이클) 에 Invitrogen Platinum Taq DNA 폴리머라아제 High Fidelity (Cat.No. 11304-029) 를 사용하였다. 점착성 말단의 일반적 클로닝에 추천되는 Invitrogen 의 프로토콜을 이용하는 Invitrogen T4 DNA Ligase (Cat. No. 15224-025) 를 사용하여 ASP 발현 카세트 및 숙주 벡터의 리가아제 반응을 완료하였다.

asp 유전자의 발현은 B. 서브틸리스 (B. subtilis) 균주 (Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIE, degUHy32, Δ amyE::(xylR,pxylA-comK) 에서 조사되었다. 플라스미드 pHPLT-ASP-C1-2 (표 2-2, 및 도 1 참조) 를 B. 서브틸리스 (B. subtilis) (Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIE, degUHy32, Δ amyE::(xylR,pxylA-comK) 내로 형질전환하였다. 형질전환은 당업계에 공지된 바와 같이 수행되었다 (예를 들어 전체가 참조로서 인용된 WO 02/14490 호 참조).

pHPLT-ASP-C1-2 벡터를 가지고 있는 B. 서브틸리스 (B. subtilis) (Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIE, degUHy32, Δ amyE::(xylR,pxylA-comK) 형질전환체의 선별적 성장을 20 mg/L 네오마이신과 함께, 0.5 g/l 의 CaCl₂ 대신 0.97 g/l 의 CaCl₂·6H₂O (본원에 참조로서 인용된 미국 특허 번호 5,324,653 호 참조) 이 있는 25 ml 의 Synthetic Maxatase Medium (SMM) 를 함유하는 셰이크 플라스크에서 수행하였다. 상기 성장은 단백질분해 활성을 가진 분비된 ASP 프로테아제의 생성을 야기한다. NuPage Novex 10% Bis-Tris 젤 (Invitrogen, Cat.No. NP0301 BOX) 을 사용하여 젤 분석을 수행하였다. 분석용 샘플의 제조를 위해, 2 부피의 상청액을 1 부피의 1 M HCl, 1 부피의 4xLDS 샘플 완충액 (Invitrogen, Cat.No. NP0007), 및 1% PMSF (20 mg/ml) 와 혼합하고, 이어서 70°C 에서 10 분 동안 가열하였다. 그 다음, 각 샘플 25 μ L 을 10 μ L 의 SeeBlue plus 2 미리 염색된 단백질 표준 (Invitrogen, Cat.No. LC5925) 과 함께 젤에 적재하였다. 결과는 본 실시예에 기재된 asp 클로닝 전략이 B. 서브틸리스 (B. subtilis) 에 의해 생성된 활성 Asp 를 산출한다는 것을 명확하게 증명하였다.

또한, 동일한 발효 브로스의 샘플을 하기와 같이 분석하였다: 10 μ l 의 희석 상청액을 취하고, 190 μ l 의 AAPF 기질 용액 (0.1 M Tris/0.005% TWEEN®, pH 8.6 중 농도 1 mg/ml) 에 첨가하였다. p-니트로아닐린의 방출로 인한 410 nm 에서의 흡광도의 증가 속도를 모니터링하면서 (25°C), 생성된 ASP 농도를 측정하였다. 이러한 결과는 B. 서브틸리스 (B. subtilis) pHPLT-ASP-C1-2 형질전환체가 측정가능한 ASP 프로테아제의 생성을

야기한다는 것을 나타내었다.

[0437] 실시예 3

[0438] 조합적 돌연변이체의 구축

[0439] 본 실시예에서는, ASP 변이체의 다중 돌연변이 라이브러리의 구축이 기재되어 있다. 다중 돌연변이 라이브러리에 대한 백본으로서 담당하는 ASP 변이체는 치환 R014I-A064K-T086K-T116E-R123F 를 함유한다. 상기 변이체는 pHPLT 벡터에서 클로닝되었다. 라이브러리의 구축을 위해 QuikChange® 멀티 부위 지정 돌연변이화 (QCMS) 키트 (Stratagene) 를 사용하였다. 라이브러리의 제조를 위해 사용되는 5' 인산화 프라이머를 표 3-1 에 제시하였다. HPLC, PAGE 또는 임의의 기타 유형의 정제된 프라이머가 전장 프라이머의 도입 뿐 아니라 프라이머-함유 오류의 유의한 감소에서 더욱 양호한 결과를 가져온다는 것이 나타났다. 그러나 상기 실험에서 정제된 프라이머는 사용하지 않았다.

표 3-1. 프라이머 및 서열	
프라이머 명칭	프라이머 서열
ASP-N24E-FW	TATCGGATTTCGCAGTAGAGGGTGGCTTCATTACTGCCGG (SEQ ID NO:16)
ASP-N24A-FW	TATCGGATTTCGCAGTAGCCGGTGGCTTCATTACTGCCGG (SEQ ID NO:17)
ASP-N24T-FW	TATCGGATTTCGCAGTAACAGGTGGCTTCATTACTGCCGG (SEQ ID NO:18)
ASP-N24Q-FW	TATCGGATTTCGCAGTACAAGGTGGCTTCATTACTGCCGG (SEQ ID NO:19)
ASP-R35E-FW	CGGTCACTGCGGAGAGACAGGAGCCACTACTGCC (SEQ ID NO:20)
ASP-R35D-FW	CGGTCACTGCGGAGACACAGGAGCCACTACTGCC (SEQ ID NO:21)
ASP-G54D-FW	AGGTAGCTCGTTTCCGGACAATGATTATGCATTCTGTCG (SEQ ID NO:21)
ASP-A64K-N67L-FW	CCGAACAGGGAAAGGAGTACTGTTGCTTGCCCAAGTCAATAAC (SEQ ID NO:22)
ASP-A64K-N67S-FW	CCGAACAGGGAAAGGAGTATCTTTGCTTGCCCAAGTCAATAAC (SEQ ID NO:23)
ASP-A64K-N67A-FW	CCGAACAGGGAAAGGAGTAGCTTTGCTTGCCCAAGTCAATAAC (SEQ ID NO:24)
ASP-G78D-T86K-FW	TAACTACTCGGGCGACAGAGTCCAAGTAGCAGGACATAAAGCC (SEQ ID NO:25)
ASP-R123F-R127Q-FW	GTCTTTGGACTTATCCAAACGACGGTTTGTGCCGAACC (SEQ ID NO:26)
ASP-R123F-R127K-FW	GTCTTTGGACTTATCAAAACGACGGTTTGTGCCGAACCAG (SEQ ID NO:27)
ASP-R123F-R127Y-FW	GTCCGAGGACTTATCTACACGACGGTTTGTGCCGAACC (SEQ ID NO:28)
K159F-FW	GGTGGTTCTGGAATTTGTTCACGGGGGGAACAACATTC (SEQ ID NO:29)
K159E-FW	GGTGGTTCTGGAATTTGTGACGGGGGGAACAACATTC (SEQ ID NO:30)
K159N-FW	GGTGGTTCTGGAATTTGTAACACGGGGGGAACAACATTC (SEQ ID NO:31)
R159K-FW	GGTGGTTCTGGAATTTGTAAGACGGGGGGAACAACATTC (SEQ ID NO:32)

[0441] pUC18-ASP 제조

[0442] 치환 R014I-A064K-T086K-T116E-R123F 를 함유하는 ASP 변이체를 PstI 및 HindIII 제한 부위를 사용하여 pHPLT 벡터로부터 pUC18 벡터 (Invitrogen, cat. no 15363013; 도 1 참조) 내로 클로닝하였다. 이어서, pUC18-ASP 플라스미드 (도 2 참조) 를 전기수용능 (electrocompetent) E. 콜라이 (E. coli) 세포 (Invitrogen, cat. no C4040-52, One Shot® TOP10 Electrocomp™ E. coli, dam+) 에 전기천공시키고, 100 mg/L 암피실린을 함유하는 아가 플레이트 상에서 선별적 성장시켜, pUC18-ASP 플라스미드를 가지고 있는 E. 콜라이 (E. coli) 세포를 수득하였다. 상기 방법은 플라스미드 pHPLT-ASP-C1-2 가 E. 콜라이 (E. coli) 에서 성장하지 않기 때문에 QCMS 프로토콜을 수행하는 것을 필요로 하는, GATC 부위에서 메틸화 ASP DNA 를 확실히 하는데 사용된다.

[0443] pUC18-ASP 플라스미드를 가지고 있는 E. 콜라이 (E. coli) 세포로부터 미니프랩 DNA 를 제조하였다. 구체적으로는, 100 ppm 의 암피실린이 있는 10 mL 의 2xTY 배지에서 균주를 밤새 성장시킨 후, 세포를 스핀 (spin) 시켜 가라앉힌다. Qiagen 스핀 미니프랩 DNA 키트 (cat. No. 27106) 를 사용하여 Qiagen 미니프랩 키트 매뉴얼에 약술된 단계에 의해 플라스미드 DNA 를 제조하였다. 미니프랩 DNA 를 키트에 제공된 Qiagen 완충액 EB 50 uL 로 용리하였다.

[0444] 다중 돌연변이 라이브러리 구축

[0445] 다중 돌연변이 라이브러리 구축에 사용되는 부위는 하기와 같이 선택되었다. 최종 분자에 필요한 각 특성에 대해, 생산성으로 정의되는 부위로 돌연변이를 "업" 또는 "다운," 으로 평가하였다. 최소에서, 조합되는 부위는 원하는 각 특성에 대해 생산성이어야만 하고, 최소에서는 가장 중요한 특성에 대해 생산성이어야만 한다. 라이브러리가 모든 중요한 특성을 개선 또는 유지하기 위해 최고 가능성을 갖도록 확실히 하기 위해, 하기 범주를 사용하였다.

- [0446] 각 특성에 대해, $\Delta\Delta G$ 에 대한 절사점 (cut-off) 값을 설정하였다. 예를 들어, 25°C 에서 수행된 공정에 있어서, 0.06 Kcal 미만의 $\Delta\Delta G$ 값은 모 단백질 활성의 90% 미만의 돌연변이를 나타내는 반면, 1.13 Kcal 초과 $\Delta\Delta G$ 값은 모 단백질 활성의 125% 인 돌연변이를 나타낸다.
- [0447] 다중 돌연변이 라이브러리는 반응에 사용되는 프라이머 농도를 제외하고, Stratagene QCMS 키트에 약술된 바와 같이 구축하였다. 구체적으로, 1 μ L 의 메틸화, 정제된 pUC18-ASP 플라스미드 (약 70 ng) 를 15 μ L 의 멸균 증류수, 1.5 μ L 의 dNTP, 2.5 μ L 의 10x 완충액, 1 μ L 의 효소 혼화물 및 1.0 μ L 의 돌연변이체 프라이머 믹스 (총 100 pmol 의 프라이머에 대해) 와 혼합하였다. Stratagene 에 의해 추천되는 바와 같이 18 개 돌연변이체 프라이머를 각각 10 μ L (100 pmol/ μ L) 사용하고; 라이브러리에 대해 각 프라이머 50 ng 을 첨가하여 프라이머 믹스를 제조하여, 이전 단계의 돌연변이화에서 더 적은 돌연변이를 산출하였다. 그러므로, 본 단계의 돌연변이화에서 프로토콜을 변형시켜 각 반응에서 총 100 pmol 의 프라이머를 포함시켰다. 사이클 조건은 박층 벽 0.2 mL PCR 튜브를 사용하는 MJ Research PTC-200 터모사이클러 (thermocycler) 에서 95°C 에서 1 분 후, 95°C 1 분, 55°C 1 분, 및 65°C 12 분 동안의 30 회 사이클이었다. 반응 생성물을 37°C 에서 밤새 인큐베이션하여 QCMS 키트로부터 1 μ L 의 DpnI 로 소화시켰다. 추가적인 0.5 μ L 의 DpnI 을 첨가하고, 반응을 1 시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0448] 이어서, 라이브러리 DNA (돌연변이된 단일 가닥 pUC18-ASP 생성물) 를 전기수용능 E. 콜라이 (E. coli) 세포 (Invitrogen, cat. no C4040-52, One Shot® TOP10 Electrocomp™ E. coli, dam+) 에 전기천공시키고, 100 mg/L 암피실린을 함유하는 아가 플레이트 상에서 선별적 성장시켜, E. 콜라이 (E. coli) 세포에서 ASP 다중 돌연변이 라이브러리를 야기하였다. 콜로니 (1000 개 중 10 개) 를 수확하고, Qiagen 스핀 미니프랩 DNA 키트 (cat. No. 27106) 를 사용하여 Qiagen 미니프랩 키트 매뉴얼에 약술된 단계에 의해 플라스미드 DNA 를 제조하였다. 미니프랩 DNA 를 키트에 제공된 Qiagen 완충액 EB 50 μ L 로 용리하였다.
- [0449] 미니프랩 DNA 를 PstI 및 HindIII DNA 제한 효소를 사용하여 소화시켰다. ASP 라이브러리 조각 믹스 (PstI x HindIII) 를 젤 정제하고, 점착성 말단의 일반적 클로닝에 추천되는 Invitrogen 의 프로토콜을 이용하는 Invitrogen T4 DNA Ligase (Cat. No. 15224-025) 를 사용하는 리가아제 반응에 의해 4154 개 염기쌍 HindIII x PstI pHPLT 벡터 조각에 클로닝하였다. 또다른 접근법으로, 합성 ASP 라이브러리 조각을 GeneArt 에 의해 생성하였다. 또한 상기 ASP 라이브러리 조각을 PstI 및 HindIII 로 소화시키고 정제하고, 리가아제 반응에 의해 4154 개 염기쌍 HindIII x PstI pHPLT 벡터 조각으로 클로닝하였다.
- [0450] 라이게이션 반응 믹스를 바실러스 (Bacillus) 세포 내에 직접적으로 형질전환시키기 위해, TempliPhi 키트 (Amersham cat. #25-6400) 를 사용하여 라이브러리 DNA (pHPLT 에서 클로닝된 ASP 라이브러리 조각 믹스) 를 증폭시켰다. 상기 목적을 위해, 1 μ L 의 라이게이션 반응 믹스를 TempliPhi 키트로부터의 샘플 완충액 5 μ L 과 혼합하고, 95°C 에서 3 분 동안 가열하여, DNA 를 변성시켰다. 빙상에 반응물을 두어 2 분 동안 냉각시킨 다음, 살짝 스핀시켜 가라앉혔다. 그 다음, TempliPhi 키트로부터의 반응 완충액 5 μ L 및 phi29 폴리머라아제 0.2 μ L 를 첨가하고, 반응물을 MJ Research PCR 기계에서 4 시간 동안 30°C 에서 인큐베이션시켰다. PCR 기계에서 65°C 에서 10 분 동안 인큐베이션하여 반응물 중 phi29 효소에 열처리를 하였다.
- [0451] 바실러스 (Bacillus) 내로 라이브러리를 형질전환시키기 위해, 0.1 μ L 의 TempliPhi 증폭 반응 생성물을 500 μ L 의 수용능 B. 서브틸리스 (B. subtilis) 세포 (Δ aprE, Δ nprE, oppA, Δ spoIIIE, degUHy32, Δ amyE::(xylR,pxylA-comK) 와 혼합한 후 37°C 에서 1 시간 동안 강하게 섞고, 100 및 500 μ L 을 20 ppm 네오마이신 술페이트 (Sigma, Cat. No. N-1876; 1 mg 당 732 μ g 의 네오마이신을 함유함) 및 0.5% 탈지유를 함유하는 HI-아가 플레이트 상에 평판시켰다. 서열분석을 위해 라이브러리로부터 95 개 클론을 골라내었다.
- [0452] 오직 14% 의 클론만이 백본 서열 (R014I-A064K-T086K-T116E-R123F 를 갖는 ASP) 과 동일하였고, 약 3% 의 클론에서 그 외의 돌연변이가 있었던 식으로 돌연변이화는 잘 작동하였다. 나머지 서열분석된 클론 (72%) 은 모두 돌연변이체가 되었고, 이들 중 약 94% 는 독특한 돌연변이체였다. 라이브러리에 대한 서열분석 결과는 하기 표 3-3 에 제공된다.

표 3-3. R014I-A064K-T086K-T116E-R123F 를 갖는 ASP 의 변이체

G54D						
N24A						
N24Q						
N24T						
N67S						
R127K						
R159F						
R159K						
R159K						
R159N						
R159N						
G78D	R159F					
N24Q	R35E					
N67S	R159E					
R127K	R159E					
R127K	R159K					
R127K	R159N					
R127Q	R159K					
R35D	R159E					
R35D	R159K					
R35E	R159K					

[0453]

표 3-3. R014I-A064K-T086K-T116E-R123F 를 갖는 ASP 의 변이체

G54D	R127K	R159K				
G78D	R127K	R159K				
G78D	R127K	R159E				
G78D	R127Q	R159K				
N24A	N67A	R159K				
N24A	N67S	R159K				
N24E	R35D	G78D				
N24T	N67S	R159E				
N67L	G78D	R159K				
R35D	G78D	R159K				
N24A	R35E	G78D	R159N			
N24D	R35D	G78D	R159F			
N24E	G54D	G78D	R159K			
N24E	R35D	G78D	R127K	R159N		
N24Q	G54D	G78D	R159N			
N24Q	N67L	G78D	R159E			
N24Q	R35D	R127K	R159K			
N24T	R35D	G78D	R159K			
N24T	R35D	G78D	R159K			
N67S	G78D	R127K	R159K			
R35D	G78D	R127K	R159E			
R35D	G78D	R127K	R159N			
R35D	G78D	R127Q	R159K			
R35E	G54D	N67A	R159F			
R35E	N67S	G78D	R127Q			
N24A	G54D	N67S	G78D	R159F		
N24A	R35D	N67A	G78D	R159F		
N24Q	R35D	N67L	G78D	R159K		
N24Q	R35D	N67L	G78D	R159N		
N24Q	R35D	N67S	R127K	R159E		
N24Q	R35E	N67A	R127K	R159E		
N24Q	R35E	N67A	G78D	R159E		
N24T	N67A	G78D	R127Q	R159N		
N24T	R35E	N67A	G78D	R127Q		
R35E	G54D	N67S	G78D	R159K		
N24A	G54D	N67S	G78D	R127K	R159K	
N24A	R35E	N67S	G78D	R127K	R159K	
N24E	R35E	G54D	N67S	R127K	R159N	
N24Q	R35D	N67S	G78D	R127K	R159F	
N24T	G54D	N67S	G78D	R127Y	R159E	
N24E	R35E	G54D	N67S	G78D	R127K	R159K

[0454]

실시예 4

[0455]

ASP 변이체 미정제 효소 샘플의 제조

[0456]

MBD 배지 (MOPS 기제로 정의된 배지) 중 37℃ 에서 68 시간 동안 96 웰 MTP 에서 B. 서브틸리스 (B. subtilis)

[0457]

형질전환체 (상기 및 미국 특허 출원 일련 번호 10/576,331 호에 기재됨) 를 성장시켜 Asp 변이체 단백질을 생성하였다. MBD 배지는 당업계에 공지된 바와 같이 본질적으로 제조되었으나 (Neidhardt et al., J. Bacteriol., 119: 736-747 [1974] 참조), NH_4Cl_2 , FeSO_4 , 및 CaCl_2 를 기본 배지에 남겨두었고, 3 mM K_2HPO_4 를 사용하였고, 기본 배지에 60 mM 우레아, 75 g/L 글루코오스, 및 1% 소이톤을 보충하였다. 또한, 미량 영양소는, 400 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 ml 의 1 M CaCl_2 , 및 10 ml 의 0.5 M 나트륨 시트레이트를 1 리터에 함유하는 100 X 저장액으로 제조되었다.

하기 실시예에서는, ASP 의 다양한 돌연변이체에 수행된 시험이 기재되어 있다. 상기 실시예 1 에 기재된 방법을 사용하였다. 하기 표에서, "변이체 코드" 는 야생형 아미노산, 아미노산 서열에서의 위치, 및 대체 아미노산 (즉, "F001A" 는 아미노산 서열 중의 위치 1 에서의 페닐알라닌이 상기 특정 변이체에서 알라닌으로 치환된 것을 나타낸다) 을 제공한다.

실시예 5

다중 치환된 변이체의 카세인 가수분해 활성

본 실시예에서는, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 카세인분해 활성을 측정하기 위해 수행된 시험이 기재되어 있다. 본 실험에서, 사용된 프로토콜은 상기 실시예 1 에 기재되어 있다. 하기 표는 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체 뿐 아니라, 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (≥ 1.13 활성 단위) 을 가진 변이체에 대한 카세인 활성을 제공한다.

표 5-1. 카세인분해 활성	
변이체	카세인 활성
R14L-R79T	1.61
G12D-R35H-R159E	1.27
G12D-R35H-R123Q	1.30
G12D-R35H-R123F-R159E	1.45
G12D-R35H	1.69
G12D-R35E-R159E	1.22
G12D-R35E-R123Q-R159E	1.16
G12D-R35E-R123Q	1.14
G12D-R35E	1.43
G12D-R35D-R159E	1.18

표 5-1. 카세인분해 활성	
변이체	카세인 활성
G12D-R35D-R123Q-R159E	1.27
G12D-R35D	1.64
G12D-R159E	1.49
G12D-R14Q-R35H	1.39
G12D-R14I-R35H	1.41
N024E-G049A-A093H-R127K-A143N-R159K-I181Q	1.15
N24M-S76V-A93H-R127K-R159K	1.13
R14I-N24E-R35D-A64K-N67A-G78D-R123F-R159K-D184T	1.13

하기 표는 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체 뿐 아니라, 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (≥ 0.85 활성 단위) 을 가진 변이체에 대한 카세인 활성을 제공한다.

표 5-2. 카세인분해 활성	
변이체	카세인 활성
R127A-R159K	0.86
R14I-G65Q	1.04
R14I-G65Q-R159K	0.99
R14I-S76V	1.43

상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

실시예 6

다중 치환된 변이체의 케라틴 가수분해 활성

본 실시예에서는, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 케라틴분해 활성을 측정하기 위해 수행된 시험이 기재되어 있다. 본 실험에서, 사용된 프로토콜은 상기 실시예 1 에 기재되어 있다. 하기 표는 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체 뿐 아니라, 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (≥ 1.1 성능 지수) 을 가진 변이체에 대한 케라틴 가수분해 활성을 제공한다.

표 6-1. 케라틴 가수분해 활성 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
N024E-G049A-A093H- R127K-A143N-R159K- I181Q	1.32
N024E-G049A-A093H- S099A-R127K-A143N- R159K-I181T-V090I	1.37
N024E-G049A-A093S- S099D-R127K-A143N- R159K-I181Q	1.28
N024Q-G049A-A093S- S099A-R127K-A143N- R159K-I181Q	1.17
N024Q-G049A-A093S- S099A-R127K-A143N- R159K-I181T	1.19
N024Q-G049A-A093S- S099N-R127K-A143N- R159K-I181Q	1.13
N024T-G049A-A093S- S099A-R127K-A143N- R159K-I181T	1.12
N024W-G049A-A093S- S099A-R127K-A143N- R159K-I181Q	1.13
N24A-G54E-S76D-A93G- R127K-R159K	1.53
N24E-A93G-R127K- R159K	1.33
N24E-G54L-S76E-A93G- R127K-R159K	1.21
N24E-G54Q-A93S-R127K- R159K	1.37
N24E-S76D-A93T-R127K- R159K	1.64
N24M-G54E-A93H- R127K-R159K	1.24
N24M-G54E-S76N-A93S- R127K-R159K	1.24
N24Q-A93G-R127K- R159K	1.17
N24Q-G54D-S76L-A93G- R127K-R159K	1.15
N24Q-G54I-S76E-A93H- R127K-R159K	1.12

표 6-1. 케라틴 가수분해 활성 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
N24T-G54D-S76V-A93G- R127K-R159K	1.11
N24T-G54E-S76V-A93H- R127K-R159K	1.28
N24W-G54D-A93H- R127K-R159K	1.20
N24W-S76E-A93G- R127K-R159K	1.13
R014I-S076A-A093G- R127K-R159K-I181T	1.27
R014I-S076A-A093H- R127K-R159K-I181Q	1.22
R014I-S076D-A093H- R127K-R159K-I181Q	1.40
R014I-S076D-A093H- R127K-R159K-I181T	1.46
R014I-S076D-A093S- R127K-R159K-I181T	1.49
R014I-S076E-A093S- R127K-R159K-I181Q	1.54
R014I-S076E-A093T- R127K-R159K-I181K	1.34
R014I-S076I-A093S- R127K-R159K-I181Q	1.27
R014I-S076N-A093H- R127K-R159K-I181Q	1.18
R014I-S076T-A093G- R127K-R159K-I181Q	1.22
R014I-S076V-A093H- R127K-R159K-I181Q	1.23
R014K-S076A-A093S- R127K-R159K-I181T	1.15
R014K-S076E-A093H- R127K-R159K-I181T	1.14
R014K-S076E-A093S- R127K-R159K-I181T	1.19
R014K-S076T-A093H- R127K-R159K-I181Q	1.11
R014L-S076A-A093H- R127K-R159K	1.36
R014L-S076A-A093H- R127K-R159K-I181Q	1.24
R014L-S076D-A093H- R127K-R159K-I181T	1.32

[0469]

표 6-1. 케라틴 가수분해 활성 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
R014L-S076E-A093H- R127K-R159K-II81K	1.30
R014M-S076A-A093G- R127K-R159K-II81T	1.26
R014M-S076A-A093H- R127K-R159K-II81T	1.15
R014M-S076A-A093S- R127K-R159K-II81K	1.22
R014M-S076A-A093S- R127K-R159K-II81T	1.24
R014M-S076A-A093T- R127K-R159K-II81Q	1.13
R014M-S076D-A093S- R127K-R159K-II81T	1.36
R014M-S076E-A093G- R127K-R159K-II81T	1.25
R014M-S076E-A093H- R127K-R159K-II81T	1.42
R014M-S076E-A093S- R127K-R159K-II81T	1.46
R014M-S076N-A093G- R127K-R159K-II81K	1.11
R014M-S076N-A093G- R127K-R159K-II81T	1.21
R014M-S076N-A093H- R127K-R159K-II81T	1.23
R014M-S076N-A093S- R127K-R159K-II81T	1.25
R014M-S076V-A093G- R127K-R159K-II81Q	1.21
R14I-N24Q-A64K-G78D- R123F-R159K-D184T	1.11
R14I-N24A-A64K-N67S- G78D-R123F-R159K- D184T	1.34
R14I-N24Q-R35D-A64K- N67S-R123F-R159K- D184T	1.21
R14I-N24E-A64K-R123F- R127K-R159K-D184T	1.31
R14I-N24Q-A64K-R123F- R127Q-R159K-D184T	1.28
R14I-N24Q-A64K-G78D- R123F-R127Q-R159N- D184T	1.21
R14I-N24E-A64K-N67L- G78D-R123F-R159K- D184T	1.49
R14I-N24Q-R35D-A64K- N67S-R123F-R159K- D184T	1.26

표 6-1. 케라틴 가수분해 활성 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
R127Q-R159K	1.14
G78D-R127K-R159K	1.24
N67S-G78D-R127K- R159K	1.39
R35D-R159K	1.17
G78D-R127Q-R159K	1.26
N24A-N67A-R159K	1.17
T36S-R127Q-R159E	1.77
S15E-T121E-R123Q	1.32
S15E-R35H-R159E	1.23
S15E-R35E	1.33
S15E-R159E	1.12
S15E-R123Q	1.54
S15E-R123E	1.92
R79T R127Q R179Q	1.55
R35H-R159E	1.12
R35H-R127Q-R159E	1.23
R35F R61S R159Q	1.24
R35F R159Q	1.39
R35E-R159E	1.52
R35E-R127Q	1.21
R35D-R159E	1.52
R35D-R127Q	1.29
R16Q R79T R159Q R179Q	1.36
R16Q R79T R127Q	1.68
R16Q R79T R123L	1.35
R16Q R79T	1.24
R16Q R35F R123L R159Q	1.20
R16Q R159Q R179Q	1.14
R16Q R127Q R159Q	1.35
R16Q R123L R159Q	1.32
R14Q-T121E	1.44
R14Q-R35E-T121E	1.11
R14Q-R35E-R159E	1.20
R14Q-R35E	1.49
R14Q-R35D-R127Q	1.39
R14Q-R35D	1.46
R14L R79T R127Q R159Q	1.30
R14L R61S R79T R123L	1.30
R14L R35F R61S	1.27
R14L R127Q R159Q	1.47
R179Q	
R14L R123L R159Q	1.34
R14I-R35E-R127Q	1.74
R14I-R35E-R123E	1.19
R14I-R35D-R159E	1.20
R14E-R35H-R127Q	1.60
R127Q-R159E	2.44
R127Q R159Q	1.37
R123Q-R159E	1.64

[0470]

표 6-1. 케라틴 가수분해 활성 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
R123Q-R127Q-R159E	1.34
R123L R159Q	1.51
R123L R127Q R159Q	1.11
R123F-R159E	1.64
R123E-R127Q-R159E	1.15
R123E-R127Q	1.65
G12D-S15E-R35H-R159E	1.40
G12D-S15E-R35D	1.59
G12D-S15E-R159E	1.34
G12D-S15E	1.81
G12D-R35H-T121E- R123Q	1.96
G12D-R35H-R159E	1.98
G12D-R35H-R127Q- R159E	1.73
G12D-R35H-R123Q	2.43
G12D-R35H-R123F- R159E	1.44

표 6-1. 케라틴 가수분해 활성 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
G12D-R35H	2.02
G12D-R35E-R159E	1.47
G12D-R35E-R123Q- R159E	1.29
G12D-R35E-R123Q	2.28
G12D-R35E	1.98
G12D-R35D-R159E	1.23
G12D-R35D-R127Q	1.59
G12D-R35D	2.23
G12D-R159E	2.46
G12D-R14Q-R35H	2.20
G12D-R14Q-R35D-R123H	1.20
G12D-R14Q-R159E	1.55
G12D-R14I-R35H	2.82
G12D-R14E	2.00
G12D-R127Q-R159E	1.83
G12D-R123E-R159E	1.26

하기 표는 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체 뿐 아니라, 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (≥ 1.2 성능 지수) 을 가진 변이체에 대한 케라틴분해 활성을 제공한다.

표 6-2. 케라틴 가수분해 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
R127A-R159K	1.84
R14I-G65Q	1.96
R14I-G65Q-R127A- R159K	1.42
R14I-G65Q-R159K	1.78
R14I-R127A	1.23
R14I-R127A-R159K	1.45
R14I-R159K	2.69
R14I-R35F	1.32

표 6-2. 케라틴 가수분해 검정법 결과	
변이체	케라틴 가수분해 [성능 지수]
R14I-R35F-G65Q	1.50
R14I-R35F-G65Q- R127A-R159K	1.66
R14I-R35F-R159K	1.71
R14I-S76V	2.39
R14I-T36S-G65Q- R127A-R159K	1.90
R35F-R127A-R159K	1.75

상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

실시예 7

다중 치환된 변이체의 열안정성

본 실시예에서는, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 열안정성을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다.

본 실험에서, 사용된 프로토콜은 상기 실시예 1 에 기재되어 있다. 하기 표는 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체 뿐 아니라, 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 ($\geq 48\%$ 잔여 활성) 을 가진 변이체에 대한 잔여 카세인 활성을 제공한다.

표 7-1. 열안정성 검정법 결과	
변이체	열안정성 [%잔여 활성]
T121E-R123F-R159E	61
R79T-R127Q-R179Q	55
R16Q-R79T-R127Q	55
R16Q-R79T-R123L-R159Q-R179Q	61
R16Q-R79T-R123L	65
R16Q-R79T	64
R16Q-R123L-R159Q	49
R14Q-T121E	59
R14L-R79T	71
R123L-R159Q	54
R123L-R127Q-R159Q	69
G12D-S15E-R35D-R123F-R159E	59
G12D-S15E-R159E	54

표 7-1. 열안정성 검정법 결과	
변이체	열안정성 [%잔여 활성]
G12D-S15E	64
G12D-R35H-T121E-R123Q	57
G12D-R35H-R123Q	59
G12D-R35H-R123F-R159E	60
G12D-R35H	57
G12D-R35E-R123Q	51
G12D-R35E	52
G12D-R159E	53
G12D-R14Q-S15E-R35D	52
G12D-R14Q-R35H	51
G12D-R14Q-R159E	49
G12D-R14E	84
G12D-R127Q-R159E	63
G12D-R123E-R159E	58

[0478]

[0479]

상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

[0480]

실시예 8

[0481]

다중 치환된 변이체의 LAS 안정성

[0482]

본 실시예에서는, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 LAS 안정성을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다.

본 실험에서, 사용된 프로토콜은 25℃ 의 온도가 사용되며, 상기 실시예 1 에 기재되어 있다. 하기 표는 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체 뿐 아니라, 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 잔여 활성 (≥10% 잔여 활성) 을 가진 변이체에 대한 잔여 AAPF 활성을 제공한다.

표 8-1. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS 안정성 [%]
T121E-R123F-R159E	73

표 8-1. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS 안정성 [%]
S15E-T121E-R123Q	87

[0483]

표 8-1. LAS 안정성 검증법 결과	
변이체	LAS 안정성 [%]
S15E-R35H-R159E	88
S15E-R35E-R159E	93
S15E-R35E-R127Q-R159E	102
S15E-R35E	82
S15E-R35D-T121E-R123Q	100
S15E-R35D-R123Q	90
S15E-R35D-R123F-R159E	97
S15E-R35D	81
S15E-R159E	62
S15E-R127Q	67
S15E-R123Q	66
S15E-R123E	81
R79T R127Q R179Q	53
R35H-R159E	82
R35H-R127Q-R159E	89
R35H-R123D-R159E	82
R35F R61S R159Q	78
R35F R159Q	44
R35E-T121E-R123E	92
R35E-R159E	93
R35E-R127Q	84
R35D-R159E	88
R35D-R127Q-R159E	95
R35D-R127Q	89
R35D-R123Q-R159E	94
R16Q R79T R159Q R179Q	93
R16Q R79T R127Q	92
R16Q R79T R123L R159Q R179Q	96
R16Q R79T R123L R159Q	89
R16Q R79T R123L	74
R16Q R79T	38
R16Q R61S R159Q R179Q	95
R16Q R61S R123L R159Q	96
R16Q R35F R61S R159Q	97
R16Q R35F R159Q	82
R16Q R35F R123L R159Q	91
R16Q R35F	54
R16Q R159Q R179Q	83

표 8-1. LAS 안정성 검증법 결과	
변이체	LAS 안정성 [%]
R16Q R159Q	69
R16Q R127Q R179Q	88
R16Q R127Q R159Q	76
R16Q R123L R159Q	85
R14Q-T121E	88
R14Q-R35E-T121E	96
R14Q-R35E-R159E	91
R14Q-R35E	94
R14Q-R35D-R127Q	88
R14Q-R35D-R123E-R159E	93
R14Q-R35D-R123D-R159E	99
R14Q-R35D	85
R14Q-R123Q	87
R14L R79T R127Q R159Q	90
R14L R79T	32
R14L R61S R79T R123L	97
R14L R61S R123L	85
R14L R35F R79T R123L R159Q	90
R14L R35F R61S	80
R14L R127Q R159Q R179Q	86
R14L R123L R159Q	91
R14I-R35E-T121E-R159E	100
R14I-R35E-R127Q	97
R14I-R35E-R123E	95
R14I-R35D-R159E	98
R14I-R35D-R127Q-R159E	99
R14E-S15E-R35H	92
R14E-R35H-R127Q	91
R14D-S15E-R35E-R159E	98
R14D-R35H-R123Q-R159E	98
R127Q-R159E	40
R127Q R159Q	39
R123Q-R159E	42
R123Q-R127Q-R159E	51
R123L R159Q	36
R123L R127Q R159Q	56
R123F-R159E	67
R123E-R127Q-R159E	65
R123E-R127Q	49
G12D-S15E-R35H-R159E	100

[0484]

표 8-1. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS 안정성 [%]
G12D-S15E-R35H-R123F-R127Q-R159E	100
G12D-S15E-R35E-R159E	103
G12D-S15E-R35D-R127Q	99
G12D-S15E-R35D-R123F-R159E	101
G12D-S15E-R35D-R123E	100
G12D-S15E-R35D	97
G12D-S15E-R159E	96
G12D-S15E	76
G12D-R35H-T121E-R123Q	98
G12D-R35H-R159E	96
G12D-R35H-R123Q-R159E	97
G12D-R35H-R123Q	89
G12D-R35H-R123F-R159E	98
G12D-R35H	79
G12D-R35E-R159E	101
G12D-R35E-R123Q-R159E	96
G12D-R35E-R123Q	92
G12D-R35E	97
G12D-R35D-R159E	95
G12D-R35D-R127Q	98
G12D-R35D-R123Q-R159E	103
G12D-R35D	94
G12D-R159E	97
G12D-R14Q-S15E-R35D	101
G12D-R14Q-R35H	88
G12D-R14Q-R35E-R127Q-R159E	100
G12D-R14Q-R35D-R123H	100

표 8-1. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS 안정성 [%]
G12D-R14Q-R159E	96
G12D-R14I-R35H	94
G12D-R14E	85
G12D-R14D-R35H-R123D-R127Q	100
G12D-R127Q-R159E	93
G12D-R123E-R159E	99
R127A-R159K	24
R14I-G65Q	13
R14I-G65Q-N67L-R159K	11
R14I-G65Q-N67L-Y75G-R127A-R159K	11
R14I-G65Q-R159K	33
R14I-G65Q-S76V-R127A-R159K	11
R14I-R127A	71
R14I-R127A-R159K	77
R14I-R159K	58
R14I-R35F	64
R14I-R35F-G65Q	47
R14I-R35F-G65Q-R127A-R159K	76
R14I-R35F-N67L-R127A-R159K	61
R14I-R35F-R127A-R159K	81
R14I-R35F-R159K	70
R14I-S76V	14
R14I-T36S-G65Q-R127A-R159K	32
R35F-R127A-R159K	57
R35F-S76A-R127A	58

[0485]

[0486]

부가적인 실험에서, 다중 치환을 가진 변이체의 LAS 안정성을 시험하였다. 첫번째 실험 세트에서, 실시예 1에 기재된 시험 조건을 25℃의 온도에서 사용하였다. 하기 표에서, 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (≥20% 잔여 활성)을 가진 변이체를 제시한다.

표 8-2. 25°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS-25°C 안정성 [%]
N024A-G049A-A093H-S099N-R127K-A143N-R159K-II81Q	25
N024A-S076A-A093H-S099G-R127K-R159K	47
N024A-S076T-A093S-S099G-R127K-R159K	41
N024E-G049A-A093G-S099G-R127K-A143N-R159K-II81T	31
N024E-G049A-A093H-R127K-A143N-R159K-II81Q	53
N024E-G049A-A093H-S099A-R127K-A143N-R159K-II81T-V090I	75
N024E-G049A-A093S-S099D-R127K-A143N-R159K-II81Q	27
N024H-G049A-A093T-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	41
N024H-S076A-A093G-S099G-R127K-R159K	53
N024H-S076A-A093H-S099G-R127K-R159K	78
N024H-S076A-A093S-S099A-R127K-R159K-G054H-L069H	26
N024H-S076A-A093T-S099G-R127K-R159K	46
N024H-S076N-A093Q-S099W-R127K-R159K	33
N024H-S076V-A093Q-S099G-R127K-R159K	29
N024L-G049A-A093H-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	31
N024L-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	23
N024L-S076V-A093H-S099G-R127K	30
N024L-S076V-A093S-S099A-R127K-R159K	29
N024M-G049A-A093G-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	39
N024M-G049A-A093H-S099D-R127K-A143N-R159K-II81Q	26

표 8-2. 25°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS-25°C 안정성 [%]
N024M-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	35
N024M-G049A-A093S-S099W-R127K-A143N-R159K-II81Q	23
N024Q-G049A-A093H-S099A-R127K-A143N-R159K-II81T	40
N024Q-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	50
N024Q-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81T	28
N024Q-S076A-A093H-S099A-R127K-R159K-T039N	58
N024Q-S076A-A093H-S099W-R127K-R159K	38
N024Q-S076I-A093T-S099G-R159K	25
N024Q-S076T-A093S-R127K-R159K	48
N024S-S076A-A093G-S099G-R127K-R159K-G054A	46
N024S-S076A-A093H-S099T-R127K-R159K	41
N024S-S076A-A093S-S099W-R127K-R159K	47
N024S-S076A-A093T-S099W-R127K	21
N024S-S076T-A093Q-S099W-R127K-R159K	37
N024S-S076Y-A093T-S099A-R127K-R159K	50
N024T-G049A-A093G-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	48
N024T-G049A-A093H-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	60
N024T-G049A-A093H-S099A-R127K-A143N-R159K-II81T	58
N024T-G049A-A093H-S099D-R127K-A143N-R159K-II81Q	21

[0487]

표 8-2. 25°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS-25°C 안정성 [%]
N024T-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81T	41
N024T-G049A-A093T-S099A-R127K-A143N-R159K-II81T	27
N024T-S076N-A093Q-S099T-R127K-R159K	26
N024T-S076T-A093T-S099N-R127K-R159K	37
N024V-S076A-R127K-R159K	60
N024V-S076V-A093Q-S099G-R127K-R159K	33
N024W-A093G-S099W-R127K-R159K	33
N024W-G049A-A093H-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	35
N024W-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81K	22
N024W-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-II81Q	25
N024W-S076A-A093T-S099A-R127K-R159K	60
N024W-S076I-A093Q-S099G-R127K-R159K	26
N024W-S076N-A093T-S099G-R159K	30
N024W-S076T-A093H-S099A-R127K-R159K	44
N024W-S076T-A093H-S099W-R127K-R159K	34
N024W-S076V-A093H-S099A-R127K-R159K	26
N024W-S099W-R127K-R159K	32
N24A-G54E-S76D-A93G-R127K-R159K	50
N24E-A93G-R127K-R159K	53
N24E-G54L-S76E-A93G-R127K-R159K	22
N24E-G54Q-A93S-R127K-R159K	50
N24E-S76D-A93T-R127K-R159K	40

표 8-2. 25°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS-25°C 안정성 [%]
N24H-A93H-R127K-R159K	41
N24H-G54E-A93G-R127K-R159K	46
N24H-S76D-A93H-R127K-R159K	35
N24L-A93G-R127K-R159K	32
N24L-G54E-A93G-R127K-R159K	46
N24L-G54L-A93G-R127K-R159K	21
N24L-G54Q-S76A-A93H-R127K-R159K	37
N24L-S76T-A93G-R127K-R159K	24
N24L-S76T-A93H-R127K-R159K	30
N24M-A93G-R127K-R159K	33
N24M-A93H-R127K-R159K	41
N24M-A93S-R127K-R159K	36
N24M-A93T-R127K-R159K	29
N24M-G54E-A93H-R127K-R159K	54
N24M-G54E-S76N-A93S-R127K-R159K	46
N24M-G54I-A93H-R127K-R159K-S187I	31
N24Q-A93G-R127K-R159K	37
N24Q-G54D-A93H-R127K-R159K	43
N24Q-G54I-A93G-R127K-R159K	25
N24Q-G54I-S76E-A93H-R127K-R159K	22
N24Q-G54Q-A93G-R127K-R159K	32
N24Q-G54Q-S76T-A93H-R127K-R159K	30
N24Q-S76A-A93G-R127K-R159K	37
N24T-G54D-S76V-A93G-R127K-R159K	26
N24T-G54E-S76V-A93H-R127K-R159K	38

[0488]

표 8-2. 25°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS-25°C 안정성 [%]
N24T-G54I-A93G-R127K-R159K	38
N24T-G54N-A93H-R127K-R159K	27
N24T-G54Q-S76N-A93G-R127K-R159K	40
N24T-G54Q-S76V-R127K-R159K	26
N24T-S76I-R127K-R159K	25
N24T-S76L-A93G-R127K-R159K	20
N24W-A93G-R127K-R159K	35
N24W-G54D-A93H-R127K-R159K	35
N24W-G54I-S76A-A93H-R127K-R159K	26
N24W-S76A-A93H-R127K-R159K	36
N24W-S76E-A93G-R127K-R159K	21
R014I-S076A-A093G-R127K-R159K-II81T	44
R014I-S076A-A093H-R127K-R159K-II81K	54
R014I-S076A-A093H-R127K-R159K-II81Q	71
R014I-S076A-A093H-R127K-R159K-II81T	38
R014I-S076D-A093H-R127K-R159K-II81Q	75
R014I-S076D-A093S-R127K-R159K-II81T	41
R014I-S076E-A093S-R127K-R159K-II81Q	64
R014I-S076E-A093T-R127K-R159K-II81K	30
R014I-S076I-A093S-R127K-R159K-II81Q	23
R014I-S076N-A093H-R127K-R159K-II81Q	68
R014I-S076T-A093G-R127K-R159K-II81Q	57
R014K-S076A-A093G-R127K-R159K-II81K	20
R014K-S076E-A093H-R127K-R159K-II81K	20

표 8-2. 25°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS-25°C 안정성 [%]
R014K-S076T-A093H-R127K-R159K-II81Q	24
R014L-S076A-A093H-R127K-R159K	69
R014L-S076A-A093H-R127K-R159K-II81Q	66
R014L-S076D-A093H-R127K-R159K-II81T	39
R014L-S076E-A093H-R127K-R159K-II81K	36
R014M-S076A-A093G-R127K-R159K-II81K	45
R014M-S076A-A093G-R127K-R159K-II81T	37
R014M-S076A-A093H-R127K-R159K-II81T	36
R014M-S076A-A093S-R127K-R159K-II81K	49
R014M-S076A-A093S-R127K-R159K-II81T	40
R014M-S076A-A093T-R127K-R159K-II81Q	57
R014M-S076D-A093S-R127K-R159K-II81T	35
R014M-S076E-A093G-R127K-R159K-II81T	32
R014M-S076E-A093H-R127K-R159K-II81T	32
R014M-S076E-A093S-R127K-R159K-II81T	39
R014M-S076N-A093G-R127K-R159K-II81K	42
R014M-S076N-A093G-R127K-R159K-II81T	36
R014M-S076N-A093H-R127K-R159K-II81Q	75
R014M-S076N-A093H-R127K-R159K-II81T	42
R014M-S076N-A093S-R127K-R159K-II81T	37
R014M-S076N-A093T-R127K-R159K-II81T	33
R014M-S076T-A093H-R127K-R159K-II81K	37
R014M-S076V-A093G-R127K-R159K-II81Q	25
R014M-S076V-A093H-R127K-R159K-II81Q	22

[0489]

[0490]

추가 실험에서, 또다른 시험 조건이 사용되었다. 하나의 실험 세트에서, 실시예 1 에 기재된 프로토콜을 사용하여 좀더 높은 온도 (35°C) 에서 LAS 안정성을 시험하였다. 하기 표에서, 야생형의 활성 + 1 표준 편차 보다 큰 활성 (≥5% 잔여 활성) 을 나타내는 변이체에 대한 % 잔여 활성을 제시한다.

표 8-3. 35°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS 안정성 (35°C) [%]
G54E-R14L	32
G54L-R127S	6
N24D-G54F-R127C	6
N24E-R127S	7
N24E-R159C	7
N24G-G54I-R127S	10
N24H-R159Y-T46I	52
N24I-R127V-R14V	18
N24T-R127Q-R179F	11
R127A-R159V-R179F	12
R127C-R14W	7
R127S-R159N-R123L	50
R14A-N24F-R159L	25
R14A-R127L	28
R14A-R127Y-R159W	28
R14A-R159W	9
R14C-S114F-R159G	25
R14F-R127L-R159F	19
R14F-R127Q-R159W	37
R14F-R127S-R159V	32
R14F-R127V-R159F	16
R14G-N24L-R159G	13
R14G-N24S-R127C	47
R14G-R127C-G63E	58
R14G-R127G	19
R14G-R127P	9
R14L-N24S-R159F	20

표 8-3. 35°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS 안정성 (35°C) [%]
R14L-N24V-R127S-R159I	31
R14L-R123L	25
R14L-R127C-R159G	32
R14L-R127S	22
R14L-R127S-R159G	31
R14L-R127V	17
R14L-R127V-R159F	27
R14L-R127W-R123Y	47
R14L-R127Y	10
R14L-R127Y-R159F	30
R14L-R159G	23
R14L-R159L	30
R14L-R159S	43
R14L-R159V	40
R14L-R159W	5
R14M-N24L-R159S-R123V	39
R14M-R159F	17
R14Q-R123F	56
R14S-N24E-R127W	13
R14S-N24L-R159G	17
R14S-R127L-R159F	41
R14S-R127V	33
R14T-R14P-R159F	33
R14T-N24A	6
R14T-N24T-R127Q	69
R14T-N24T-R127Y-R159W	42
R14T-R127Y	29
R14V-N24A-R127I-R159A	26

표 8-3. 35°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS 안정성 (35°C) [%]
R14V-N24D-R127C	69
R14V-N24G-P189S	7
R14V-N24S	9
R14V-N24Y-R127S-R159G	37
R14V-R127A	48
R14V-R127C-R159S	62
R14V-R127M-R159V	63
R14V-R127S-R159G	47

표 8-3. 35°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과.	
변이체	LAS 안정성 (35°C) [%]
R14V-R127T-R159Y	49
R14V-R127V	27
R14V-R159F	33
R14V-R159V	53
R14V-R159W	12
R14W-N24T-R123E	48
R14W-R123L	6
R14W-R123V	19
R14W-R127Q-R159W	13
R14W-R159V	13
R159V-G49D	6

부가적인 실험에서, 실시예 1 에 기재된 프로토콜을 사용하여 35°C 에서 변이체를 시험하였다. 표에서, G12D 및 R35E 을 가지고, >70% 잔여 활성을 가진 변이체에 대한 결과를 제시한다.

하기

표 8-4. 35°C 에서의 LAS 안정성 검정법의 결과	
변이체	LAS-35°C G12D-R35E 안정성 [%]
G012D-R035E-G065E	73
G012D-R035E-G065E	73
G012D-R035E-Q081P	79
G012D-R035E-R016S-A064T	77
G012D-R035E-R159W	74
G012D-R035E-R179I	82
G012D-R035E-S092T-I181V	71

[0494]

[0495]

부가적인 실험에서, 또다른 조건이 사용되었다. 하나의 실험 세트에서, 다양한 다중 치환된 변이체에 대한 성능 지표가 실시예 1 의 프로토콜을 사용하여 측정되고 25°C 에서 시험되었다. 하기 표에서, 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 잔여 활성 (>1.1 성능 지수) 을 갖는 변이체에 대한 성능 지수 결과 (PI) 를 제시한다.

표 8-5. LAS 검정법 안정성 결과	
변이체	LAS (25°C) [성능 지수]
R14I-N24A-A64K-R123F-R159E-D184T	2.97
R14I-A64K-R123F-R159F-D184T	3.99
R14I-A64K-R123F-R159E-D184T	3.82
R14I-N24Q-R35E-A64K-R123F-D184T	3.89
R14I-N24Q-A64K-N67S-R123F-R159F-D184T	1.24
R14I-N24A-R35E-A64K-N67S-R123F-R159E-D184T	1.20
R14I-N24A-R35E-A64K-N67S-G78D-R123F-D184T	1.20
R14I-N24A-R35D-A64K-G78D-R123F-R127K-R159E-D184T	1.72
R14I-N24A-R35D-A64K-R123F-R127K-R159F-D184T	2.88
R14I-N24T-R35D-A64K-G78D-R123F-R127Q-R159F-D184T	3.75
R14I-A64K-R123F-D184T	3.99
R14I-N24A-A64K-R123F-R159N-D184T	2.94
R14I-N24Q-R35D-A64K-N67S-R123F-R159K-D184T	1.31
R14I-N24E-R35E-A64K-G78D-R123F-R127Q-R159F-D184T	9.51
R14I-N24E-A64K-R123F-R127K-R159K-D184T	6.64
R14I-N24A-A64K-R123F-D184T	2.80
R14I-A64K-R123F-R127K-R159F-D184T	4.25
R14I-A64K-R123F-R159E-D184T	4.22
R14I-A64K-R123F-R159N-D184T	3.93
R14I-A64K-R123F-R159K-D184T	3.83
R14I-A64K-R123F-R127Y-R159E-D184T	4.32

[0496]

표 8-5. LAS 검정법 안정성 결과	
변이체	LAS (25°C) [성능 지수]
R14I-N24A-R35E-A64K-N67A-G78D-R123F-D184T	2.40
R14I-A64K-R123F-R127Y-R159K-D184T	4.08
R14I-N24Q-A64K-R123F-R127Q-R159K-D184T	3.92
R14I-A64K-R123F-R159K-D184T	4.29
R14I-N24Q-A64K-G78D-R123F-R127Q-R159N-D184T	1.87
R14I-N24E-A64K-N67L-G78D-R123F-R159K-D184T	1.33
R14I-N24A-R35E-A64K-G78D-R123F-R127K-R159E-D184T	1.91
R14I-N24Q-R35D-A64K-N67S-R123F-R159K-D184T	1.33
R14I-N24A-R35D-A64K-N67A-R123F-R159F-D184T	1.22
R14I-N24E-R35E-G54D-A64K-N67L-G78D-R123F-R127K-D184T	2.64
R14I-A64K-G78D-R123F-R127Q-R159N-D184T	1.60
R14I-N24A-R35E-A64K-G78D-R123F-R159N-D184T	1.74
R14I-A64K-R123F-R127K-R159E-D184T	4.27
R14I-N24A-R35E-A64K-N67S-G78D-R123F-R127K-R159F-D184T	1.20
R14I-A64K-G78D-R123F-R159E-D184T	1.71
R14I-N24E-R35D-A64K-N67A-G78D-R123F-R159K-D184T	4.23
N24T-R35D-G78D-R159K	6.53
N24T-R35E-N67A-G78D-R127Q	1.36
N24Q-R35E	6.60
R127K-R159N	6.02

표 8-5. LAS 검정법 안정성 결과	
변이체	LAS (25°C) [성능 지수]
R35D-R159E	7.25
R35E-G54D-N67S-G78D-R159K	1.58
N24Q-G54D-G78D-R159N	2.84
R127K-R159E	6.58
R127Q-R159K	5.76
N24E-R35E-G54D-N67S-R127K-R159N	9.73
R35D-G78D-R159K	5.17
N67S-R159E	2.05
G54D-R127K-R159K	6.11
G78D-R127K-R159K	2.76
G78D-R127K-R159E	2.63
N24E-R35D-G78D-R127K-R159N	11.02
R35D-G78D-R127K-R159N	5.38
N24A-R35E-G78D-R159N	4.03
N24Q-R35D-N67S-R127K-R159E	2.13
N24T-R35D-G78D-R159K	6.73
N67S-G78D-R127K-R159K	1.12

표 8-5. LAS 검정법 안정성 결과	
변이체	LAS (25°C) [성능 지수]
N24Q-R35D-R127K-R159K	7.33
N24E-G54D-G78D-R159K	8.72
R35D-R159K	6.89
R35E-R159K	7.66
R127K-R159K	5.82
R35E-N67S-G78D-R127Q	2.67
N24E-R35D-G78D	11.21
R35D-G78D-R127K-R159E	5.44
N24E-R35E-G54D-N67S-G78D-R127K-R159K	7.87
N24T-N67S-R159E	3.10
N24D-R35D-G78D-R159F	9.11
N24Q-R35D-N67S-G78D-R127K-R159F	1.50
R35D-G78D-R127Q-R159K	4.41
G78D-R159F	2.48
N24A-N67S-R159K	1.14
G78D-R127Q-R159K	2.63
N24T-G54D-N67S-G78D-R127Y-R159E	2.42

[0497]

[0498]

부가적인 실험에서, 많은 변이체의 LAS 안정성을 실시예 1 에 언급된 프로토콜을 사용하여 25°C 에서 시험하였다. 상기와 같이, 선택 기준은 WT 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 잔여 활성 (> 1.1 성능 지수) 이었다.

표 8-6. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS안정성-25° [성능 지수]
R14I-A63K-G78D-R123F-D184T	2.66
R14I-A63K-R123F-R159E-D184T	3.53
R14I-A63K-R123F-R159F-D184T	3.48
R14I-A63K-R123F-R159K-D184T	3.33
R14I-A63K-R123F-R159N-D184T	3.83
R14I-A63K-R123K-D184T	3.38
R14I-A63K-R123Q-D184T	3.58
R14I-A63K-R123Y-	3.62

표 8-6. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS안정성-25° [성능 지수]
D184T	
R14I-A64K-G78D-T86K-T116E-R123F	1.47
R14I-A64K-T86K-T116E-R123F-R159E	5.21
R14I-A64K-T86K-T116E-R123F-R159K	5.11
R14I-A64K-T86K-T116E-R123K	4.21
R14I-A64K-T86K-T116E-R123Q	4.74
R14I-A64K-T86K-T116E-R123Y	4.34
R14I-G54D-A63K-R123F-D184T	2.74

[0499]

표 8-6. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS안정성-25° [성능 지수]
R14I-G54D-A64K-T86K-T116E-R123F	4.12
R14I-G54D-S76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	8.53
R14I-G54D-S76V-A93S-R127K-R159K-II81K	3.53
R14I-N24A-A63K-R123F-D184T	2.59
R14I-N24A-A64K-T86K-T116E-R123F	3.11
R14I-N24E-A63K-R123F-D184T	7.31
R14I-N24E-A64K-T86K-T116E-R123F	9.39
R14I-N24Q-A63K-R123F-D184T	4.13
R14I-N24Q-A64K-T86K-T116E-R123F	4.51
R14I-N24T-A63K-R123F-D184T	4.35
R14I-N24T-A64K-T86K-T116E-R123F	6.54
R14I-N24TS76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	7.43
R14I-N24TS76V-A93S-R127K-R159K-II81K	1.78
R14I-N67AS76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	4.59
R14I-N67LS76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	2.71
R14I-N67SS76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	4.32
R14I-R35D-A64K-T86K-T116E-R123F	5.72
R14I-R35D-S76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	9.45
R14I-R35E-A63K-R123F-D184T	3.50
R14I-R35E-A64K-T86K-T116E-R123F	6.08
R14I-R35E-S76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	9.00
R14I-R35E-S76V-A93S-R127K-R159K-II81K	5.22

표 8-6. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS안정성-25° [성능 지수]
R14I-R35K-A63K-R123F-D184T	3.10
R14I-S76N-A93H-R127K-R159E-II81Q	8.54
R14I-S76N-A93H-R127K-R159F-II81Q	7.56
R14I-S76N-A93H-R127K-R159N-II81Q	9.01
R14I-S76N-A93H-R127Q-R159K-II81Q	9.11
R14I-S76N-A93H-R127Y-R159K-II81Q	6.88
R14I-S76N-G78D-A93H-R127K-R159K-II81Q	5.55
R14I-S76V-A93S-R127K-R159F-II81K	1.82
R14I-S76V-A93S-R127K-R159N-II81K	2.00
R14I-S76V-A93S-R127Q-R159K-II81K	2.59
R14I-S76V-A93S-R127Y-R159K-II81K	1.63
R14M-G54D-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	7.52
R14M-N24A-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	1.38
R14M-N24E-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	7.17
R14M-N24Q-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	3.58
R14M-N24T-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	5.57
R14M-N67S-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	1.53
R14M-R35D-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	8.65
R14M-R35E-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	9.25
R14M-S76N-A93G-R127K-R159E-II81K	6.89
R14M-S76N-A93G-	5.14

표 8-6. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS안정성-25° [성능 지수]
R127K-R159F-II81K	
R14M-S76N-A93G-R127K-R159N-II81K	6.71
R14M-S76N-A93G-R127Q-R159K-II81K	5.85
R14M-S76N-A93G-	4.75

표 8-6. LAS 안정성 검정법 결과	
변이체	LAS안정성-25° [성능 지수]
R127Y-R159K-II81K	
R14M-S76N-G78D-A93G-R127K-R159K-II81K	2.13

상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

실시예 9

다중 치환된 변이체의 얼룩 제거 성능

[0505] 본 실험에서는, 사용된 프로토콜은 상기 실시예 1 에 기재되어 있다. 하기 표는 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (> 1.1 성능 지수 [PI]) 을 가진 변이체에 대해 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체를 제공한다. 상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

표 9-1. 세정 성능 결과	
변이체	BMI LVJ1 세제 [성능 지수]
N24F-R159G	1.24
N24F-R159L-R123V	1.22
N24I-R127S	1.15
N24L-R159S	1.14
N24S-R159A	1.41
N24V-R159L	1.34
N24Y-R159F	1.14
R14A-N24K-R127S	1.32
R14A-R159W	1.12
R14L-N24Y	1.32
R14L-R159G	1.22
R14L-R159S	1.11
R14L-T109M	1.14
R14L-T39P	1.26

표 9-1. 세정 성능 결과	
변이체	BMI LVJ1 세제 [성능 지수]
R14M-R159W	1.18
R14S-N24V	1.34
R14S-N24Y	1.32
R14T-N24A	1.16
R14V-N24G-P189S	1.23
R14V-R159W	1.17
R127A-R159K	1.23
R14I-G65Q	1.32
R14I-S76V	1.27
R14I-G65Q-N67L-R159K	1.11
R14I-G65Q-R159K	1.32
R14I-S76V	1.48

[0506]

[0507] 액체 세제를 사용하는 추가적인 실험에서, 하기 결과가 수득되었다. 하기 표에 제시된 변이체는 하기 표에 보여진 바와 같이 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (>1.1 성능 지수) 을 나타내었다.

표 9-2. LVJ-1 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI LVJ-1 세제 [성능 지수]
R35F R159Q	1.13
R16Q R79T	1.31
R16Q R35F	1.10
R16Q R159Q	1.17
R14L R79T	1.45

표 9-2. LVJ-1 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI LVJ-1 세제 [성능 지수]
R123L R159Q	1.16
G12D-S15E	1.23
G12D-R35H	1.46
G12D-R35D	1.13

표 9-3. TIDE®2005 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI Tide2005 세제 [성능 지수]
N024E-G049A-A093H-R127K-A143N-R159K-I181Q	1.23
N024H-S076A-A093S-S099A-R127K-R159K-G054H-L069H	1.11
N024H-S076A-A093T-S099G-R127K-R159K	1.16
N024L-S076V-A093S-S099A-R127K-R159K	1.11
N024Q-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-I181T	1.13
N024T-G049A-A093S-S099A-R127K-A143N-R159K-I181T	1.13
N24E-G54Q-A93S-R127K-R159K	1.17
N24H-A93H-R127K-R159K	1.14
N24H-G54L-S76V-A93H-R127K-R159K	1.28
N24L-G54Q-S76A-A93H-R127K-R159K	1.13
N24M-A93G-R127K-R159K	1.10
N24M-G54E-A93H-R127K-R159K	1.15

표 9-3. TIDE®2005 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI Tide2005 세제 [성능 지수]
N24M-S76V-A93H-R127K-R159K	1.29
N24Q-G54Q-S76T-A93H-R127K-R159K	1.11
N24Q-S76A-A93G-R127K-R159K	1.13
N24T-G54Q-S76N-A93G-R127K-R159K	1.14
N24T-S76I-R127K-R159K	1.12
N24W-G54D-A93H-R127K-R159K	1.20
N24W-S76A-A93H-R127K-R159K	1.14
N24W-S76T-A93G-R127K-R159K	1.12
N24W-S76V-A93G-R127K-R159K	1.12
N24W-S76Y-A93G-R127K-R159K	1.22
R014I-S076A-A093G-R127K-R159K-I181T	1.22
R014I-S076A-A093H-R127K-R159K-I181K	1.23
R014I-S076A-A093H-R127K-R159K-I181Q	1.14
R014I-S076A-A093H-R127K-R159K-I181T	1.15
R014I-S076D-A093S-R127K-R159K-I181T	1.10
R014I-S076E-A093T-R127K-R159K-I181K	1.28
R014I-S076N-A093H-R127K-R159K-I181Q	1.26

[0508]

표 9-3. TIDE®2005 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI Tide2005 세제 [성능 지수]
R014I-S076V-A093H- R127K-R159K-II81Q	1.22
R014I-S076V-A093S- R127K-R159K-II81K	1.27
R014K-S076A- A093S-R127K- R159K-II81T	1.21
R014K-S076E- A093H-R127K- R159K-II81K	1.19
R014K-S076I-A093S- R127K-R159K-II81T	1.14
R014K-S076T- A093H-R127K- R159K-II81K	1.11
R014K-S076T- A093H-R127K- R159K-II81T	1.23
R014K-S076V- A093H-R127K- R159K-II81K	1.11
R014L-S076A- A093H-R127K- R159K	1.34
R014L-S076A- A093H-R127K- R159K-II81Q	1.13
R014L-S076D- A093H-R127K- R159K-II81T	1.17
R014L-S076E- A093H-R127K- R159K-II81K	1.23
R014M-S076A- A093G-R127K- R159K-II81K	1.25
R014M-S076A- A093G-R127K- R159K-II81T	1.12
R014M-S076A- A093H-R127K- R159K-II81T	1.18
R014M-S076A- A093S-R127K- R159K-II81K	1.46

표 9-3. TIDE®2005 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI Tide2005 세제 [성능 지수]
R014M-S076A- A093S-R127K- R159K-II81T	1.17
R014M-S076A- A093T-R127K- R159K-II81Q	1.11
R014M-S076I- A093H-R127K- R159K-II81T	1.30
R014M-S076I-A093S- R127K-R159K-II81T	1.23
R014M-S076N- A093G-R127K- R159K-II81K	1.23
R014M-S076N- A093G-R127K- R159K-II81T	1.24
R014M-S076N- A093H-R127K- R159K-II81T	1.39
R014M-S076N- A093S-R127K- R159K-II81T	1.28
R014M-S076T- A093H-R127K- R159K-II81K	1.28
R014M-S076V- A093G-R127K- R159K-II81Q	1.17
R014M-S076W- A093H-R127K- R159K-II81K	1.14
R014M-S076Y- A093H-R127K- R159K-II81K	1.29
R014M-S076Y- A093H-R127K- R159K-II81T	1.14
G012D-R035E- D184N	1.13
G012D-R035E- N067K	1.24

[0509]

[0510]

추가 실험에서, 하기 결과가 수득되었다. 본 실험에서, 참조로서 0.5 ppm 야생형 ASP 와 변이체를 비교하였다. 하기 표에서의 결과는 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (>1.1 성능 지수) 을 갖는 변이체에 대해 제공된다.

표 9-4. TIDE® SNOW A 세제 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI TIDE-SNOWA 세제 [성능 지수]
R14I-A64K-R123F- R159F-D184T	1.27
R14I-A64K-R123F- R159F-D184T	1.45
R14I-N24Q-A64K- G78D-R123F- R159K-D184T	1.38
R14I-N24Q-A64K- N67S-R123F- R159F-D184T	1.34
R14I-N24Q-A64K- N67A-R123F- R159K-D184T	1.40
R14I-N24A-A64K- N67S-G78D- R123F-R159K- D184T	1.31
R14I-A64K-R123F- D184T	1.45
R14I-N24A-A64K- R123F-R159N- D184T	1.47
R14I-N24Q-R35D- A64K-N67S- R123F-R159K- D184T	1.23
R14I-N24Q-A64K- N67A-R123F- R159K-D184T	1.45
R14I-N24E-A64K- R123F-R127K- R159K-D184T	1.23
R14I-N24A-A64K-	1.65

표 9-4. TIDE® SNOW A 세제 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI TIDE-SNOWA 세제 [성능 지수]
R123F-D184T	
R14I-A64K-R123F- R127K-R159F- D184T	1.48
R14I-A64K-R123F- R159N-D184T	1.38
R14I-A64K-R123F- R159K-D184T	1.66
R14I-A64K-R123F- R127Y-R159K- D184T	1.11
R14I-N24Q-A64K- R123F-R127Q- R159K-D184T	1.25
R14I-A64K-R123F- R159K-D184T	1.55
R14I-N24Q-R35D- A64K-N67S- R123F-R159K- D184T	1.22
R14I-A64K-N67S- G78D-R123F- R127K-R159K- D184T	1.48
R14I-N24Q-A64K- N67A-R123F- R127K-R159K- D184T	1.67
R127K-R159K	1.53
N24A-N67S-R159K	1.55
N24A-N67A- R159K	1.58

[0511]

[0512]

부가적인 실험에서, 하기 결과가 수득되었다. 하기 표에 제시된 변이체는 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (>1.1 성능 지수) 을 나타내었다.

표 9-5. TIDE®-SNOW 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI TIDE-SNOW 세제 [성능 지수]
R14I-A63K-G78D-R123F-D184T	1.39
R14I-A63K-N67A-R123F-D184T	1.50
R14I-A63K-N67L-R123F-D184T	1.23
R14I-A63K-N67S-R123F-D184T	1.48
R14I-A63K-R123F-R159F-D184T	1.75
R14I-A63K-R123F-R159K-D184T	1.70
R14I-A63K-R123F-R159N-D184T	1.67
R14I-A63K-R123K-D184T	1.40
R14I-A63K-R123Q-D184T	1.44
R14I-A63K-R123Y-D184T	1.25
R14I-A64K-G78D-T86K-T116E-R123F	1.26
R14I-A64K-N67A-T86K-T116E-R123F	1.66
R14I-A64K-N67L-T86K-T116E-R123F	1.19
R14I-A64K-T86K-T116E-R123F-R159K	1.54
R14I-A64K-T86K-T116E-R123K	1.70
R14I-G54D-A63K-R123F-D184T	1.13
R14I-G54D-A64K-T86K-T116E-R123F	1.11
R14I-N24A-A63K-R123F-D184T	1.47
R14I-N24A-A64K-T86K-T116E-R123F	1.56
R14I-N24A-S76V-A93S-R127K-R159K-II81K	1.15
R14I-N24E-A63K-R123F-	1.36

표 9-5. TIDE®-SNOW 에 대한 세정 성능 결과	
변이체	BMI TIDE-SNOW 세제 [성능 지수]
D184T	
R14I-N24E-A64K-T86K-T116E-R123F	1.26
R14I-N24Q-A63K-R123F-D184T	1.47
R14I-N24Q-A64K-T86K-T116E-R123F	1.57
R14I-N24Q-S76V-A93S-R127K-R159K-II81K	1.43
R14I-N24T-A63K-R123F-D184T	1.57
R14I-N24T-A64K-T86K-T116E-R123F	1.38
R14I-N24TS76V-A93S-R127K-R159K-II81K	1.13
R14I-N67SS76N-A93H-R127K-R159K-II81Q	1.17
R14I-R35E-A63K-R123F-D184T	1.55
R14I-R35K-A63K-R123F-D184T	1.20
R14I-S76V-A93S-R127K-R159F-II81K	1.12
R14I-S76V-A93S-R127K-R159N-II81K	1.31
R14I-S76V-A93S-R127Y-R159K-II81K	1.30
R14M-N24T-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	1.11
R14M-N67S-S76N-A93G-R127K-R159K-II81K	1.22
R14M-S76N-A93G-R127K-R159F-II81K	1.41
R14M-S76N-G78D-A93G-R127K-R159K-II81K	1.20

[0513]

실시예 10

[0514]

다중 치환된 변이체의 얼룩 제거 성능

[0515]

본 실시예에서는, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 얼룩 제거력을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다. 본 실험에서, 하기 프로토콜 및 재료가 사용되었다.

[0516]

먼저, 1000 ml 탈이온화수에 11.020 g/L 의 염화칼슘 2 수화물 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) MW 147.01 g/몰 및 5.08 g/L 의 염화마그네슘 6 수화물 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) MW 203.3 g/몰을 용해시켜 첫번째로 10,000 ppm 저장 용액 (3/1 $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$) 을 제조함으로써 105 ppm 물 (~ 6 gpg) 을 제조하였다. 989.50 ml 의 탈이온화수로 10.50 ml 의 10,000 ppm 저장액을 희석시켜 105 ppm 용액을 제조하였다.

[0517]

7 리터의 105 ppm 물에 11.2 gm TIDE®-2005 를 용해하여 105 ppm 물에서 TIDE® 2005 세제 용액 (1.6 gm/L) 을 제조하였다.

[0518]

본 실험에 사용된 혈액-우유-잉크 (Blood-Milk-Ink: BMI) 에 오염된 천조각 EMPA 116 (11 x 8 cm), EMPA 117 (11 x 8 cm) (모두 EMPA Testmaterialien AG) 및 잔디에 오염된 천조각 EMPA164 (10 x 7.5 cm) (EMPA Testmaterialien AG) 및 잔디 매질에 오염된 Equest (10 x 7.5 cm) (Warwick Equest Limited) 를 네임펜 (오염된 면에) 을 사용하여 숫자를 매겼다. Tristimulus Minolta Meter CR-300 (Minolta) 을 사용하여 천조각의

[0519]

오염된 면을 측정하고, 백색 배경에서 식 L (L*a*b), D65 Std. Illuminate 를 사용하여 분석하였다. 천조각 당 관독을 3 회 수행하였다. 잔디 얼룩은 빛에 매우 민감하므로, 잔디에 오염된 천조각을 사용하기 전까지 덮어서 암실에 저장하였다. 모든 세정 성능 시험을 이중으로 수행하였다.

[0520] 시험 동안, 여분의 밸러스트 (ballast) (좀더 기계적인 작용) 를 사용하였다. 상기 밸러스트는 하나의 비이커에 넣은 2 조각의 10 x 10 cm EMPA 221 (미오염된 면직물, EMPA Testmaterialien AG) 을 포함하였다. 이들 EMPA 221 천조각에는 숫자를 매기거나 측정하지 않았다.

[0521] 6 개의 바구니 (pot), 벤치 모델 Tergotometer (TOM) Model 7243S (United States Testing) 를 사용하여 세탁 세정 성능 시험을 수행하였다. 온도를 15°C 또는 60°F 로 조정하였다. TOM 의 내부의 절반을 얼음으로 채웠다. 세정 시간은 12 분으로 설정하였다. 1 리터의 세제 용액으로 시험 비이커를 채웠다 (상기 기재된 바와 같이 105 ppm 물로 제조됨). 일단 용액이 15°C 또는 60°F 에 도달하면, TOM 를 100 rpm 으로 진탕하기 시작하였다. 그 다음 변이체 샘플을 하기 지시되는 바와 같이 혼합물에 참가하였다. 대조군으로서, 임의의 효소 샘플을 첨가하지 않은 TIDE® 2005 세제 용액 (Procter & Gamble) 을 사용하였다. 2 가지 상이한 농도 (즉, 0.55 ppm 및 2.75 ppm 에서) 에서 변이체를 시험하였다.

[0522] (동일한 오염물질의) 6 개의 천조각을 각 비이커에 하나씩 첨가하였다. 또한, 2 개의 EMPA 221 천조각을 첨가하였다. 예를 들어: BMI 에 오염된 천조각에 대해서는 3 개의 EMPA 116 및 3 개의 EMPA117 + 2 개의 EMPA 221 (총 중량은 대략 13.25 그램임), 또는, 잔디에 오염된 천조각에 대해서는 3 개의 EMPA 164 및 3 개의 잔디 매질에 오염된 Equest + 2 개의 EMPA 221 (총 중량은 대략 13.22 그램임). 그 다음 세정 시간은 12 분으로 재설정하였다. 12 분의 세정 후, 모든 EMPA 116 및 EMPA 117 천조각을 양동이에서 행구고, 모든 잔디 천조각은 흐르는 냉수로 3 분 동안 별도의 양동이에서 행구었다. 그 다음 EMPA 221 천조각은 폐기하였다. 천조각을 2 분 동안 탈수기에 넣었다 (EMPA 116 및 EMPA 117 천조각은 잔디에 오염된 천조각과 분리하여 건조시켰다). 이어서, 잔디에 오염된 천조각은 빛을 가하거나 다림질을 하지 않고 공기에서 건조시킨 반면, EMPA 116 및 EMPA 117 천조각은 다림질로 건조시켰다.

[0523] 건조 후, 천조각의 오염된 면을 백색 배경으로, 식 L (L*a*b), D65 Std. Illuminate 로 Tristimulus Minolta Meter CR-300 을 사용하여 천조각 당 3 회 관독하여 평가하였다. % 오염 제거는 다음 방정식을 사용하여 계산하였다:

[0524] $\% \text{오염 제거} = (\text{세정 후 } L \text{ 값} - \text{세정 전 } L \text{ 값}) / (L_0 \text{ 백색 면직물} - \text{세정 전 } L \text{ 값}) \times 100\%$

[0525] 각 개별 변이체의 얼룩 제거에 대한 측정치를 획득하기 위해, 각 변이체의 존재하에서의 오염 제거 % (델타 % SR) 로부터 임의의 변이체가 없는 TIDE® 2005 세제 용액에 의해 획득된 오염 제거 % 를 빼서 오염 제거 델타 % 를 계산하였다. 결과는 표 10.1 에 제시된다.

[0526] 부가적인 실험에서, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 얼룩 제거력을 시험하였다. 상기 기재된 시험 조건을 다음과 같은 변형을 하여 사용하였다. 본 시험에서, 25 리터의 105 ppm 물에 37.5 gm TIDE®2005 SNOW 를 용해시켜, 105 ppm 물 중에 TIDE®2005 SNOW 세제 용액 (1.5 gm/L) 을 제조하였다. 또한, EMPA 116 BMI 에 오염된 천조각을 10 x 7.5 cm 의 조각으로 절단하였다. EMPA 117 천조각을 EMPA 116 고정된 천조각 (CFT) 으로 대체하고, 또한 10 x 7.5 cm 의 조각으로 절단하였다. 본 실험에서는 EMPA 164 천조각은 사용하지 않았다. 변이체를 0.55 ppm 의 한가지 농도에서 시험하였다. 6 개의 천조각 (즉, 6 개의 EMPA 116, 또는 6 개의 고정된 EMPA 116 또는 6 개의 Equest) 을 각 비이커에 하나씩 첨가하였다. 또한, 2 개의 EMPA 221 천조각을 첨가하였다. 대조군으로서, 임의의 효소 샘플을 첨가하지 않은 TIDE® 2005 SNOW 세제 용액 (Procter & Gamble) 을 사용하였다. 모든 세정 성능 시험을 4 회 중복으로 수행하였다. 결과 (평균 델타 % SR, 표준 편차 (STD) 및 반복 횟수 (n)) 는 도 6 에 제시한다.

표 10.1 변이체 / 용량	EMPA 116 Δ % S.R. (n=6)	EMPA 117 Δ % S.R. (n=6)	Equest Grass Δ % S.R. (n=6)	EMPA 164 Δ % S.R. (n=6)
ASP / 0.55 ppm	5.2 ± 1.2	4.9 ± 2.4	-4.3 ± 4.3	1.5 ± 1.1
ASP / 2.75 ppm	9.7 ± 1.4	10.7 ± 2.8	-1.8 ± 5.4	3.1 ± 1.6
R123L-R127Q-R179Q / 0.55 ppm	6.0 ± 1.5	8.5 ± 2.1	1.7 ± 3.7	2.1 ± 1.2
R123L-R127Q-R179Q / 2.75 ppm	11.3 ± 1.5	14.0 ± 2.7	1.1 ± 5.0	5.4 ± 1.4
G12D-R35H / 0.55 ppm	7.0 ± 1.1	7.9 ± 1.9	-2.2 ± 5.0	2.5 ± 1.3
G12D-R35H / 2.75 ppm	10.1 ± 1.7	14.4 ± 1.9	3.2 ± 3.8	4.5 ± 1.0
G12D-R35E / 0.55 ppm	8.2 ± 1.2	10.0 ± 2.1	1.3 ± 5.4	2.9 ± 1.4
G12D-R35E / 2.75 ppm	10.6 ± 1.4	16.6 ± 2.1	4.3 ± 4.2	5.4 ± 1.4
R35E-R123L-R127Q-R179Q / 0.55 ppm	6.1 ± 1.2	6.8 ± 2.1	0.4 ± 4.1	1.0 ± 1.4
R35E-R123L-R127Q-R179Q / 2.75 ppm	8.8 ± 2.1	12.7 ± 1.8	4.7 ± 4.3	1.7 ± 1.4

[0527]

[0528]

또다른 실험 세트에서, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 얼룩 제거력을 시험하였다. 상기 기재된 시험 조건을 다음과 같은 변형을 하여 사용하였다. 본 시험에서, 25 리터의 105 ppm 물에 37.5 gm TIDE®2005 SNOW 를 용해시켜, 105 ppm 물 중에 HEPES 완충액을 함유하는 TIDE®2005 SNOW 세제 용액 (1.5 gm/L) 을 제조하였다. 그 다음, 30 g Hepes (= 5 mM; C₈H₁₈N₂O₄S) 를 첨가하고, 상기 용액을 교반하고, ± 19 ml 4N NaOH 로 pH 를 7.8 로 조정하였다. 상기 용액은 실온에서 36 시간 동안 저장할 수 있음을 주의하였다. 본 실험에서, 오직 10 x 7.5 cm 의 EMPA 116 BMI 에 오염된 천조각 및 10 x 7.5 cm 의 Equest 잔디 매질에 오염된 천조각을 사용하였다. 변이체를 0.55 ppm 의 한가지 농도에서 시험하였다. 6 개의 천조각 (6 개의 EMPA 116, 또는 6 개의 Equest 잔디 매질에 오염된 천조각) 을 각 비이커에 하나씩 첨가하였다. 또한, 2 개의 EMPA 221 천조각을 첨가하였다. 대조군으로서, 임의의 효소 샘플을 첨가하지 않은 HEPES 완충액을 함유한 TIDE® 2005 SNOW 세제 용액 (Procter & Gamble) 을 사용하였다. 모든 세정 성능 시험을 4 회 중복으로 수행하였다. 결과 (평균 □% SR, 표준 편차 (STD) 및 반복 횟수 (n)) 는 도 7 에 제시한다.

[0529]

상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

[0530]

실시예 11

[0531]

저 pH 에서 시험된 다중 치환된 돌연변이의 얼룩 제거 성능

[0532]

본 실시예에서는, 다양한 다중 치환된 ASP 변이체의 얼룩 제거 성능을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다. 본 실험에서, 사용된 프로토콜은 상기 실시예 1 에 기재되어 있다. 하기 표는 야생형 ASP 의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (1.1 성능 지표) 을 가진 변이체에 대한 각 변이체에서의 돌연변이를 포함하는 변이체를 제공한다.

[0533]

표 11-1. 저 pH 에서의 얼룩 제거 성능	
변이체	BMI 저 pH [성능 지수]
G54E-R14L	1.40
N24D-R127Y-R159V	1.61
N24E-R127S	1.43
N24E-R159C	1.14
N24F-R159G	1.42
N24F-R159G-G54E	1.98
N24F-R159L-R123V	1.61
N24G-R127Y	1.34
N24H-R159Y-T46I	1.34
N24I-R127S	1.21
N24I-R127V-R14V	1.12
N24L-R159S	1.37
N24S-R159A	2.48
N24V-R127M-	1.33

표 11-1. 저 pH 에서의 얼룩 제거 성능	
변이체	BMI 저 pH [성능 지수]
R159V	
N24V-R127S-R159H	1.60
N24V-R159L	1.41
N24Y-G54A	1.11
N24Y-R127L	1.37
N24Y-R127S	1.14
N24Y-R127V	1.22
N24Y-R159F	1.29
R127A-R159F	1.12
R127H-R159Q	1.78
R127H-R159T-S185F	1.66
R127M-R159V	1.70
R127S-R159G	1.21
R127S-R159L	1.27

표 11-1. 저 pH 에서의 얼룩 제거 성능	
변이체	BMI 저 pH [성능 지수]
R127T-R159F	1.28
R127V-R159G	1.36
R127Y-R159L	2.14
R14A-N24K-R127S	1.41
R14A-R127Y- R159W	1.17
R14G-N24S-R127C	1.10
R14G-R127G	1.17
R14L-N24D	1.73
R14L-N24Y	1.19
R14L-R123L	2.11
R14L-R127S	1.47
R14L-R127V	1.18
R14L-R127Y	1.78
R14L-R159G	1.51
R14L-R159S	1.52
R14L-T39P	1.50
R14M-N24L-R159S- R123V	1.15
R14M-R159F	1.18
R14M-R159W	1.36
R14Q-R123F	1.58
R14S-N24E-R127W	1.31
R14S-N24V	1.11
R14S-N24Y	1.12
R14T-N24T-R127Q	1.38
R14T-R127Y	1.98
R14V-N24D-R127C	1.28
R14V-N24G-P189S	1.14
R14V-N24L-R127F	1.14
R14V-R127A	1.55
R14V-R159F	1.43
R14V-R159W	1.24
R14W-N24A	1.10
R14W-R123L	1.19
R14W-R123V	1.40
R14W-R159V	1.15
R159V-G49D	1.67
R159V-R123G	1.20
N024E-G049A- A093H-R127K- A143N-R159K- I181Q	1.29
N024E-G049A- A093S-S099D- R127K-A143N- R159K-I181Q	1.11
N024Q-G049A-	1.12

표 11-1. 저 pH 에서의 얼룩 제거 성능	
변이체	BMI 저 pH [성능 지수]
A093S-S099A- R127K-A143N- R159K-I181T	
N24A-G54E-S76D- A93G-R127K- R159K	1.41
N24E-A93G-R127K- R159K	1.32
N24E-G54L-S76E- A93G-R127K- R159K	1.15
N24E-G54Q-A93S- R127K-R159K	1.46
N24E-S76D-A93T- R127K-R159K	1.35
N24H-G54E-A93G- R127K-R159K	1.10
N24L-S76T-A93G- R127K-R159K	1.24
N24M-A93S-R127K- R159K	1.23
N24M-A93T-R127K- R159K	1.18
N24M-G54E-A93H- R127K-R159K	1.35
N24M-G54E-S76N- A93S-R127K-R159K	1.36
N24M-S76V-A93H- R127K-R159K	1.16
N24Q-A93G-R127K- R159K	1.10
N24Q-G54D-S76L- A93G-R127K- R159K	1.11
N24Q-G54I-S76T- A93G-R127K- R159K	1.10
N24Q-G54Q-A93G- R127K-R159K	1.10
N24Q-S76A-A93G- R127K-R159K	1.12
N24T-G54Q-S76N- A93G-R127K- R159K	1.19
N24T-G54Q-S76V- R127K-R159K	1.20
N24T-S76I-R127K- R159K	1.14
N24W-A93G-	1.20

[0534]

표 11-1. 저 pH 에서의 얼룩 제거 성능	
변이체	BMI 저 pH [성능 지수]
R127K-R159K	
N24W-G54D-A93H- R127K-R159K	1.21
R014I-S076A- A093G-R127K- R159K-I181T	1.21
R014I-S076A- A093H-R127K- R159K-I181Q	1.16
R014I-S076D- A093H-R127K- R159K-I181Q	1.10
R014I-S076D- A093H-R127K- R159K-I181T	1.27
R014I-S076D- A093S-R127K- R159K-I181T	1.31
R014I-S076E- A093S-R127K- R159K-I181Q	1.46
R014I-S076E- A093T-R127K- R159K-I181K	1.20
R014I-S076N- A093H-R127K- R159K-I181Q	1.13
R014L-S076A- A093H-R127K- R159K	1.21
R014L-S076A- A093H-R127K- R159K-I181Q	1.15
R014L-S076D- A093H-R127K-	1.16

표 11-1. 저 pH 에서의 얼룩 제거 성능	
변이체	BMI 저 pH [성능 지수]
R159K-I181T	
R014M-S076A- A093G-R127K- R159K-I181T	1.30
R014M-S076A- A093S-R127K- R159K-I181K	1.35
R014M-S076A- A093S-R127K- R159K-I181T	1.15
R014M-S076A- A093T-R127K- R159K-I181Q	1.28
R014M-S076D- A093S-R127K- R159K-I181T	1.31
R014M-S076E- A093H-R127K- R159K-I181T	1.12
R014M-S076E- A093S-R127K- R159K-I181T	1.16
R014M-S076N- A093G-R127K- R159K-I181K	1.12
R014M-S076N- A093G-R127K- R159K-I181T	1.19
R014M-S076N- A093H-R127K- R159K-I181T	1.15
R014M-S076N- A093S-R127K- R159K-I181T	1.32

[0535]

[0536]

액체 세제를 사용하는 추가적인 실험에서, 하기 결과가 수득되었다. 하기 표에 제시된 변이체는 야생형의 활성 + 1 표준 편차보다 큰 활성 (>1.1 성능 지수) 을 나타내었다.

하기 표에 제시된 변이체는 야생형의

표 11-2. 저 pH 에서의 세정 성능	
변이체	BMI 저 pH 세제 [성능 지수]
T36S-R127Q-R159E	1.24
S15E-R35E	1.15
S15E-R35D	1.20
S15E-R159E	1.24
S15E-R127Q	1.39
S15E-R123Q	1.22
S15E-R123E	1.38
R79T R127Q R179Q	1.23
R35H-R159E	1.37
R35F R61S R159Q	1.39
R35F R159Q	1.49
R35D-R127Q	1.56
R16Q R79T R159Q	1.42
R179Q	
R16Q R79T R123L	1.62
R16Q R79T	1.59
R16Q R35F	1.29
R16Q R159Q R179Q	1.31
R16Q R159Q	1.26
R14Q-T121E	1.37
R14Q-R35E	1.36
R14Q-R35D	1.27
R14Q-R123Q	1.33
R14L R79T	1.59
R127Q-R159E	1.34
R127Q R159Q	1.45
R123Q-R159E	1.51
R123L R159Q	1.58
R123F-R159E	1.77

표 11-2. 저 pH 에서의 세정 성능	
변이체	BMI 저 pH 세제 [성능 지수]
G12D-S15E	1.71
G12D-R35H-R159E	1.74
G12D-R35H-R123Q	1.89
G12D-R35H	2.38
G12D-R35E	1.85
G12D-R35D	1.68
G12D-R159E	1.32
G12D-R14Q-R35H	1.44
G12D-R14I-R35H	1.54
G65Q-R127A-R159K	1.10
R127A-R159K	1.35
R14I-G65Q	1.38
R14I-G65Q-N67L-R159K	1.14
R14I-G65Q-R127A-	1.43
R14I-G65Q-R127A-R159K	1.27
R14I-G65Q-R159K	1.38
R14I-R127A	1.33
R14I-R127A-R159K	1.44
R14I-R159K	1.32
R14I-R35F	1.13
R14I-R35F-G65Q	1.16
R14I-R35F-R159K	1.28
R14I-S76V	1.40
R35F-R127A-R159K	1.17

[0537]

[0538]

상기 결과로부터 제시되는 바와 같이, 다양한 다중 치환된 변이체는 상기 검정법 시스템에서 야생형 ASP 보다 나은 성능을 보였다.

[0539]

실시예 12

[0540]

자동 식기세정기에서의 ASP 변이체의 세정 성능

[0541]

본 실시예에서는 기재된 프로테아제-민감성 얼룩에 대해 벤치마크 세린 프로테아제 ("프로테아제 B") 와 비교하여 Automatic Dish Washing (ADW) TABLET ACTION PACK® 세제에서의 ASP 변이체의 세정 성능을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다. 하기 표에서 제시되는 바와 같이, ASP 변이체는 프로테아제 B 보다 얼룩을 훨씬 더 많이 제거한다.

[0542]

24 웰 플레이트로 마이크로-세정 시험을 수행하였다. 스테인레스 스틸 디스크를 망치 또는 펀치를 사용하여 펀치를 뚫었다. 초기 중량을 측정하기 위해 디스크를 세정하고 칭량하였다. 달걀 얼룩을 하기 기재되는 바와 같이 제조하였다 ("스크램블 달걀 제조" 및 "달걀 노른자 제조"). 그 다음, 50 μ L 의 제조된 달걀을 각 디스크에 분배하였다. 제조물을 실온에서 30 분 동안 둔 다음, 오븐에서 80℃ 로 2 시간 동안 구웠다. 디스크를 실온으로 냉각시켰다. 오염 후, 디스크의 오염된 중량을 측정하기 위해 디스크를 칭량하였다. 오염된 디스크를 NUNC LON® 24 웰 폴리스티렌 플레이트 내에 삽입하였다. 효소 제품 없이 적절한 양의 ADW (예를 들어, Powder 4500 ppm) 를 1 L 의 11 gpg 물에 40℃ 에서 완전히 혼합하여 자동 식기 세척 제품 용액을 제조하였다. 188.57 g 의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 86.92 g 의 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 1 L DI 물에 혼합하여 경도 용액을 제조하였다. 상기 시험에서, 2 mL 의 미리 가온된 ADW 용액을 각 웰에 55℃ 에서 첨가하였다. 그 다음 적절한 양의 효소를 각 웰에 첨가하였다. 일부 구현예에서, 시험을 4 회 중복으로 6 개 교차 (across) 를 사용하여 수행하였으며, 다른 구현예에서는 시험을 6 회 중복으로 4 개 교차를 사용하여 수행하였다. 그 다음 플레이트를 필름으로 밀봉하였다. 플레이트를 미리 가온된 인큐베이터/셰이커에 두고, 플레이트를 집게로 잠그놓았다. 플레이트를 적절한 온도 (예를 들어, 유럽 세정 조건에 대해서는 55℃) 에서 30 분 동안, 180 RPM 으로 세정하였다. 세정 후, 플레이트를 온수조에 담구어서 조심스럽게 3 회 행구었다. 플레이트로부터 디스크를 제거하고, 80℃ 의 오븐에서 1 시간 동안 건조시켰다. 일단 건조되면, 세정된 디스크 중량을 측정하기 위해 디스크를 칭량하였다. 대략의 % 제거를 산출하는 중량측정 평가는 다음과 같이 계산하였다:

[0543] % 제거 = (오염된 중량-세정된 중량)/(오염된 중량-깨끗한 중량) x 100

[0544] 제거 지수 = % 제거 / Benchmark Protease (프로테아제 B) 에 의한 % 제거

[0545] **스크램블 달걀 제조**

[0546] 시험 효소(들) 을 포함하는 프로테아제 및/또는 세제 조성물의 시험에 사용하기 위한 달걀을 다음과 같이 제조하였다. 먼저, 100 ml 의 10% 유지방 우유를 3 개의 전체 달걀과 혼합하였다. 상기 혼합물이 약간 흐를 정도까지 혼합물을 지속적으로 교반하면서 조리하였다. 그 다음, 추가로 40 ml 우유를 첨가하고, 혼합물을 덩어리가 없는 부드러운 상태가 될 때까지 핸드 믹서 또는 블렌더로 혼화시켰다. 달걀 혼합물을 오염 전 실온으로 냉각시켰다.

[0547] **달걀 노른자 제조**

[0548] 핫 플레이트에서 60℃ 로 온도 탐침을 고정하여 수조를 가열하였다. 비이커에 펄프 거름 장치 (pulp strainer) 를 두었다. 달걀 노른자를 제조하기 위해, 6 내지 9 개의 노른자를 깨고, 노른자를 흰자로부터 분리하였다. 노른자에 존재하는 임의의 잔여물을 제거하더라도 난황낭은 파손하지 않았다. 노른자를 냉수로 부드럽게 행구었다. 노른자를 거름 장치 및 비이커에서 부드럽게 파손하였다. 모든 노른자가 걸러지면, 걸러진 노른자가 담긴 비이커를 수조에 두었다. 노른자를 60℃ 에서 30 분 동안 교반하였다. 수조로부터 노른자를 제거하고 냉수조에 30 분 동안 두었다. 표면에 형성된 임의의 막을 조심스럽게 제거하였다.

[0549] **스테인레스 슬라이드 (1 x 3 인치) 를 사용하는 달걀 얼룩의 제조**

[0550] 각 금속 슬라이드를 스크램블 달걀 또는 달걀 노른자 제조물 (상기 기재된 바와 같이 제조됨) 에 담그고, 각 슬라이드에 대략 동일한 양의 달걀이 있도록 1 회 가볍게 두드린다. 슬라이드의 뒷면을 티슈로 닦아낸다. 그 다음 슬라이드를 2 개의 오븐 선반에 번호 순서대로 둔다. 실온에서 30 분 동안 슬라이드를 건조되도록 방치하였다.

[0551] 그 다음 슬라이드를 80℃ 에서 (+/- 1℃) 2 시간 동안 조리하였다 (상부 및 하부 선반은 1 시간 후에 180° (+/- 1℃) 회전 및 교환되었다). 냉각된, 오염된 슬라이드를 1-96 순서로 칭량하였다.

[0552] 세정을 위해, 8 개의 얼룩진 슬라이드를 세척기의 상부 선반 및 하부 선반 모두에 두었다. 예비 세정 및 주 세정은 예비 세정을 위해 40 ml 및 주 세정을 위해 60 ml 의 Whirlpool 840 컵 용량에 기반하였다. 전형적으로 하나의 시험에서, 4 개의 GE 500 기계를 사용하여 4 개의 제품을 수행하였다. 시험 사이클을 위해, 오염된 슬라이드를 기계에 적재하고, 시험 제품을 예비 세정 및 주 세정 컵에 두었다. 물 온도를 120°F 로 설정하고, 기계를 표준 세정 사이클로 작동시킨다. 슬라이드를 최종 행굼 사이클 종료시 칭량을 위해 기계로부터 제거하였다. 슬라이드에는 건조 사이클을 진행하지 않았다. 4 번째 반복 종료에 의해, 각 제품은 각 기계에서 1 회씩 수행되었다. 모든 4 회 반복을 하루에 수행하였다. 다음 날, 상기 동일한 절차를 새롭게 오염된 기질을 사용하여 반복하여, 제품 당 총 8 회 반복하여, 최종 결과를 위해 평균을 내었다. 대략의 % 제거를 산출하는 중량측정 평가는 다음과 같이 계산하였다:

[0553] % 제거 = (오염된 중량-세정된 중량)/(오염된 중량-깨끗한 중량) x 100

[0554] 제거 지수 = % 제거 / Benchmark Protease (프로테아제 B) 에 의한 % 제거

[0555] 상기 성능 시험 결과를 하기 표 12-1 에 제시한다:

표 12-1. 24 웰 스크리닝 중의 프로테아제 B 대 얼룩 제거 지수		
효소	스크램블 달걀	달걀 노른자
WT ASP	101	100
R14N-R127K-R159L	134	120
R14I-A64K-T86K-N112E-R123F-D184T	126	124
G12D-R35E-G63R-R79K-T109M	124	113
R14L	128	123
G12D-R35E	120	138
R14M-S76D-A93H-R127K-R159K-I181K	123	103

[0556]

[0557] 실시예 13

[0558] **분말 세탁 세제 중의 ASP 변이체의 세정 성능**

[0559] 본 실시예에서는 세탁 분말 세제 ARIEL® 중의 ASP 변이체의 세정 성능을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다. 본 실험에서는 변이체의 성능을 Real Item Cleaning (RIC) 에 대한 벤치마크 세린 프로테아제 (예를 들어, "프로테아제 C") 와 비교하였다.

[0560] 다음과 같은 조건을 사용하는 Meile 세탁기를 사용하여 시험을 수행하였다: 온도 40℃, 경도 21 gpg, 세제 7300 ppm, 프로테아제 0.88 ppm, RI 0.75 kg, 총 밸러스트 및 RI 2.5 kg, 물 13 L, 세정 시간 20 분, 행균 시간 3 x 5 분.

[0561] 본 실험에서, 킹사이즈 및 퀸사이즈 이불, 및 깨끗한 양말 (J&R Coordinating Service) 을 깨끗한 밸러스트에 대해 넷으로 나누었다. 또한, 양말, 티셔츠, 베게커버, 수건을 포함하는 Consumer Real Items (RI) 을 시험하였다. 효모를 포함하는 오염물 및 AS1 (Artificial Soil 1; Equest) 을 본 실험을 위해 사용한다. AS1 의 조성은 하기 표 13-1 에 제시된다.

표 13-1. AS1 의 조성	
성분	%
인공 피지	14.5
차 (PG Tips)	6.5
커피 (Nescafe)	4.0
오렌지 쥬스	12.0
토마토 쥬스 (Heinz)	13.0
잔디	4.5
초콜렛 (Heinz Baby)	7.5
농은 버터	2.5
조리용 오일	14.0
ETC 점토	5.0
NTC 점토	5.0
진공청소기 분진	4.0
메이크업	7.5

[0562]

[0563] 시험을 위해 동일한 의복 크기를 확보하도록 의복을 잘랐고, 의복은 균일한 오염 정도에 대해 선택되었다. 2 개의 절반을 패넬화 쌍 순서로 지정한다 (예를 들어, 의복의 좌/우).

의복 1 의복 2 의복 3 의복 4 의복 5 의복 6 의복 7 의복 8
A B B A B A A B B A A B A B B A

[0564]

[0565] "A" 로 표시된 의복은 ASP 변이체로 세정하는 반면, "B" 로 표시된 의복은 프로테아제 C 로 세정한다. 시험을 4 x 4 x 2 회 수행하였다 (RI 의 2 회 내부 중복으로 4 개의 기계에서 각 처리를 반복하였다).

[0566] **시험 절차**

[0567] 깨끗한 넷으로 나뉜 침대 이불 및 RI 의 밸러스트를 조합하여 총 하중 2.5 kg 으로 만들고, 작동되는 패넬 정면에 "21 gpg" 배출구가 있는 매뉴얼 Meile 세탁기 내에 넣을 준비를 한다. 그 다음 세탁기를 작동시켰다. 온도를 40℃ 및 짧은 세탁 사이클로 설정한다. 그 다음, 밸러스트 및 RI 를 세탁기에 첨가한다. 또한, 20 g AS1 및 17g Bakers 효소로 오염된 깨끗한 양말을 각각 중복으로 첨가한다. 그 다음, 세제 (95 g) 를 세탁기 세제 트레이에 첨가하고, 사이클을 작동시킨다. 일단 세제가 트레이에서 왈칵 쏟아져나오면, 첨가되는 임의의 액체를 첨가한다. 그 다음 세탁기를 사이클 동안 수행한다. 세정 사이클의 완료시, 내용물을 건조기로 옮기고, 30 분 동안 건조시킨다. 그다음 항목들을 가시적으로 등급화하여, LSG 프로그램에서의 PSU 결과 및 참조 번호를 제공한다.

[0568] **시험 등급화**

[0569] 전체 시험을 시험 항목의 72 시간의 세정 및 건조를 단일 세션으로 하여 등급화한다. 분리한 항목 의류를 패넬실에 늘어놓고, Scheffe 스케일을 이용하여 3 명 이상의 판단자에 의해 등급화된다. 추가적으로, 얼룩 A 대 B 는 2 명 이상의 판단자에 의해 등급화된다.

[0570] **결과 취급**

[0571] 세정 시험 소프트웨어로 설정된 휴대용 Psion 에 등급을 입력한다. 모든 분리한 항목의 등급화가 완료되면,

데이터를 평균 PSU 등급, A 와 B 처리 사이의 % 선호성, 및 각 의복에 대한 LSD 가 계산되는 개인 컴퓨터로 옮긴다. 제품간의 유의한 차이는 90% 의 신뢰 한계로 계산한다.

[0572] PSU 등급화 시스템은 2 개의 제품 (제형) 을 비교하는데 사용된다. 2 개의 제형은 성능을 시험한다 (예를 들어, 세정 후 얼룩 잔여물). 본 실험에서 양쪽 제품 (예를 들어, 제품 A 및 제품 B) 로 세정된 여러 섬유를 비교한다. 2 명 이상의 판단자가 등급화를 하며, 이때 하기 Schelle 스케일을 사용하였다:

[0573] 0: 선호감 없음

[0574] 1 : 본 제품이 약간 더 나은 것으로 생각한다 (불확실)

[0575] 2: 본 제품이 약간 더 낫다

[0576] 3: 본 제품이 낫다

[0577] 4: 본 제품이 훨씬 더 낫다

[0578] 실시예 14

[0579] ASP 변이체의 저장 안정성

[0580] 본 실시예에서는 WT ASP 와 비교하여 액체 TIDE® 세제에서 시험된 다양한 ASP 변이체의 저장 안정성을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다. 변이체 및 WT ASP 의 프로테아제 활성을 Hitachi 911 Automatic Analyzer 를 사용하여 시험하였다. 본 시험에서 숙시닐-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-니트로아닐리드 (pNA) 를 프로테아제 활성 평가를 위한 기질로서 사용하였다. 본 시험에서, 말단 카르복실 아미드 결합은 p-니트로아닐린을 산출하는 활성 프로테아제에 의해 분할된다. 415 nm/450 nm 에서 관측되는 수득 황색조의 강도는, SAVINASE® 프로테아제 표준으로 보정되는 샘플 중의 프로테아제의 활성과 비례하였다.

[0581] 하기 표에서 제시되는 바와 같이, WT ASP 에 비해서 조작된 변이체의 저장 안정성은 유의하게 개선되었다. 본 표에서, "유지된 활성 %" 는 하기 식: 유지된 활성 % = 활성 / 초기 활성 x 100% 을 사용하여 측정되었다.

표 14-1. 90°F, 액체 TIDE® 중에서 28 일 저장 동안 유지된 활성							
	초기	1 일	4 일	7 일	14 일	21 일	28 일
WT ASP	100%	91%	32%	0	0	0	0
R18	100%	99%	41%	0	0	0	0
G12D-R35H	100%	100%	100%	100%	97%	92%	87%
G12D-R35E	100%	100%	100%	100%	100%	97%	94%
R35E	100%	100%	100%	96%	87%	79%	72%
R35E-R18	100%	100%	100%	94%	82%	70%	61%
R35D	100%	100%	100%	86%	71%	56%	45%

[0582]

[0583] 실시예 15

[0584] ASP 세정 활성의 측정

[0585] 본 실시예에서는, 다양한 조건, 뿐 아니라 다양한 세정 조건의 특성 하에서 ASP 의 세정 활성을 측정하기 위해 수행된 실험이 기재되어 있다

[0586] 세제 제형, 세정수 부피, 세정수 온도 및 세정 시간의 변화를 포함하는 다양한 세정 조건이 있다. 그러므로, 프로테아제와 같은 세제 성분은 불리한 환경 조건 하에서 허용되고 기능할 수 있어야만 한다. 예를 들어, 상이한 영역에서 사용되는 세제 제형은 세정수에 존재하는 관련 성분의 농도가 상이하다. 예를 들어, 유럽 세제는 전형적으로 세정수에 약 3000-8000 ppm 의 세제 성분이 있는 반면, 일본 세제는 전형적으로 세정수에 800 미만 (예를 들어, 667 ppm) 의 세제 성분이 있다. 북미, 특히 미국에서는, 세제는 전형적으로 약 800 내지 2000 (예를 들어, 975 ppm) 의 세제 성분이 세정수에 존재한다.

[0587] 남미 세제는 일반적으로 고 비누 인산염 세척강화제 세제이며, 남미에서 사용되는 세제의 범위는 1500 내지 6000 ppm 범위의 세제 성분이 세정수에 존재하므로 중간 및 고 세제 농도 모두라고 볼 수 있다. 브라질 세제에는 전형적으로 대략 1500 ppm 의 세제 성분이 세정수에 존재한다. 그러나, 기타 남미 국가에 제한되지 않는 기타 고 비누 인산염 세척강화제 세제 지역은, 약 6000 ppm 이하의 세제 성분이 세정수에 존재하는 고 세제 농도 시스템을 가질 수 있다.

[0588] 이에 비추어 보아, 세계적으로 전형적인 세정액 중의 세제 조성물의 농도가 약 800 ppm 미만의 세제 조성물 ("저 세제 농도 지역"), 예를 들어 일본에서는 약 667 ppm, 미국에서는 약 800 ppm 내지 약 2000 ppm ("중간 세제 농도 지역"), 예를 들어 약 975 ppm, 그리고 브라질에서는 약 1500 ppm, 유럽에서는 약 2000 ppm 초과 ("고 세제 농도 지역"), 예를 들어 약 3000 ppm 내지 약 8000 ppm 및 고 비누 인산염 세척강화제 지역에서는 약 6000 ppm 으로 다양하다는 것이 명백하다.

[0589] 전형적인 세정액의 농도는 경험적으로 측정된다. 예를 들어, 미국에서는 전형적인 세탁기는 약 64.4 L 부피의 세정액을 담는다. 따라서, 세정액 중에 약 975 ppm 의 세제 농도를 수득하기 위해서는, 약 62.79 g 의 세제 조성물을 64.4 L 의 세정액에 첨가해야만 한다. 이 양은 세제와 함께 제공될 수 있는 계량컵을 사용하여 소비자가 세정수로 측정한 전형적인 양이다.

[0590] 추가 예로서, 상이한 지역은 상이한 세정 온도를 사용한다. 일본에서의 세정수의 온도는 전형적으로 유럽에서 사용되는 온도보다 낮다. 예를 들어, 북미 및 일본에서의 세정수의 온도는 10℃ 내지 30℃ (예를 들어, 약 20℃) 일 수 있는 반면, 유럽에서의 세정수의 온도는 전형적으로 30℃ 내지 50℃ (예를 들어, 약 40℃) 이다.

[0591] 추가 예로서, 상이한 지역은 전형적으로 물 경도가 상이할 수 있다. 물 경도는 일반적으로 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 께론 당 그레인 (grain) 으로 표현된다. 경도는 물 중의 칼슘 (Ca^{2+}) 및 마그네슘 (Mg^{2+}) 의 양의 측정이다. 미국의 대부분의 물은 경질이나, 경도 값은 지역마다 다양하다. 중간 경질 (60-120 ppm) 에서 경질 (121-181 ppm) 인 물은 백만 당 60 내지 181 부 (즉, 미국 께론 당 그레인으로 전환된 백만 당 부는 께론 당 17.1 에 동일한 그레인으로 나뉜 ppm # 이다) 의 경질 광물을 함유한다. 표 15-1 은 물의 경도 범위를 제공한다.

표 15-1. 물 경도 범위		
물	께론 당 그레인	백만 당 부
연질	1.0 미만	17 미만
약간 경질	1.0 내지 3.5	17 내지 60
중간 경질	3.5 내지 7.0	60 내지 120
경질	7.0 내지 10.5	120 내지 180
매우 경질	10.5 초과	180 초과

[0592]

[0593] 유럽의 물 경도는 전형적으로 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 께론 당 약 10.5 초과 (예를 들어, 10.5-20.0) 의 그레인 (예를 들어, 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 께론 당 약 15 그레인) 이다. 북미의 물 경도는 전형적으로 일본의 물 경도보다 크나, 유럽의 물 경도보다는 적다. 예를 들어, 북미의 물 경도는 3 내지 10 그레인, 3-8 그레인 또는 약 6 그레인일 수 있다. 일본의 물 경도는 전형적으로 북미의 물 경도보다 낮으며, 일반적으로 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 께론 당 4 미만, 예를 들어 3 그레인이다.

[0594] 본 발명은 하나 이상의 세정 조건 세트 및 전형적으로는 복합 세정 조건에서 개선된 세정 성능을 제공하는 프로테아제 변이체를 제공한다.

[0595] 본원에 기재된 바와 같이, 프로테아제 변이체는 마이크로천조각 검정법을 사용하여 상이한 유형의 세제 및 세정 조건에서 성능을 시험된다 (상기, 및 미국 특허 출원 일련 번호 09/554,992 호; 및 WO 99/34011 호 참조, 모두 본원에 참조로서 인용됨). 프로테아제 변이체는 기타 오염 물질에 대해 또한 유사한 방식으로 시험된다.

[0596] 실시예 16

[0597] 액체 섬유 세정 조성물

[0598] 본 실시예는 본 발명과 함께 사용되는 액체 섬유 세정 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 일본 기계 세탁 조건 하에서 뿐 아니라, 가늘고/거나 섬유한 섬유의 세정을 포함하는 적용을 위해 특히 사용되는 것으로 계획된다. 표 13-1 은 적합한 조성물을 제공한다. 그러나, 본 발명은 많은 다른 제형이 본 발명과 사용되므로 상기 특이적 제형에 제한되는 것으로 의도되지는 않는다.

표 16-1. 액체 섬유 세정 조성물

성분	양 (%)
AE2.5S	2.16
AS	3.30
N-코코일 N-메틸 글루카민	1.10
비이온성 계면활성제	10.00
시트르산	0.40
지방산	0.70

[0599]

표 16-1. 액체 섬유 세정 조성물

성분	양 (%)
염기	0.85
모노에탄올아민	1.01
1,2-프로판디올	1.92
EtOH	0.24
HXS	2.09
프로테아제 .sup.1	0.01
아말라아제	0.06
미량/비활성 물질로 100%로 맞춤	

[0600]

표 16-2. 액체 세탁 세제 조성물

성분	세제 조성물				
	I	II	III	IV	V
LAS	18.0	-	6.0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	-	2.0	8.0	11.0	5.0
C ₈ -C ₁₀ 프로필 디메틸 아민	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₄ 알킬 디메틸 아민 옥시드	-	-	-	-	2.0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	17.0	-	7.0	8.0
CFAA	-	5.0	4.0	4.0	3.0
C ₁₂ -C ₁₄ 지방 알코올 에톡살레이트	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₈ 지방산	11.0	11.0	4.0	4.0	3.0
시트르산 (무수)	5.0	1.0	3.0	3.0	2.0
DETPMP	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5
모노에탄올아민	11.0	8.0	5.0	5.0	2.0
나트륨 하이드록시드	1.0	1.0	2.5	1.0	1.5
퍼카르보네이트	-	3.5	-	2.5	-
프로판디올	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
에탄올	1.8	1.8	4.7	5.4	1.0
펙틴 리아제	-	-	-	0.005	-
아말라아제	-	0.002	-	-	-
셀룰라아제	-	-	0.0002	-	0.0001
리파아제	0.1	-	0.1	-	0.1
프로테아제 A	0.05	0.3	0.055	0.5	0.2

[0601]

표 16-2. 액체 세탁 세제 조성물					
성분	세제 조성물				
	I	II	III	IV	V
DETBCHD	-	-	0.02	0.01	-
SRPI	0.5	0.5	-	0.3	0.3
붕산	2.4	2.4	2.8	2.8	2.4
나트륨 자일렌 술포네이트	-	-	3.0	-	-
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-부틸-옥탄올	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
DTPA	0.5	0.4	0.35	0.28	0.4
증백제 1	0.18	0.10	0.11	-	-
ASP 변이제	0.05	0.3	0.08	0.5	0.2
항수/염료 및/또는 물로 100% 로 맞춤					

표 16-3. 액체 세탁 세제 조성물						
성분	세제 조성물					
	I	I	II	III	IV	V
LAS	11.5	11.5	9.0	-	4.0	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2.85} S	-	-	3.0	18.0	-	16.0
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2.5} S	11.5	11.5	3.0	-	16.0	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3.2	3.2	-	-	-	-
CFAA	-	-	-	5.0	-	3.0
TPKFA	2.0	2.0	-	2.0	0.5	2.0
시트르산 (무수)	3.2	3.2	0.5	1.2	2.0	1.2
Ca 포르메이트	0.1	0.1	0.06	0.1	-	-
Na 포르메이트	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
Na 콜멘 술포네이트	4.0	4.0	1.0	3.0	1.2	-
보레이트	0.6	0.6	-	3.0	2.0	3.0
Na 히드록시드	6.0	6.0	2.0	3.5	4.0	3.0
에탄올	2.0	2.0	1.0	4.0	4.0	3.0
1,2 프로판디올	3.0	3.0	2.0	8.0	8.0	5.0
모노에탄올아민	3.0	3.0	1.5	1.0	2.5	1.0
TEPAE	2.0	2.0	-	1.0	1.0	1.0
PBI	-	-	4.5	-	2.8	-
프로테아제 A	0.03	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02
리파아제	-	-	-	0.002	-	-
아밀라아제	-	-	-	-	0.002	-
셀룰라아제	-	-	-	-	-	0.0001
펙틴 리아제	0.005	0.005	-	-	-	-
ASP 변이제	0.03	0.05	0.01	0.03	0.08	0.02
SRP I	0.2	0.2	-	0.1	-	-
DTPA	-	-	-	0.3	-	-

[0602]

표 16-3. 액체 세탁 세제 조성물						
성분	세제 조성물					
	I	I	II	III	IV	V
PVNO	-	-	-	0.3	-	0.2
증백제 1	0.2	0.2	0.07	0.1	-	-
실리콘 소포제	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1
항수/염료 및/또는 물로 100% 로 맞춤						

표 16-4. 액체 세탁 세제 조성물					
성분	조성물				
	I	II	III	IV	V
LAS	24.0	32.0	6.0	8.0	6.0
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	-	-	8.0	11.0	5.0
C ₈ -C ₁₀ 프로필 디메틸 아민	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₄ 알킬 디메틸 아민 옥시드	-	-	-	-	2.0
C ₁₂ -C ₁₅ AS	-	-	17.0	7.0	8.0
CFAA	-	5.0	4.0	4.0	3.0
C ₁₂ -C ₁₄ 지방 알코올 에톡실레이트	12.0	6.0	1.0	1.0	1.0
C ₁₂ -C ₁₈ 지방산	3.0	-	4.0	4.0	3.0
시트르산 (무수)	6.0	5.0	3.0	3.0	2.0
DETPMP	-	-	1.0	1.0	0.5
모노에탄올아민	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
나트륨 히드록시드	-	-	2.5	1.0	1.5
1 N HCl 수용액	#1	#1	-	-	-
프로판디올	12.7	14.5	13.1	10.	8.0
에탄올	1.8	2.4	4.7	5.4	1.0
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
펙틴 리아제	-	-	-	0.005	-
아밀라아제	0.001	0.002	-	-	-
셀룰라아제	-	-	0.0002	-	0.0001
리파아제	0.1	-	0.1	-	0.1
ASP 변이체	0.05	0.3	0.08	0.5	0.2
프로테아제 A	-	-	-	-	0.1
SRP1	0.5	0.5	-	0.3	0.3
붕산	2.4	2.4	2.8	2.8	2.4
나트륨 자일렌 술포네이트	-	-	3.0	-	-
DC 3225C	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2-부틸-옥탄올	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
증백제 1	0.12	0.10	0.18	0.08	0.10
항수/염료 및/또는 물로 100% 로 맞춤					

실시에 16-4 의 조성물 (I)-(II) 의 pH 는 약 5 내지 약 7 이고, 조성물 (III)-(V) 의 pH 는 약 7.5 내지 약 8.5 이다. # 1: 1N HCl 수용액을 첨가하여 제형의 순 pH 를 약 3 내지 약 5 의 범위로 조정한다.

실시에 17

액체 식기세정 조성물

본 실시예는 본 발명과 함께 사용되는 액체 식기세정 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 일본 기계 세탁 조건 하에서 특히 사용될 수 있는 것으로 계획된다. 그러나, 본 발명은 많은 다른 제형이 본 발명과 사용되므로 상기 특이적 제형에 제한되는 것으로 의도되지는 않는다.

[0608] 하기 압축 고밀도 식기세정 세제 조성물이 본 발명에 의해 제공된다.

표 17-1. 압축 고밀도 식기세정 세제 조성물						
성분	조성물					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP	-	45.0	45.0	-	-	40.0
3Na시트레이트 2H ₂ O	17.0	-	-	50.0	40.2	-
Na 카르보네이트	17.5	14.0	20.0	-	8.0	33.6
바카르보네이트	-	-	-	26.0	-	-
실리케이트	15.0	15.0	8.0	-	25.0	3.6
메타실리케이트	2.5	4.5	4.5	-	-	-
PBI	-	-	4.5	-	-	-
PB4	-	-	-	5.0	-	-
퍼카르보네이트	-	-	-	-	-	4.8
PAAC	0.02	0.05	0.03	0.04	0.03	0.05
BB1	-	0.1	0.1	-	0.5	-
BB2	0.2	0.05	-	0.1	-	0.6
비이온성	2.0	1.5	1.5	3.0	1.9	5.9
HEDP	1.0	-	-	-	-	-
DETPMP	0.6	-	-	-	-	-
파라핀	0.5	0.4	0.4	0.6	-	-
프로테아제 B	0.072	0.053	0.053	0.026	0.059	0.01
아밀라아제	0.012	-	0.012	-	0.021	0.006
리파아제	-	0.001	-	0.005	-	-
펙틴 리아제	0.001	0.001	0.001	-	-	-
ASP 변이체	0.072	0.053	0.053	0.026	0.059	0.01
BTA	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
폴리카르복실레이트	6.0	-	-	-	4.0	0.9
항수	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
습기 및/또는 미량물질*로 100%로 맞춤						

[0609]

[0610] *중백제/염료/SRP1/Na 카르복시메틸셀룰로오스/광표백제/MgSO₄/PVPVI/비누 억제제/고 분자량 PEG/점토.

[0611] 실시예 17-1 조성물 (I) 내지 (VI) 의 pH 는 약 9.6 내지 약 11.3 이다.

[0612] 하기 설것이 액체 세제 조성물이 본 발명에 의해 제공된다.

표 17-2. 설것이 액체 세제 조성물						
성분	세제 조성물					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	30.0	28.0	25.0	-	15.0	10.0
LAS	-	-	-	5.0	15.0	12.0
파라핀 술포네이트	-	-	-	20.0	-	-
C ₁₀ -C ₁₈ 알킬 디메틸 아민 옥사이드	5.0	3.0	7.0	-	-	-
베타인	3.0	-	1.0	3.0	1.0	-
C ₁₂ 폴리-OH 지방산 아마이드	-	-	-	3.0	-	1.0
C ₁₄ 폴리-OH 지방산 아마이드	-	1.5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2.0	-	4.0	-	-	20.0
DTPA	-	-	-	-	0.2	-
Tri-나트륨 시트레이트디하이드레이트	0.25	-	-	0.7	-	-
디아민	1.0	5.0	7.0	1.0	5.0	7.0
MgCl ₂	0.25	-	-	1.0	-	-
프로테아제 A	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.05
아밀라아제	0.001	-	-	0.002	-	0.001
나트륨 큐멘 술포네이트	-	-	-	2.0	1.5	3.0
DETBCHD	-	-	-	0.01	0.02	0.01
PBI	1.5	2.8	1.2	-	-	-
ASP 변이체	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.05
항수/염료 및/또는 물로 100%로 맞춤						

[0613]

[0614] 하기 액체 자동 식기세정 세제 조성물이 본 발명에 의해 제공된다.

표 17-3. 액체 자동 식기세정 세제 조성물					
성분	조성물				
	I	II	III	IV	V
STPP	16	16	18	16	16
칼륨 술페이트	-	10	8	-	10
1,2 프로판디올	6.0	0.5	2.0	6.0	0.5
붕산	4.0	3.0	3.0	4.0	3.0
CaCl ₂ 디하이드레이트	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
비이온성	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
프로테아제 B	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
아밀라아제	0.02	-	0.02	0.02	-
ASP 변이체	0.1	0.03	0.05	0.03	0.06
항수/염료 및/또는 물로 100% 로 맞춤					

[0615]

[0616] 하기 정제 세제 조성물이 본 발명에 의해 제공된다. 상기 조성물은 표준 12 헤드 회전 프레스를 사용하여 13KN/cm²의 압력에서 과립 식기세정 세제 조성물을 압착하여 제조된다.

표 17-4. 정제 세제 조성물								
성분	조성물							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP	-	48.8	44.7	38.2	-	42.4	46.1	36.0
3Na시트레이트 2H ₂ O	20.0	-	-	-	35.9	-	-	-
Na 카르보네이트	20.0	5.0	14.0	15.4	8.0	23.0	20.0	28.0
실리케이트	15.0	14.8	15.0	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
리파아제	0.001	-	0.01	-	0.02	-	-	-
프로테아제 B	0.042	0.072	0.042	0.031	-	-	-	-
프로테아제 C	-	-	-	-	0.052	0.023	0.023	0.029
ASP 변이체	0.01	0.08	0.05	0.04	0.052	0.023	0.023	0.029
아밀라아제	0.012	0.012	0.012	-	0.015	-	0.017	0.002
펙틴 리아제	0.005	-	-	0.002	-	-	-	-
PBI	-	-	3.8	-	7.8	-	-	8.5
파카르보네이트	6.0	-	-	6.0	-	5.0	-	-
PAAC	0.02	0.03	0.05	0.04	0.03	0.02	0.04	0.05
BB1	0.2	-	0.5	-	0.3	0.2	-	-
BB2	-	0.2	-	0.5	-	-	0.1	0.2
비이온성	1.5	2.0	2.0	2.2	1.0	4.2	4.0	6.5
TAED	-	-	-	-	-	2.1	-	1.6
HEDP	1.0	-	-	0.9	-	0.4	0.2	-
DETPMP	0.7	-	-	-	-	-	-	-
파라핀	0.4	0.5	0.5	0.5	-	-	0.5	-
BTA	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-
폴리카르복실레이트	4.0	-	-	-	4.9	0.6	0.8	-
PEG 400-30,000	-	-	-	-	-	2.0	-	2.0
글리세롤	-	-	-	-	-	0.4	-	0.5
항수	-	-	-	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2
습기 및/또는 미량물질*로 100% 로 맞춤								

[0617]

[0618] *증백제/염료/SRP1/Na 카르복시메틸셀룰로오스/광표백제/MgSO₄/PVPVI/비누 억제제/고 분자량 PEG/점토.

[0619] 실시예 17-4.(I) 내지 (VIII)의 pH는 약 10 내지 약 11.5이다.

[0620] 실시예 17-4.(1) 내지 (VIII)의 정제 중량은 약 20그램 내지 약 30그램이다.

[0621] 하기 식기세정 조성물은 일본 세정 조건하에서 특히 사용된다.

표 17-5. 액체 식기세정 조성물		
성분	A	B
AE1.4S	24.69	24.69
N-코코일 N-메틸 글루카민	3.09	3.09
아민 옥시드	2.06	2.06
베타인	2.06	2.06
비이온성 계면활성제	4.11	4.11
히드로트롭	4.47	4.47
마그네슘	0.49	0.49
에탄올	7.2	7.2
LemonEase	0.45	0.45
게라니올 /BHT	---	0.60/0.02
아밀라아제	0.03	0.005
프로테아제	0.01	0.43
100% 로 맞춤		

[0622]

[0623] 실시예 18

[0624] 액체 섬유 세정 조성물

[0625] 본 발명의 프로테아제는 세정 조성물에 특히 사용된다. 예를 들어, 일본 기계 세정 조건 하에서 특히 사용되는 액체 섬유 세정 조성물이 본 발명에 따라 제조되는 것이 계획된다. 일부 바람직한 구현예에서, 본 조성물은 표 18-1 에 제시된 하기 성분을 포함한다.

표 18-1. 액체 섬유 세정 조성물	
성분	양 (%)
AE2.5S	15.00
AS	5.50
N-코코일 N-메틸 글루카민	5.50
비이온성 계면활성제	4.50
시트르산	3.00
지방산	5.00
염기	0.97
모노에탄올아민	5.10
1,2-프로판디올	7.44
EtOH	5.50
HXS	1.90
붕산	3.50
에톡실화 테트라에틸렌펜타이민	3.00
SRP	0.30
프로테아제	0.069
아밀라아제	0.06
셀룰라아제	0.08
리파아제	0.18
증백제	0.10
미량/비활성 물질로 100%로 맞춤	

[0626]

[0627] 실시예 19

[0628] 과립 섬유 세정 조성물

[0629] 본 실시예에서는, 본 발명과 함께 사용되는 다양한 과립 섬유 세정 조성물이 제공된다. 하기 표는 적합한 조성물을 제공한다. 그러나, 본 발명은 많은 다른 제형이 본 발명과 사용되므로 상기 특이적 제형에 제한되는 것으로 의도되지는 않는다.

표 19-1. 과립 섬유 세정 조성물				
성분	제형			
	A	B	C	D
프로테아제 1	0.10	0.20	0.03	0.05
프로테아제 2			0.2	0.15
C13 선형 알킬 벤젠 술포네이트	22.00	22.00	22.00	22.00
포스페이트 (나트륨 트리폴리포스페이트로서)	23.00	23.00	23.00	23.00
나트륨 카르보네이트	23.00	23.00	23.00	23.00
나트륨 살리케이트	14.00	14.00	14.00	14.00
제올라이트	8.20	8.20	8.20	8.20
켈란 (디에틸렌트리아민-펜타아세트산)	0.40	0.40	0.40	0.40
나트륨 술페이트	5.50	5.50	5.50	5.50
물	100% 로 맞춤			

표 19-2. 과립 섬유 세정 조성물				
성분	제형			
	A	B	C	D
프로테아제 1	0.10	0.20	0.30	0.05
프로테아제 2			0.2	0.1
C12 알킬 벤젠 술포네이트	12.00	12.00	12.00	12.00
제올라이트 A (1-10 마이크로미터)	26.00	26.00	26.00	26.00
C12-C14 2차 (2,3) 알킬 술페이트, Na 염	5.00	5.00	5.00	5.00
나트륨 시트레이트	5.00	5.00	5.00	5.00
형광 증백제	0.10	0.10	0.10	0.10
나트륨 술페이트	17.00	17.00	17.00	17.00
충전제, 물, 미량물질	100% 로 맞춤			

[0630]

[0631] 하기 세탁 조성물이 본 발명에 의해 제공된다. 본 조성물은 과립 또는 정제로서 사용하기에 적합하다.

표 19-3. 과립 및 정제 세탁 세제 조성물					
성분	조성물				
	I	II	III	IV	V
기본 생성물					
C ₁₄ -C ₁₅ AS 또는 TAS	8.0	5.0	3.0	3.0	3.0
LAS	8.0	-	8.0	-	7.0
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₃ S	0.5	2.0	1.0	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ 또는 E ₃	2.0	-	5.0	2.0	2.0
QAS	-	-	-	1.0	1.0
제올라이트 A	20.0	18.0	11.0	-	10.0
SKS-6 (건조 첨가)	-	-	9.0	-	-
MA/AA	2.0	2.0	2.0	-	-
AA	-	-	-	-	4.0
3Na 시트레이트 2H ₂ O	-	2.0	-	-	-
시트르산 (무수)	2.0	-	1.5	2.0	-
DTPA	0.2	0.2	-	-	-
EDDS	-	-	0.5	0.1	-
HEDP	-	-	0.2	0.1	-
PB1	3.0	4.8	-	-	4.0
퍼카르보네이트	-	-	3.8	5.2	-
NOBS	1.9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2.0	-	-
TAED	0.5	2.0	2.0	5.0	1.00
BB1	0.06	-	0.34	-	0.14
BB2	-	0.14	-	0.20	-
무수 Na 카르보네이트	15.0	18.0	8.0	15.0	15.0
술페이트	5.0	12.0	2.0	17.0	3.0
실리케이트	-	1.0	-	-	8.0
프로테아제 B	0.033	0.033	-	-	-
프로테아제 C	-	-	0.033	0.046	0.033
리파아제	-	0.008	-	-	-
아밀라아제	0.001	-	-	-	0.001
셀룰라아제	-	0.0014	-	-	-
펙틴 리아제	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
ASP 변이체	0.03	0.05	1.0	0.06	0.1
습기 및/또는 미량물질*로 100%로 맞춤					

[0632]

[0633] *향수/염료, 증백제/SRP1/Na 카르복시메틸셀룰로오스/광표백제/MgSO₄/PVPVI/비누 억제제/고 분자량 PEG/점토.

[0634] 하기 세탁 조성물은 특히 유럽 기계 세정 조건 하에서 제공하기 위한 것으로 계획된다.

표 19-3. 과립 섬유 세정 조성물			
성분	제형		
	A	B	C
LAS	7.0	5.61	4.76
TAS			1.57
C45AS	6.0	2.24	3.89
C25E25	1.0	0.76	1.18

[0635]

표 19-3. 과립 섬유 세정 조성물			
성분	제형		
	A	B	C
C45E7			2.0
C25E3	4.0	5.5	
QAS	0.8	2.0	2.0
STPP			

표 19-3. 과립 섬유 세정 조성물			
성분	제형		
	A	B	C
제올라이트	25.0	19.5	19.5
시트르산	2.0	2.0	2.0
NaSKS-6	8.0	10.6	10.6
카르보네이트 I	8.0	10.0	8.6
MA/AA	1.0	2.6	1.6
CMC	0.5	0.4	0.4
PB4		12.7	
퍼카르보네이트			19.7
TAED		3.1	5.0
시트레이트	7.0		
DTPMP	0.25	0.2	0.3
HEDP	0.3	0.3	0.3
QEA 1	0.9	1.2	1.0
프로테아제 I	0.02	0.05	0.035
리파아제	0.15	0.25	0.15
셀룰라아제	0.28	0.28	0.28
아밀라아제	0.4	0.7	0.3

표 19-3. 과립 섬유 세정 조성물			
성분	제형		
	A	B	C
PVPI/PVNO	0.4		0.1
광활성화 표백제 (ppm)	15	27	27
증백제 1	0.08	0.19	0.19
증백제 2		0.04	0.04
향수	0.3	0.3	0.3
포말 과립 (알산 40%, 나트륨 비카르보네이트 40%, 나트륨 카르보네이트 20%)	15	15	5
규소 소포제	0.5	2.4	2.4
미량/비활성 물질로 100%로 맞춤	100%로 맞춤		

[0636]

[0637]

실시예 20.

[0638]

바닥·타일 (Hard Surface) 세정 세제 조성물

[0639]

또한 본 발명은 바닥·타일 세정에 적합한 조성물을 제공한다.

표 20. 액체 바닥·타일 세정 세제 조성물							
성분	조성물						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8.0	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1.0	0.8	4.0	2.0	2.0	1.0	2.0
LAS	-	-	-	0.8	0.8	-	0.8
나트륨 클렌 술포네이트	1.5	2.6	-	1.5	1.5	1.5	1.5
Isachem® AS	0.6	0.6	-	-	-	0.6	-
Na ₂ CO ₃	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
3Na시트레이트 2H ₂ O	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
지방산	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-부틸 옥탄올	0.3	0.3	-	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000®	0.4	-	0.3	0.35	0.5	-	-
PVP	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	-	-
MME PEG (2000)®	-	-	-	-	-	0.5	0.5
Jeffamine® ED-2001	-	0.4	-	-	0.5	-	-

[0640]

표 20. 액체 바닥·타일 세정 세제 조성물							
성분	조성물						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
PAAC	-	-	-	0.03	0.03	0.03	-
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	-	-	-	-
프로테아제 B	0.07	0.05	0.05	0.03	0.06	0.01	0.04
아밀라아제	0.12	0.01	0.01	-	0.02	-	0.01
리파아제	-	0.001	-	0.005	-	0.005	-
ASP 변이체	0.07	0.05	0.08	0.03	0.06	0.01	0.04
MCAEM (C ₈ -C ₁₀ E ₂ 아세테이트)	3.5	5.6	4.8	5.3	3.6	8.0	4.7
펙틴 리아제	0.001	-	0.001	-	-	-	0.002
PBI	3.5	4.6	2.7	3.8	3.6	4.2	2.7
향수/염료 및/또는 물로 100%로 맞춤							

[0641]

[0642]

상기 조성물의 pH는 약 7.4 내지 약 9.5이다.

[0643]

실시예 21

[0644] **ASP 를 포함하는 동물 먹이**

[0645] 또한 본 발명은 ASP 변이체를 포함하는 동물 먹이 조성물을 제공한다. 본 실시예에서, 가금류에게 적합한 하나의 이러한 먹이가 제공된다. 그러나, 본 발명의 프로테아제가 수 많은 다른 먹이 제형과 함께 사용되므로, 본 특이적 제형에 제한되는 것으로는 의도되지 않는다. 또한 본 발명의 먹이가 가축 (예를 들어, 소, 돼지, 양, 등) 뿐 아니라, 반려 동물 (예를 들어, 개, 고양이, 말, 설치류, 등) 을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 동물에게 섭취하기에 적합한 것으로 의도된다. 하기 표는 곤충 제형, 즉 3 주 이하의 연령의 칠면조 새끼에게 투여하기에 적합한 옥수수-기재 기초 먹이를 제공한다.

표 21-1. 동물 먹이 조성물	
성분 양	(wt. %)
옥수수	36.65
대두 사료 (45.6% CP)	55.4
동물-식물 지방	3.2
제 2 인산칼슘	2.3
석회석	1.5
미네랄 프리믹스	0.3
비타민 프리믹스	0.3
염화나트륨	0.15
DL 메티오닌	0.2

[0646]

[0647] 일부 구현예에서, 본 먹이 제형에는 다양한 농도의 본 발명의 프로테아제(들) (예를 들어, 2,000 단위/kg, 4,000 단위/kg 및 6,000 단위/kg) 이 보충된다.

[0648] 명세서에 언급된 모든 특허 및 공보는 본 발명이 속하는 당업자의 수준의 것이다. 모든 특허 및 공보는 각 공보가 구체적으로 개별적으로 참조로서 인용되는 것으로 표시된 것과 동일한 범위로 본원에 참조로서 인용된다.

[0649] 본 발명의 바람직한 구현예를 기술함에 있어, 당업자는 기재된 구현예에 다양한 변형이 이뤄질 수 있고, 이러한 변형이 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다는 것을 인지할 것이다.

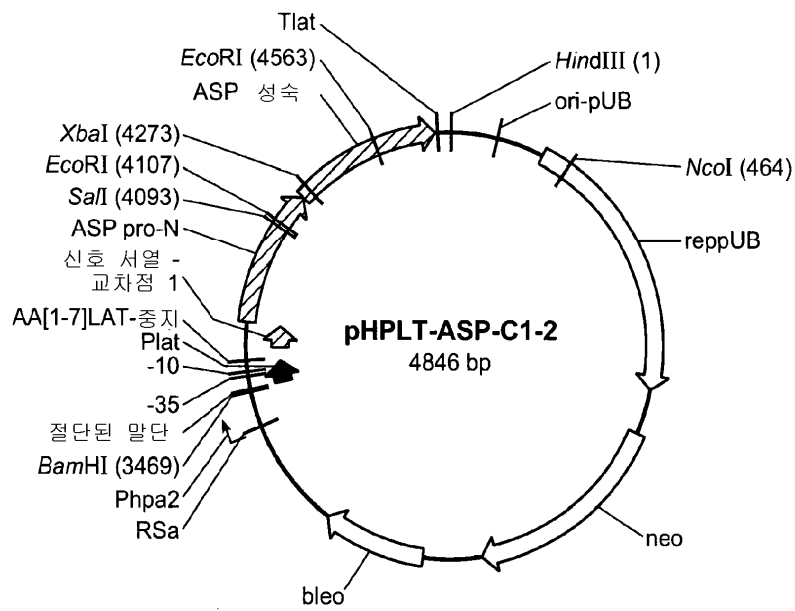
[0650] 당업자는 본 발명이 언급된 목적을 달성하고, 언급된 목표 및 장점, 뿐 아니라 발명 고유의 것을 수득하기 위해 잘 조정된다는 것을 쉽게 인지한다. 본원에 기재된 조성물 및 방법은 바람직한 구현예를 대표하는 것이고, 예시적이고, 본 발명의 범주에 대한 제한으로 의도되는 것은 아니다. 본 발명의 범주 및 취지를 벗어나지 않고 본원에 기재된 본 발명에 다양한 치환 및 변형이 이뤄질 수 있다는 것을 당업자는 잘 알 것이다.

[0651] 본원에 설명으로 기재된 본 발명은 본원에 구체적으로 기재되지 않은 임의의 요소(들), 제한(들) 이 없어도 적합하게 실시될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 제한이 아닌 설명을 위해 사용되며, 제시되고 기재된 특징 또는 그의 일부의 임의의 동등물을 제외하여 이러한 용어 및 표현을 사용하는 것으로는 의도되지 않으나, 청구된 본 발명의 범주 내에서 다양한 변형이 가능하다는 것으로 인지된다. 그러므로, 본 발명이 바람직한 구현예 및 임의의 특징에 의해 구체적으로 기재되어 있지만, 본원에 기재된 개념의 변형 및 변화가 당업자에 의해 재분류될 수 있고, 이러한 변형 및 변화는 청구의 범위에 의해 정의된 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 고려되는 것으로 이해되어야만 한다.

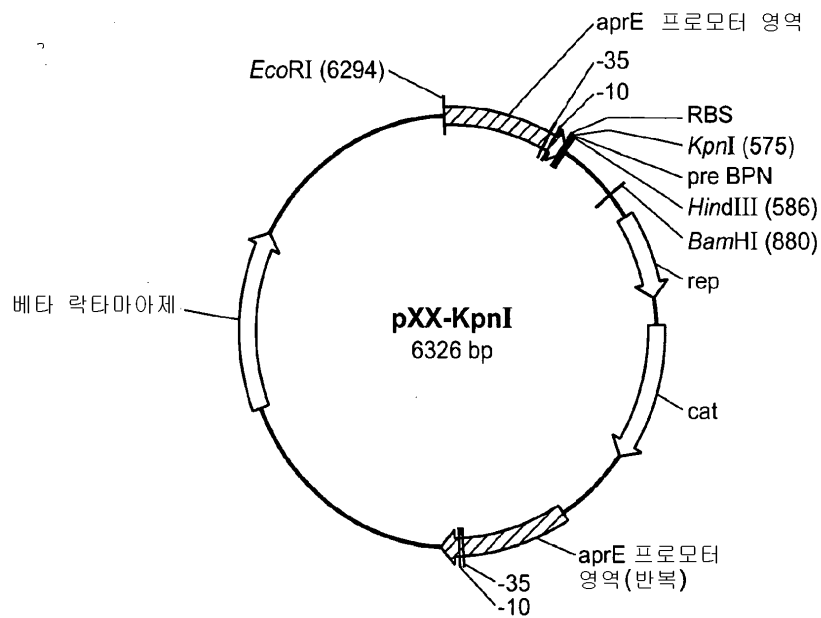
[0652] 본 발명은 본원에 광범위하고 일반적으로 기재되어 있다. 속명 기재 내에 포함되는 좀더 좁은 종명 및 하부 속명 그룹 각각이 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 여기에는 종으로부터 임의의 대상을 제거하는 단서 또는 부정적 제한을 갖는 본 발명의 종명 기재가, 삭제된 부분이 본원에 구체적으로 언급되었는 지의 여부와 관계 없이 포함된다.

도면

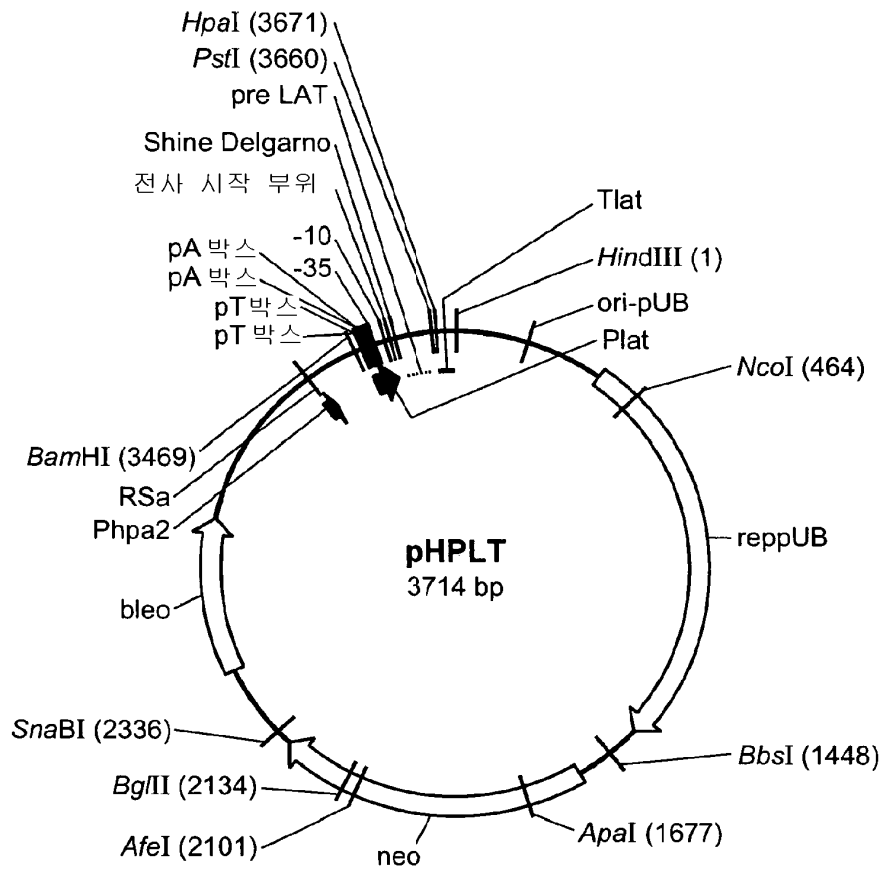
도면1



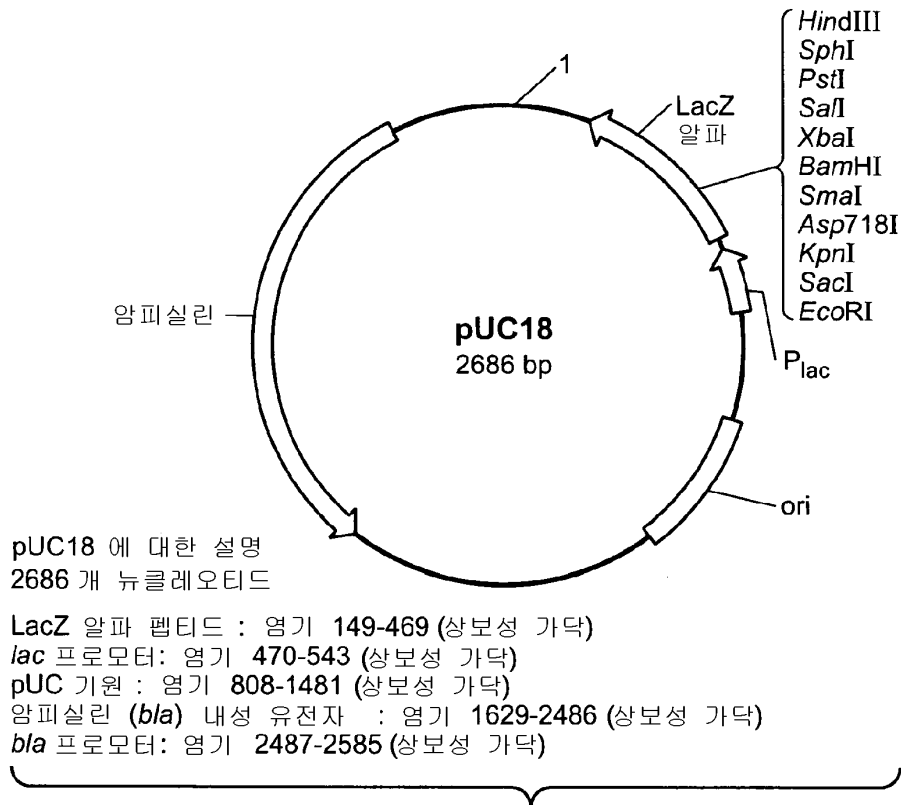
도면2



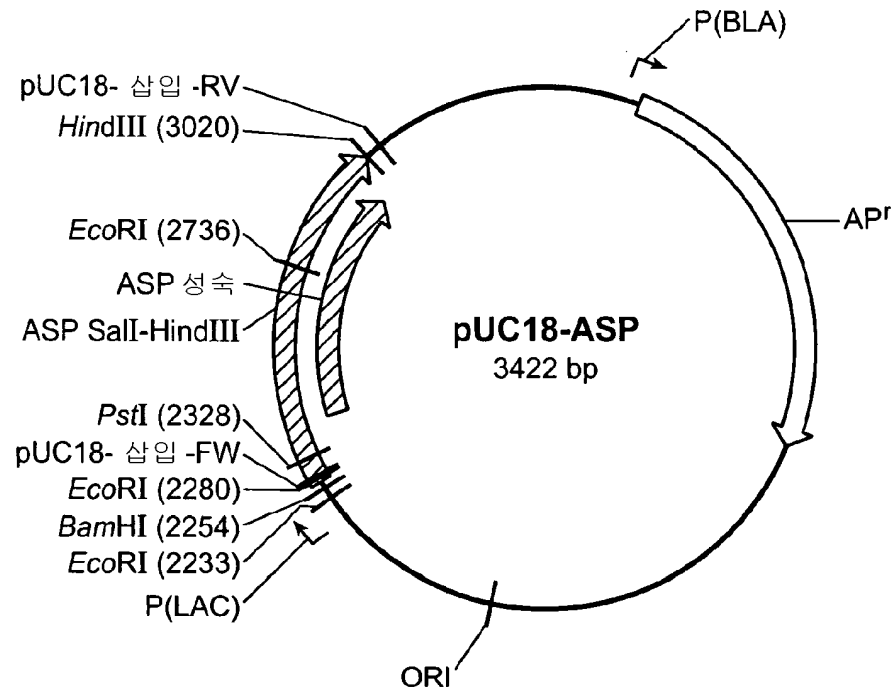
도면3



도면4



도면5



도면6

	EMPA 116 (BMI) 고정			EMPA 116 (BMI) 미고정			Equest 매질 잔디		
	D % SR			D % SR			D % SR		
	평균	STD	(n)	평균	STD	(n)	평균	STD	(n)
번이제	2.9	0.9	24	7.2	2.2	24	1.7	3.7	24
G12D-R35E				6.0	1.5	6	-2.2	5.0	5
R123L-R127Q-R179Q				7.0	1.1	6	1.3	5.4	6
G12D-R35H				8.2	1.2	6	0.4	4.1	6
G12D-R35E				6.1	1.2	6	3.1	5.0	24
R35E-R123L-R127Q-R179Q	-0.4	0.8	24	1.9	2.9	24	1.8	5.2	24
R14I-R16Q-N24E-R35F-G49A-R61V-Q81P-R123F-R127A-R159F	1.1	1.1	24	6.3	2.9	24	-1.7	5.1	24
N24E-G54D-R123S-R179N	0.0	0.9	24	6.9	2.8	24	-1.4	5.1	24
G12D-R35H-R123F-R159E	0.1	1.0	24	7.2	2.8	24	-0.5	5.2	24
G12D-R35E-R159E	0.2	0.8	24	6.8	3.0	24	0.1	5.1	24
R35E-R123L-R127Q-R179Q	1.8	1.1	24	7.1	3.4	24	0.5	5.0	24
R123L-R127Q-R179Q	2.4	0.9	24	7.3	2.8	24	2.9	6.9	24
G12D-R35H	1.6	0.8	24	7.0	2.7	24	-0.6	6.8	24
R14S-R159L	2.7	1.2	24	8.0	2.7	24	2.6	4.4	24
R14N-R127K-R159L	3.3	1.0	24	6.0	3.0	24	2.3	4.1	24
R14I-R159G	3.2	1.3	24	6.0	2.5	24	4.8	6.3	24
N24T-R159Q	2.7	1.0	24	5.0	2.6	24	3.3	5.5	24
N24M-S76V-A93H-R127K-R159K	2.7	1.1	24	5.4	2.2	24	-2.0	6.7	24
N24H-G54L-S76V-A93H-R127K-R159K	3.2	1.1	24	7.0	2.4	24	5.9	6.7	24
N24W-S76Y-A93G-R127K-R159K	3.6	1.2	24	6.0	2.5	24	0.4	7.0	12
N24W-G54D-A93H-R127K-R159K	3.3	1.1	24	5.5	2.1	24	-0.3	7.5	24
R14I-S76A-A93H-R127K-R159K-I181Q	2.7	1.3	24	5.5	2.6	24	6.9	6.8	24
R14M-S76T-A93H-R127K-R159K-I181K	4.2	1.2	24	5.9	2.4	24	5.5	7.0	24
R14M-S76N-A93H-R127K-R159K-I181Q	3.5	1.2	24	6.7	2.5	24	-0.5	7.0	24
R14M-S76A-A93S-R127K-R159K-I181K	2.6	1.6	24	5.5	2.9	24	-0.6	7.2	24
R14I-S76A-A93H-R127K-R159K	3.9	1.7	24	5.4	2.5	24	0.6	6.1	24
R14M-S76N-A93G-R127K-R159K-I181K	3.5	1.7	24	6.7	2.6	24	4.5	6.2	24
R14M-S76A-A93G-R127K-R159K-I181T	3.6	1.4	24	6.4	2.8	24	7.0	7.1	24
R14M-S76N-A93S-R127K-R159K-I181T	3.8	1.5	24	5.90	2.50	24	5.2	6.7	24
R14M-S76Y-A93H-R127K-R159K-I181K	2.2	1.1	24	4.70	2.30	24			

HEPES 완충액의 부재하에서 수행된 테르코토미터 시험
(번이제 용량은 0.55ppm 이었다)

도면7

변이체	EMPA 116 (BMI) 이고정				Equest 매질 잔디			
	D % SR		(n)		D % SR		(n)	
	평균	STD	평균	STD	평균	STD	평균	STD
N024T-G049A-Q071F-A093S-S099A-S187Q	7.20	2.90	24	5.10	5.70	7.70	24	24
A093S-S099A-S187Q	6.6	2.7	24	3.60	7.80	24	24	24
N024T-G049A-Q071F-A093S-S099A-S187Q	6.5	2.7	24	5.50	4.50	24	24	24
N024T-G049A-Q071F-A093S-S099A-S187Q	8.3	3	24	5	5	24	24	24
N024T-G049A-Q071F-A093S-S099A-S187Q	9.7	2.7	24	3.9	7.4	24	24	24
R016Q-N024T-G049A-Q071F-A093S-S099A-S187Q	9	2.3	24	7.2	3.9	24	24	24
R016Q-N024T-G049A-Q071F-A093S-S099A-S187Q	8.4	2.7	24	4.9	4.8	24	24	24
R014-R016Q-N024T-G049A-Q071F-S076T-A093S-S099A-R127K-I181Q-S187Q	9.8	2.3	24	6.8	4.6	24	24	24
R014-R016Q-N024T-G049A-Q071F-S076T-A093S-S099A-R127K-I181Q-S187Q	9.2	2.3	24	8.4	3.9	24	24	24
R14M-S76A-A93G-R127K-R159K-I181K	9.7	2.4	24	8.2	4	24	24	24
R14-S76N-A93H-R127K-R159K-I181Q	10.2	3.3	24	6.2	6.6	24	24	24
G12D-R35E-D184N	7.8	3	24	8.1	6.2	24	24	24
R14M-S76N-A93G-R127K-R159K-I181T	10.2	2.8	24	8.4	6.9	24	24	24
R14M-S76T-A93H-R127K-R159K-I181Q	11.2	3	24	9.7	5.1	24	24	24
R14M-S76T-A93H-R127K-R159K-I181Q	9.6	2.6	24	3.5	5.8	24	24	24
R14-A64K-T86K-T116E-R123F-D184T	10.9	3	24	5.8	6	24	24	24
R14-A64K-T86K-T116E-R123F-R159F-D184T	10.6	3	24	5	6	24	24	24
R14-Q81K-T116E-R159F-D184T	12.5	3	24	8.6	5.7	24	24	24
R14-A64K-T86K-N112E-R123F-R159F-D184T	11.7	3.2	24	6.1	4.8	24	24	24
R14-A64K-Q81K-T86K-T116E-R123F	11.4	3	24	6.8	6.2	24	24	24
R14-Q81K-T86K-N112E-R123F-R159F-D184T	8.7	3.2	24	3.2	5.2	24	24	24
R14-A64K-T86K-N112E-R123F-D184T	10.7	2.3	24	3.3	4.8	24	24	24
R14-A64K-Q81K-T86K-N112E-R123F-R159F	10.8	2.3	24	4.6	4.7	24	24	24
R14-A64K-T86K-R123F-R159F	11	2.5	24	4.6	4.8	24	24	24
R14-A64K-Q81K-T86K-N112E-R123F-R159F	10.9	2.1	24	5.3	4.6	24	24	24
R14-A64K-Q81K-T116E-R159F	12.3	2.5	24	8	4.2	24	24	24
R14-A64K-N112E-R123F-D184T	9	3.7	24	7.9	6.7	24	24	24
R14-Q81K-T86K-T116E-R123F-D184T	10.4	2.2	24	6	5	24	24	24
R14-T86K-T116E-R123F-D184T	12.3	3.1	24	6.7	4.3	24	24	24
R14-A64K-T116E	11.3	2.4	24	5.5	5.2	24	24	24
R14-Q81K-T116E	11.2	2.7	24	6.1	4.2	24	24	24
R14-T86K-N112E-R123F-D184T	9.8	2.6	24	5.2	5.4	24	24	24
R14-A64K-T86K-R123F-R159F-D184T	9.9	2.8	24	4.9	4.5	24	24	24
R14-T86K-R123F-R159F-D184T	11	2.3	24	3.4	5.5	24	24	24
G12D-R35E-G63R-R79K-T109M	10.7	3.4	24	6.1	4.9	24	24	24

HEPES 완충액의 존재하에서 수행된 테르고토미터 시험
(변이체 용량은 0.55ppm 이었다)

서열목록

<110> Wofgang, Aehle
Estell, David A.
Jones, Brian E.
Kolkman, Marc
Leeflang, Chris
Oh, Hiroshi
Poulose, Ayrookaran
Shaw, Andrew

Van Der Kleij, Wilhelmus A.H.

Van Marrewijk, Leo

<120> Multiple Mutation Variants of Serine Protease

<130> GC931

<140> US 11/583,334

<141> 2006-10-19

<150> US 10/576,331

<151> 2004-11-19

<150> PCT/US2004/039066

<151> 2004-11-19

<150> US 60/523,609

<151> 2003-11-19

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1488

<212> DNA

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 1

atgacaccac gcacagtcac gcgggccctg gccgtggcca ccgcagccgc cacactcctg 60

gcaggcggca tggccgccca ggccaacgag cccgcaccac ccgggagcgc gagcgcaccg 120

ccacgcctgg ccgagaagct cgaccccgac ctctctgagg ccatggagcg cgacctgggc 180

ctcgacgcgg aggaagccgc cgccacctg gcgttcagc acgacgcagc cgagaccggc 240

gaggccctcg ccgaagagct cgacgaggac ttccgccgca cctgggtcga ggacgacgtc 300

ctgtacgtcg ccaccaccga cgaggacgcc gtcgaggagg tcgagggcga aggcgccacg 360

gccgtcaccg tcgagcactc cctggccgac ctcgaggcct ggaagaccgt cctcgacgcc 420

gccctcgagg gccacgacga cgtgcccacc tggtagctcg acgtcccgc caacagcgtc 480

gtcgtcgccg tcaaggccgg agcccaggac gtcgccgccc gcctcgtcga aggtgccgac 540

gtcccgtccg acgccgtgac ctctcgtcag accgacgaga ccccgccgac catgttcgac 600

gtgatcgccg gcaacgccta caccatcggg gggcgcagcc gctgctcgat cgggttcgcg 660

gtcaacggcg gggtcatcac cgccggccac tgcggccgca ccggcgccac caccgccaac 720

cccaccggga ccttcgccgg gtccagcttc ccgggcaacg actacgcgtt cgtccgtacc 780

ggggccggcg tgaacctgct ggcccagggtc aacaactact ccggtggccg cgtccagggtc	840
gccgggcaca ccgcggcccc cgtcgggtcg gccgtgtgcc ggtccgggtc gaccaccggg	900
tggcactgcg gcaccatcac tgcgtcaac tcctcgggtca cctaccccga gggcaccgtc	960
cgcggcctga tccgcaccac cgtctgcgcc gagcccggcg actccgggtg ctcgtgctc	1020
gccggcaacc agggccaggg cgtcacgtcc ggccgggtccg gcaactgccg caccggtggc	1080
accacgttct tcagccgggt caaccccatc ctccaggcgt acggcctgag gatgatcacc	1140
acggactcgg gcagcagccc ggcccctgca ccgacctcct gcaccggcta cggccgcacc	1200
ttcaccggga ccctcggcg ccggccgggcc gccgccagc ccaacgggtc ctacgtgcag	1260
gtcaaccggt ccgggaccca cagcgtgtgc ctcaacgggc cctccgggtc ggacttcgac	1320
ctctacgtgc agcgtggaa cggcagctcc tgggtgaccg tcgccagag cacctcccc	1380
gggtccaacg agaccatcac ctaccgggc aacccgggt actaccgta cgtggtcaac	1440
gccgcgtccg gctccgggtc ctacaccatg gggtcaccc tcccctga	1488
<210> 2	
<211> 1404	
<212> DNA	
<213> Cellulomonas strain 69B4	
<400> 2	
aacgagcccc caccaccgg gagcgcgagc gcaccgccac gcctggccga gaagctcgac	60
cccgaacctc tcgaggccat ggagcgcgac ctgggcctcg acgcggagga agccgccgcc	120
accctggcgt tcagcacga cgcagccgag accggcgagg ccctcgccga agagctcgac	180
gaggacttcg ccggcacctg ggtcgaggac gacgtcctgt acgtcgccac caccgacgag	240
gacgccgtcg aggaggtcga gggcgaaggc gccacggccg tcaccgtcga gcactccctg	300
gccgaacctc aggcctggaa gaccgtcctc gacgccgcc tcgagggccga cgacgacgtg	360
cccacctggt acgtcgacgt ccggaccaac agcgtcgtcg tcgccgtcaa ggccggagcc	420
caggacgtcg ccggcgccct cgtcgaaggt gccgacgtcc cgtccgacgc cgtgaccttc	480
gtcgagaccg acgagacccc gcggaccatg ttcgacgtga tcggcggcaa cgcctacacc	540
atcggggggc gcagccgtc ctcgatcggg ttcgggtca acggcgggtt catcaccgcc	600
ggccactgcg gccgcaccgg cgccaccacc gccaacccca ccgggacctt cgccgggtcc	660
agcttcccgg gcaacgacta cgcgttcgtc cgtaccgggg ccggcgtgaa cctgctggcc	720
caggtcaaca actactccgg tggccgcgtc caggtcgccg ggcacaccgc ggccccgtc	780
ggctcggccg tgtccgggtc cgggtcgacc accgggtggc actgcggcac catcactgcg	840

ctcaactcct cggtcaccta ccccaggggc accgtccgcg gcctgatccg caccaccgtc	900
tgcgccgagc cggcgactc cgggtggctcg ctgctcgccg gcaaccaggc ccagggcgtc	960
acgtccggcg gtcgccgcaa ctgccgcacc ggtggcacca cgttcttcca gccggtcaac	1020
cccatcctcc aggcgtacgg cctgaggatg atcaccacgg actcgggcag cagcccggcc	1080
cctgcaccga cctcctgcac cggctacgcc cgcaccttca ccgggacct cgcggccggc	1140
cgggcgcgcg ccagcccaa cgggtcctac gtgcaggtca accggtccgg gacccacagc	1200
glgtgcctca acgggccctc cgggtcggac ttcgacctct acgtgcagcg ctggaacggc	1260
agtccttggg tgaccgtcg ccagagcacc tccccggct ccaacgagac catcacctac	1320
cgcggcaacg ccggctacta ccgctacgtg gtcaacgccg cgtccggctc cgggtgcctac	1380
accatggggc tcacctccc ctga	1404
<210> 3	
<211> 1404	
<212> DNA	
<213> Cellulomonas strain 69B4	
<400> 3	
aacgagcccg caccaccgg gagcgcgagc gcaccgccac gcctggccga gaagctcgac	60
cccgaacctc tcgaggccat ggagcgcgac ctgggcctcg acgcggagga agccgccgcc	120
accctggcgt tccagcacga cgcagccgag accggcgagg ccctcgccga agagctcgac	180
gaggacttcg ccggcacctg ggtcgaggac gacgtcctgt acgtcgccac caccgacgag	240
gacgccgtcg aggaggtcga gggcgaaggc gccacggccg tcaccgtcga gactccctg	300
gccgaacctc aggcctggaa gaccgtctc gacgccccc tcgagggccca cgacgacgtg	360
cccacctggt acgtcgacgt cccgaccaac agcgtcgtcg tcgccgtcaa ggccggagcc	420
caggacgtcg ccgccggcct cgtcgaaggt gccgacgtcc cgtccgacgc cgtgaccttc	480
gtcgagaccg acgagacccc gcggaccatg ttcgacgtga tcggcggcaa cgcctacacc	540
atcggggggc gcagccgctg ctcgatcggg ttcgcggtca acggcgggtt catcacgcc	600
ggccactcgc gccgcaccgg cgccaccacc gccaaccca ccgggacctt cgccgggtcc	660
agtttcccg gcaacgacta cgcgttcgtc cgtaccgggg ccggcgtgaa cctgctggcc	720
caggtcaaca actactcgg tggccgcgtc caggctgccg ggcacaccgc ggccccgtc	780
ggctcggccg tgtgccggtc cgggtcgacc accgggtggc actgcggcac catcactgcg	840
ctcaactcct cggtcaccta ccccaggggc accgtccgcg gcctgatccg caccaccgtc	900
tgcgccgagc cggcgactc cgggtggctcg ctgctcgccg gcaaccaggc ccagggcgtc	960

acgtccggcg gctccggcaa ctgccgcacc ggtggcacca cgttcttcca gccggtcaac 1020
 cccatcctcc aggcgtacgg cctgaggatg atcaccacgg actcgggcag cagcccggcc 1080
 cctgcaccga cctcctgcac cggctacgcc cgcaccttca ccgggaccct cgcggccggc 1140
 cgggcccggc cccagcccaa cgggtcctac gtgcaggta accggtccgg gaccacagc 1200
 gtgtgcctca acgggccctc cgggtcggac ttgcacctct acgtgcagcg ctggaacggc 1260
 agtctctggg tgaccgtcgc ccagagcacc tccccggct ccaacgagac catcacctac 1320
 cgcggcaacg ccggctacta ccgtacgtg gtcaacgccg cgtccggctc cgggtcctac 1380

accatggggc tcacctccc ctga 1404

<210> 4

<211> 567

<212> DNA

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 4

ttcgactga tcggcgcaa cgcctacacc atcggggggc gcagccgctg ctcgatcggg 60
 ttgcgggtca acggcgggtt catcacccgc ggccactgcg gccgcaccgg cgcaccacc 120
 gccaacccca ccgggacctt cgcgggtcc agcttcccg gcaacgacta cgcgttcgtc 180
 cgtaccgggg ccggcgtgaa cctgttgcc caggteaaca actactccgg tggcccgctc 240
 caggtcgccg ggcacaccgc ggccccctc ggctcggccg tgtgccggtc cgggtcgacc 300

accgggtggc actcggcac catcactgcg ctcaactcct cggtcaccta ccccagggc 360
 accgtccgcg gcctgatccg caccaccgtc tgcgccgagc ccggcgactc cgggtggctcg 420
 ctgctcgccg gcaaccaggc ccaggcgctc acgtccggcg gctccggcaa ctgccgcacc 480
 ggtggcacca cgttcttcca gccggtcaac cccatcctcc aggcgtacgg cctgaggatg 540
 atcaccacgg actcgggcag cagccc 567

<210> 5

<211> 83

<212> DNA

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 5

atgacaccac cacagtcacg cgggccctgg ccgtggccac cgcagccgcc acactcctgg 60

caggcggcat ggccgccag gcc 83

<210> 6

<211> 495

<212> PRT

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 6

Met Thr Pro Arg Thr Val Thr Arg Ala Leu Ala Val Ala Thr Ala Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Pro Gly Ser Ala Ser Ala Pro Pro Arg Leu Ala Glu Lys Leu Asp

35 40 45

Pro Asp Leu Leu Glu Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Leu Asp Ala Glu

50 55 60

Glu Ala Ala Ala Thr Leu Ala Phe Gln His Asp Ala Ala Glu Thr Gly

65 70 75 80

Glu Ala Leu Ala Glu Glu Leu Asp Glu Asp Phe Ala Gly Thr Trp Val

85 90 95

Glu Asp Asp Val Leu Tyr Val Ala Thr Thr Asp Glu Asp Ala Val Glu

100 105 110

Glu Val Glu Gly Glu Gly Ala Thr Ala Val Thr Val Glu His Ser Leu

115 120 125

Ala Asp Leu Glu Ala Trp Lys Thr Val Leu Asp Ala Ala Leu Glu Gly

130 135 140

His Asp Asp Val Pro Thr Trp Tyr Val Asp Val Pro Thr Asn Ser Val

145 150 155 160

Val Val Ala Val Lys Ala Gly Ala Gln Asp Val Ala Ala Gly Leu Val

165 170 175

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

180 185 190

Glu Thr Pro Arg Thr Met Phe Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Thr

195 200 205

Ile Gly Gly Arg Ser Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ala Val Asn Gly Gly

210 215 220

Phe Ile Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Thr Gly Ala Thr Thr Ala Asn

225 230 235 240
 Pro Thr Gly Thr Phe Ala Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Val Arg Thr Gly Ala Gly Val Asn Leu Leu Ala Gln Val Asn Asn

 260 265 270
 Tyr Ser Gly Gly Arg Val Gln Val Ala Gly His Thr Ala Ala Pro Val
 275 280 285
 Gly Ser Ala Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
 290 295 300
 Thr Ile Thr Ala Leu Asn Ser Ser Val Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Val
 305 310 315 320
 Arg Gly Leu Ile Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
 325 330 335

 Gly Ser Leu Leu Ala Gly Asn Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly
 340 345 350
 Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Phe Gln Pro Val Asn
 355 360 365
 Pro Ile Leu Gln Ala Tyr Gly Leu Arg Met Ile Thr Thr Asp Ser Gly
 370 375 380
 Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ser Cys Thr Gly Tyr Ala Arg Thr
 385 390 395 400
 Phe Thr Gly Thr Leu Ala Ala Gly Arg Ala Ala Ala Gln Pro Asn Gly

 405 410 415
 Ser Tyr Val Gln Val Asn Arg Ser Gly Thr His Ser Val Cys Leu Asn
 420 425 430
 Gly Pro Ser Gly Ala Asp Phe Asp Leu Tyr Val Gln Arg Trp Asn Gly
 435 440 445
 Ser Ser Trp Val Thr Val Ala Gln Ser Thr Ser Pro Gly Ser Asn Glu
 450 455 460
 Thr Ile Thr Tyr Arg Gly Asn Ala Gly Tyr Tyr Arg Tyr Val Val Asn
 465 470 475 480

Ala Ala Ser Gly Ser Gly Ala Tyr Thr Met Gly Leu Thr Leu Pro

485 490 495

<210> 7

<211> 467

<212> PRT

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 7

Asn Glu Pro Ala Pro Pro Gly Ser Ala Ser Ala Pro Pro Arg Leu Ala

1 5 10 15

Glu Lys Leu Asp Pro Asp Leu Leu Glu Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly

20 25 30

Leu Asp Ala Glu Glu Ala Ala Ala Thr Leu Ala Phe Gln His Asp Ala

35 40 45

Ala Glu Thr Gly Glu Ala Leu Ala Glu Glu Leu Asp Glu Asp Phe Ala

50 55 60

Gly Thr Trp Val Glu Asp Asp Val Leu Tyr Val Ala Thr Thr Asp Glu

65 70 75 80

Asp Ala Val Glu Glu Val Glu Gly Glu Gly Ala Thr Ala Val Thr Val

85 90 95

Glu His Ser Leu Ala Asp Leu Glu Ala Trp Lys Thr Val Leu Asp Ala

100 105 110

Ala Leu Glu Gly His Asp Asp Val Pro Thr Trp Tyr Val Asp Val Pro

115 120 125

Thr Asn Ser Val Val Val Ala Val Lys Ala Gly Ala Gln Asp Val Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Glu Thr Asp Glu Thr Pro Arg Thr Met Phe Asp Val Ile Gly Gly

165 170 175

Asn Ala Tyr Thr Ile Gly Gly Arg Ser Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ala

180 185 190

Val Asn Gly Gly Phe Ile Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Thr Gly Ala

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

 Ala Ala Pro Val Gly Ser Ala Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly
 260 265 270
 Trp His Cys Gly Thr Ile Thr Ala Leu Asn Ser Ser Val Thr Tyr Pro
 275 280 285
 Glu Gly Thr Val Arg Gly Leu Ile Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro
 290 295 300
 Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu Leu Ala Gly Asn Gln Ala Gln Gly Val
 305 310 315 320
 Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Phe

 325 330 335
 Gln Pro Val Asn Pro Ile Leu Gln Ala Tyr Gly Leu Arg Met Ile Thr
 340 345 350
 Thr Asp Ser Gly Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ser Cys Thr Gly
 355 360 365
 Tyr Ala Arg Thr Phe Thr Gly Thr Leu Ala Ala Gly Arg Ala Ala Ala
 370 375 380
 Gln Pro Asn Gly Ser Tyr Val Gln Val Asn Arg Ser Gly Thr His Ser
 385 390 395 400

 Val Cys Leu Asn Gly Pro Ser Gly Ala Asp Phe Asp Leu Tyr Val Gln
 405 410 415
 Arg Trp Asn Gly Ser Ser Trp Val Thr Val Ala Gln Ser Thr Ser Pro
 420 425 430
 Gly Ser Asn Glu Thr Ile Thr Tyr Arg Gly Asn Ala Gly Tyr Tyr Arg
 435 440 445
 Tyr Val Val Asn Ala Ala Ser Gly Ser Gly Ala Tyr Thr Met Gly Leu

450 455 460

Thr Leu Pro

465

<210> 8

<211> 189

<212> PRT

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 8

Phe Asp Val Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Thr Ile Gly Gly Arg Ser Arg

1 5 10 15

Cys Ser Ile Gly Phe Ala Val Asn Gly Gly Phe Ile Thr Ala Gly His

20 25 30

Cys Gly Arg Thr Gly Ala Thr Thr Ala Asn Pro Thr Gly Thr Phe Ala

35 40 45

Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val Arg Thr Gly Ala

50 55 60

Gly Val Asn Leu Leu Ala Gln Val Asn Asn Tyr Ser Gly Gly Arg Val

65 70 75 80

Gln Val Ala Gly His Thr Ala Ala Pro Val Gly Ser Ala Val Cys Arg

85 90 95

Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Thr Ala Leu Asn

100 105 110

Ser Ser Val Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Val Arg Gly Leu Ile Arg Thr

115 120 125

Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu Leu Ala Gly

130 135 140

Asn Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr

145 150 155 160

Gly Gly Thr Thr Phe Phe Gln Pro Val Asn Pro Ile Leu Gln Ala Tyr

165 170 175

Gly Leu Arg Met Ile Thr Thr Asp Ser Gly Ser Ser Pro

180 185

<210> 9

<211> 28

<212>

> PRT

<213> Cellulomonas strain 69B4

<400> 9

Met Thr Pro Arg Thr Val Thr Arg Ala Leu Ala Val Ala Thr Ala Ala

1 5 10 15

Ala Thr Leu Leu Ala Gly Gly Met Ala Ala Gln Ala

20 25

<210> 10

<211> 1488

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic Asp

<400> 10

atgacaccac gaactgtcac aagagctctg gctgtggcaa cagcagctgc tacactcttg 60

gctgggggta tggcagcaca agctaacgaa ccggtcctc caggatctgc atcagcccct 120

ccacgattag ctgaaaaact tgacctgac ttacttgaag caatggaacg cgatctgggg 180

ttagatgcag aggaagcagc tgcaacgtta gcttttcagc atgacgcagc tgaaacggga 240

gaggctcttg ctgaggaact cgacgaagat ttcgcgggca cgtgggttga agatgatgtg 300

ctgtatgttg caaccactga tgaagatgct gttgaagaag tcgaaggcga aggagcaact 360

gctgtgactg ttgagcattc tcttgctgat ttagaggcgt ggaagacggt tttggatgct 420

gcgctggagg gtcatgatga tgtgcctacg tggtagctcg acgtgcctac gaattcggta 480

gtcgttgctg taaaggcagg agcgcaggat gtagctgcag gacttgtgga aggcgctgat 540

gtgccatcag atgcggtcac tttttagaa acggacgaaa cgccatgaac gatgttcgac 600

glaattggag gcaacgcata tactattggc ggccgggtcta gatgttctat cggattcgca 660

gtaaacgggt gcttcattac tgccggtcac tgcggaagaa caggagccac tactgccaat 720

ccgactggca catttgcagg tagctcggtt ccgggaaatg attatgcatt cgtccgaaca 780

ggggcaggag taaatttgct tgccaagtc aataactact cgggcggcag agtccaagta 840

gcaggacata cggccgcacc agttggatct gctgtatgcc gctcaggtag cactacaggt 900

tggcattgct gaactatcac ggcgtgaat tcgtctgtca cgtatccaga gggaacagtc 960

cgaggactta tccgcacgac ggttttgtgcc gaaccaggtg atagcggagg tagcctttta 1020
gcgggaaatc aagcccaagg tgtcacgtca ggtgggttctg gaaattgtcg gacgggggga 1080
acaacattct ttcaaccagt caacccgatt ttgcaggctt acggcctgag aatgattacg 1140
actgactctg gaagttcccc tgctccagca cctacatcat gtacaggcta cgcaagaacg 1200
ttcacaggaa ccttcgcagc aggaagagca gcagctcaac cgaacggtag ctatgttcag 1260
gtcaaccgga gcggtacaca ttccgtctgt ctcaatggac ctagcgggtgc ggactttgat 1320
ttgtatgtgc agcgatggaa tggcagtagc tgggtaaccg tcgctcaatc gacatcgccg 1380

ggaagcaatg aaaccattac gtaccgcgga aatgctggat attatcgcta cgtggttaac 1440
gctgcgtcag gatcaggagc ttacacaatg ggactcacc tcccttga 1488

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic Asp

<400> 11

Met Arg Ser Lys Lys Arg Thr Val Thr Arg Ala Leu Ala Val Ala Thr

1 5 10 15

Ala Ala Ala Thr Leu Leu Ala Gly Gly Met Ala Ala Gln Ala

20 25 30

<210> 12

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

tcatgcaggg taccatgaga agcaagaagc gaactgtcac aagagctctg gct 53

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gtgtgcaagc tttcaagggg aacttcaga gtcagtc 37

<210> 14
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 tgagctgcta gcaaaaggag agggtaaaga atgagaagca agaag 45

<210> 15
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 catgcatccc gggtaaggga gaacttccag agtcagtc 38

<210> 16
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 tatcggattc gcagtagagg gtggcttcat tactgccgg 39

<210> 17
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 tatcggattc gcagtagccg gtggcttcat tactgccgg 39

<210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 18
tatcggattc gcagtaacag gtggcttcat tactgccgg 39

<210> 19
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 19
tatcggattc gcagtacaag gtggcttcat tactgccgg 39

<210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 20
cggtcactgc ggagagacag gagccactac tgcc 34

<210> 21
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 21
cggtcactgc ggagacacag gagccactac tgcc 34

<210> 22
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 22
ccgaacaggg aaaggagtac tgttgcttgc ccaagtcaat aac 43

<210> 23
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 23
 ccgaacaggg aaaggagtat ctttgcttgc ccaagtcaat aac 43

<210> 24
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 ccgaacaggg aaaggagtag ctttgcttgc ccaagtcaat aac 43

<210> 25
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 taactactcg ggcgacagag tccaagtagc aggacataaa gcc 43

<210> 26
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 gtctttggac ttatcacaac gacggtttgt gccgaacc 38

<210> 27
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 27
 gtctttggac ttatcaaaac gacggtttgt gccgaaccag 40

<210> 28
 <211> 38

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 28
 gtccgaggac ttatctacac gacggtttgt gccgaacc 38
 <210> 29
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 29
 ggtggttctg gaaattgttt cacgggggga acaacattc 39

 <210> 30
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 30
 ggtggttctg gaaattgtga gacgggggga acaacattc 39
 <210> 31
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 31
 ggtggttctg gaaattgtaa cacgggggga acaacattc 39
 <210> 32
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 32
 ggtggttctg gaaattgtaa gacgggggga acaacattc 39

<210> 33

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

aggtagctcg ttccggaca atgattatgc attcgccg

39