



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0067336
(43) 공개일자 2015년06월17일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 9/20</i> (2006.01) <i>C11D 3/386</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12N 9/20</i> (2013.01)
<i>C11D 3/38627</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7012047</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년10월11일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년05월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2013/064672</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/059360
국제공개일자 2014년04월17일</p> <p>(30) 우선권주장
61/713,436 2012년10월12일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
다니스코 유에스 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토 페이지 밀 로드 925</p> <p>(72) 발명자
그레이카 토마스 피
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.
프리셀리우스 시나
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인코리아나</p> |
|--|--|

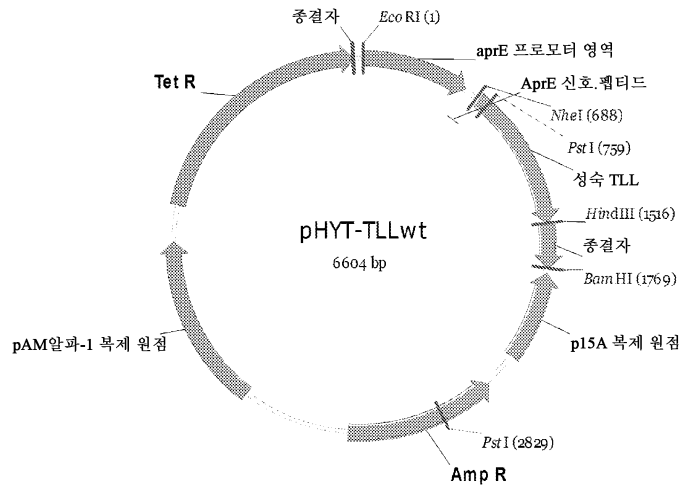
전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 지방분해 효소 변이체를 포함하는 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 지방분해 효소 변이체를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 적어도 하나의 향상된 특성을 갖는 모 지방분해 효소와 비교할 때 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소 변이체를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 지방분해 효소 변이체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 지방분해 효소 변이체를 포함하는 조성물을 사용하여 세정하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

플로스 아이루카란 제이

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

에스텔 데이비드 에이

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

명세서

청구범위

청구항 1

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모(parent) 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치(productive position)에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성(micro-swatch activity), pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제(detergent) 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(performance index, PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 생산 위치는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 176, 179, 180, 181, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 202, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 236, 237, 238, 239, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 및 269로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 (*Thermomyces lanuginosus*) 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 2

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 50% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 생산 위치는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252, 및 264로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 3

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 30% 이상이지만 50% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 생산 위치는 18, 19, 20, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50, 53, 56, 60, 73, 74, 85, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 115, 125, 127, 128, 132, 133, 151, 159, 164, 179, 183, 187, 188, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 251, 254, 263, 267, 및 269로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 4

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상이지만 30% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 생산 위치는 7, 11, 12, 15, 22, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 61, 63, 65, 67, 76, 77, 84, 87, 114, 117, 119, 121, 134, 135, 136, 143, 154, 155, 156, 158, 165, 166, 168, 176, 180, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 217, 221, 224, 225, 228, 229, 231, 233, 248, 249, 253, 255, 256, 265, 및 268로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 5

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 하나 이상의 변형이지만 15% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 생산 위치는 14, 16, 17, 34, 41, 55, 57, 59, 62, 70, 79, 92, 100, 102, 103, 106, 109, 110, 112, 118, 126, 138, 139, 142, 149, 152, 153, 167, 169, 170, 181, 184, 192, 193, 196, 198, 205, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 226, 227, 230, 236, 238, 239, 242, 243, 246, 257, 259, 260, 262, 및 266로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 6

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 50% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 생산 변형(productive modification)은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 및 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 7

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 30% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 생산 변형은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T);
 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y);
 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q);
 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W);
 53(Y,E,G,H,K,L,S,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W);
 60(V,G,K,L,Y); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y);
 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y);
 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q);
 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y);
 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y);
 164(Y,D,N,R,S,V); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);
 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S);
 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 254(D,A,H,K,N,P,T); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T);
 267(T,G,I,L,M,P,W); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 8

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 생산 변형은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T);
 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y);
 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y);
 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 15(Q,G,H,M,S); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W);
 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W);
 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y);
 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y);
 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R);
 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y);
 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y);
 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R);
 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V);
 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W);
 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V);
 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R);
 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 143(T,A,G,N,S);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);
 166(I,D,G,W); 168(V,G,L,Q); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T);
 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V);
 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 209(R,H,S,T);
 211(F,I,R,T,W); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V);
 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 231(T,G,H,K,L,M);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 248(N,D,L,Y);
 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V);
 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및
 269(L,D,F,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된
 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 9

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나는 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 생산 변형은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T);
 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y);
 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y);
 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 14(A,S,V); 15(Q,G,H,M,S); 16(Y,H,W); 17(S,E);
 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M);
 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 34(I,P); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 41(C,V); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 55(F,G,W); 56(E,H,K,R,T,V); 57(D,S); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 59(G,D);
 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R); 62(D,N); 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y);
 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W);
 70(D,S); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S);
 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 79(S,A,M);
 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T); 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y);
 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 92(N,A,T); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V);
 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W);
 100(I,M); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 102(D,H); 103(I,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 106(G,H); 108(R,E,F,K,M,Q,Y);
 109(G,T); 110(H,N,S); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 112(G,F,Q); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V);
 117(W,H,K,Q,V); 118(R,P); 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q);
 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 126(Q,I,M);
 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T);
 136(P,D,Q,R); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 138(Y,F); 139(RLT);
 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 142(F,H,Y); 143(T,A,G,N,S); 149(G,A); 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 152(A,I,V);
 153(T,S); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);
 166(I,D,G,W); 167(D,N); 168(V,G,L,Q); 169(F,S,Y); 170(S,G); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V);
 180(A,D,K,Q,T); 181(F,L); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 184(F,W,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);
 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 192(T,N,P); 193(L,T);
 196(I,V); 198(H,G,S); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 205(R,D); 206(L,N); 208(P,E,N);

209(R,H,S,T); 210(E,S); 211(F,I,R,T,W); 212(G,Q); 213(Y,S); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 218(P,T); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 226(T,D,N); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 230(V,W); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 236(V,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 238(I,V); 239(E,K); 242(D,T); 243(A,S); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 246(G,I); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 257(A,W,Y); 259(L,W,Y); 260(W,P); 262(F,D,K); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 266(G,E); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 10

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 상기 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나는 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 생산 변형은 11(A,E,I), 23(A), 24(Q,S), 27(K,L), 29(N), 30(E,G,I,S,Y), 31(T), 33(C,I,P,T,V), 45(A,G,S,T), 48(N,R,T,V), 49(C,Y), 50(M), 51(H,V), 56(A,M,N,S), 58(A,F), 71(C,F,P), 73(Q,T), 74(I,M,T,W), 75(K), 91(K,N,Y), 94(A,H), 101(A), 108(A), 111(G,H,I,K,M,S,Y), 122(K,L,Q), 128(T,V), 130(K,M), 133(D,H,L,W), 135(A,D,M,N,Y), 140(Y), 159(G), 163(Q), 183(C), 187(C,I), 188(A,M,W), 190(W), 227(A,I,S), 233(F,I,V), 251(V), 및 252(M,V)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 11

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 모두를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 변형은 1 (A,D,F,I,N,P,S,W,Y), 2 (I,L), 3 (D,G,Y), 4 (D,F,W), 5 (H,I,L,S,T,V,Y), 6 (I,T), 7 (Y), 8 (G,H,I,L,M,T,V,W,Y), 9 (H,K), 11 (V), 13 (H,N), 14 (S), 16 (W), 17 (E), 18 (K), 19 (G), 20 (T), 23 (D,E,H,I,K,N,Q,T,V), 24 (A,D,E,H,I,L,N,P,T,V,W), 25 (I,L,T), 26 (G,K,M,S,T,V,W,Y), 27 (A,E,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y), 28 (D,E,I,N,S), 29 (E,H,K,L,M,R,T,V), 31 (D,H,S), 33 (D,E,F,L,Q,R,S), 34

(P), 37 (D,E,G,I,K,P,Q,W), 38 (D,F,H,I,K,L,M,N,Y), 39 (E,H,I,L,S,V), 40 (M,S), 42 (G,I,W), 43 (R,T), 44 (I), 45 (F,V), 46 (D,L,M), 47 (H), 48 (E,H,P,Q), 49 (V), 50 (L,R,S), 51 (A,E,G,I,L,M,S), 52 (A,G,I,V), 54 (P,T,V), 56 (H,K,R,T), 58 (M), 60 (G), 63 (T), 64 (G), 66 (H,M,W), 67 (I,V), 68 (G,I,S,T,V), 69 (I,K,S,T), 70 (S), 71 (D,H,K,Q,R,S,T), 72 (A,D,E,F,H,I,L,N,R,S,V,Y), 73 (H,R,S), 74 (H,S), 75 (A,E,G,H,I,Q,S,T,V), 79 (A), 85 (T), 86 (P,T), 87 (G), 90 (A,E,F,N), 91 (E,H,I,M,Q,R), 92 (T), 94 (R), 95 (G,Q,V,W), 96 (A,K), 97 (D,T), 98 (Q), 99 (D,S,T,W), 101 (D,H,Y), 105 (K), 108 (K,Q,Y), 111 (A,E,L,Q,T,V), 114 (F,I,M,V), 115 (T), 118 (P), 119 (T), 120 (Y), 121 (K), 122 (H,I), 123 (G,M,N,W), 125 (G,Q), 127 (G,T), 130 (A,G,H,T), 131 (H,I,Q), 132 (H,R), 134 (L,V), 135 (K), 137 (E,G,H,K,Q,T,Y), 139 (T), 151 (I,T,V), 154 (I,L), 155 (G,S), 158 (E,F), 162 (G,R), 163 (N,P,Y), 164 (V), 166 (G), 176 (I,L), 179 (L,Q,V), 180 (K), 181 (L), 187 (G,H,L,N,Q,S,T,W), 188 (C,T), 189 (D,G,N,Q,R,S), 191 (F,L,V), 196 (V), 199 (G), 202 (P,V), 208 (E), 211 (I,W), 216 (N,W), 217 (K), 223 (Q,S,T,V), 225 (E,K,R), 227 (M), 228 (R), 232 (I,M,T), 233 (D,G,H,Q), 237 (I,L,Y), 242 (T), 244 (I), 250 (Q,R), 251 (D,W), 252 (A,D,G,H,Q,R,S,T), 255 (L), 256 (A,S), 257 (Y), 262 (D), 264 (E,M,N,P,Q,R), 265 (M,Q), 267 (L,W), 및 269 (D,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 12

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 a)와 b) 둘 모두를 만족하지만 c)를 만족하지는 않는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 변형은 1 (Q,T), 2 (F,G,M,P), 3 (K,T), 4 (A,G,I,K,L,M,N,R,S), 5 (K,W), 6 (E,M), 8 (A,E), 9 (E,G,N,R), 11 (H,K,Y), 12 (F,H,V), 13 (Q), 15 (S), 18 (Q), 19 (C), 20 (G,S), 23 (C,F,L,M,S,W), 24 (Y), 25 (C,H,K), 26 (C), 27 (F), 28 (H,M,P,Q,R), 29 (Q,W,Y), 30 (D,V), 31 (E,Q), 32 (A,I,M,R,S), 35 (K), 37 (C), 38 (V,W), 39 (P,T,Y), 40 (W), 42 (V), 43 (D,M), 45 (Q), 46 (F,G,V,W), 47 (T), 50 (A), 51 (N,R,T), 52 (E,R,W), 53 (E,G,H,K,S), 54 (R,Y), 55 (G), 56 (V), 64 (C,E,N,V), 66 (N,Q,R), 67 (Q), 69 (A,G,H,N,W), 71 (V,W,Y), 72 (P), 73 (E,G,K), 74 (N,Q), 75 (D,N,R,Y), 76 (H), 77 (I,L,N,T), 86 (L,M), 87 (P,V), 90 (Q,T), 91 (F), 94 (D), 97 (Q), 98 (D,E,I), 99 (K), 105 (A,D,E,P), 108 (E,M), 122 (E,N), 123 (E,L,Q), 125 (N,T), 126 (I), 127 (E,F,R), 128 (H,S), 130 (F,Q), 131 (R,W,Y), 132 (D,K,W), 133 (E,Q), 135 (F,T), 136 (D,Q), 137 (S,V), 139 (L), 140 (F,M,Q,T), 143 (A,G,S), 149 (A), 151 (N), 154 (F), 156 (F,W), 158 (Y), 159 (E), 163 (S,W), 164 (N,S), 165 (I), 166 (D,W), 167 (N), 168 (L), 179 (E,I), 183 (V), 188 (H), 189 (K,V), 200 (A), 205 (D), 209 (S,T), 214 (D), 216 (G,Q), 217 (H), 218 (T), 223 (M), 226 (N), 228 (E), 229 (K), 231 (K,L,M), 252 (K,L,N), 254 (H), 255 (F), 256 (T), 263 (I,V), 264 (H,S,T), 267 (P), 및 269 (F)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 13

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 a)를 또는 b)와 c) 둘 모두를 만족하지만 세 가지 모두를 만족하지는 않는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 변형은 1 (E,R,V), 2 (V,H,T), 3 (S,E,Q), 4 (Q,Y), 5 (D), 6 (L,Q,V), 7 (F), 8 (N), 9 (Q,A,I), 11 (N), 12 (L), 13 (F), 14 (A), 15 (Q), 16 (Y), 17 (S), 18 (A,C,H,S), 19 (A,T), 20 (A,P), 22 (C), 23 (G,P), 24 (K,F), 25 (N,A,D,G,V,W), 26 (N,L,Q), 27 (D), 28 (A,F,G,L), 29 (P,C,I), 30 (A,H,R,W), 31 (G), 32 (T,Q), 33 (N,K), 34 (I), 35 (T,E,R), 37 (T,A,F,L,M), 38 (G,T), 39 (N), 40 (A), 41 (C), 42 (P), 43 (E,I), 44 (V,H,T), 45 (E), 46 (K,E), 47 (A,D,E,F,M), 48 (D), 49 (A,H,K), 50 (T,D,W), 51 (F), 52 (L,T), 53 (Y,L,W), 54 (S), 55 (F), 56 (E), 57 (D), 58 (S,G,H,K,Q,W), 59 (G), 60 (V), 61 (G,L), 62 (D), 63 (V), 64 (T,D,I,L), 65 (G,V), 66 (F,I,L,V), 67 (L), 68 (A,C,W), 69 (L), 70 (D), 71 (N,E), 72 (T,K), 73 (N), 74 (K,A,D,G), 75 (L), 76 (I,V), 77 (V,A), 79 (S), 84 (R), 85 (S,H,N,Q), 86 (I,V,Y), 87 (E,D), 90 (I,V), 91 (G), 92 (N), 93 (L,D,K,Q,R), 94 (N,G,T,V), 95 (F,K,L), 96 (D), 97 (L,A,M), 98 (K,H), 99 (E), 100 (I), 101 (N), 102 (D), 103 (I), 105 (S,W), 106 (G), 108 (R,F), 109 (G), 110 (H,S), 111 (D), 112 (G), 114 (T), 115 (S,G,M,R,V), 117 (W,H,V), 118 (R), 119 (S,D,I), 120 (V,G,H,N,S,W), 121 (A), 122 (D,A,F), 123 (T), 125 (R,Y), 126 (Q), 127 (K), 128 (V,C,I), 130 (D,V,W,Y), 131 (A,K,S,T), 132 (V,Q), 133 (R,I), 134 (E), 135 (H), 136 (P), 137 (D,I,R,W), 138 (Y), 139 (R), 140 (V), 142 (F,H,Y), 143 (T), 149 (G), 151 (L,M,W), 152 (A), 153 (T,S), 154 (V), 155 (A), 156 (G,M), 158 (D), 159 (L,Q,R), 162 (N,D,E,F,H,I,K,Q,S), 163 (G,F,L), 164 (Y), 165 (D), 166 (I), 167 (D), 168 (V,G), 169 (F,S), 170 (S), 176 (V), 179 (R,H,K), 180 (A,T), 181 (F), 183 (E), 184 (F,Y), 187 (V), 188 (Q), 189 (T), 190 (G), 191 (G), 192 (T), 193 (L,T), 196 (I), 198 (H,G,S), 199 (T), 200 (N,S), 202 (I,L), 205 (R), 206 (L), 208 (P), 209 (R,H), 210 (E), 211 (F,R,T), 212 (G), 213 (Y), 214 (S,A), 216 (S,V), 217 (S,V), 218 (P), 221 (W), 223 (K,A), 224 (S), 225 (G), 226 (T), 227 (L,H), 228 (V), 229 (P), 230 (V,W), 231 (T,H), 232 (R,P), 233 (N), 236 (V), 237 (K,H,T,W), 238 (I), 239 (E), 242 (D), 243 (A), 244 (T,Q,S), 246 (G), 248 (N), 249 (Q), 250 (P,S), 251 (N), 252 (I,C,E), 253 (P,R), 254 (D,T), 255 (I), 256 (P), 257 (A), 259 (L), 260 (W), 262 (F), 263 (G,K), 264 (L,C,G), 265 (I), 266 (G), 267 (T,G,M), 268 (C,H), 및 269 (L)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 14

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 b)를 만족하지만 a) 또는 c)를 만족하지는 않는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 변형은 2 (K), 3 (A,H), 4 (P), 6 (K,Y), 7 (H), 9 (D,W), 12 (W), 13 (A,M,Y), 15 (M), 16 (H), 20

(Q), 22 (H), 23 (R), 25 (S), 29 (G,S), 30 (L,N), 33 (M), 37 (H), 39 (Q), 40 (F), 47 (W), 48 (G), 50 (F,K), 51 (D,P,Y), 52 (M), 54 (F,G,K,W), 55 (W), 58 (I), 60 (L), 64 (K,R,Y), 65 (L), 66 (G,Y), 67 (H), 68 (Y), 69 (D), 75 (M), 84 (H), 86 (Q), 90 (Y), 92 (A), 93 (I,P,V), 94 (S), 95 (H,T), 96 (V), 98 (M), 100 (M), 115 (N), 117 (Q), 122 (S,T,Y), 125 (I), 126 (M), 127 (D), 128 (Y), 130 (C,R), 132 (I), 134 (P), 140 (C), 151 (P), 152 (V), 156 (T), 164 (D,R), 165 (Y), 188 (F), 208 (N), 213 (S), 216 (D), 227 (C), 229 (I), 232 (C,L), 237 (E), 249 (E), 250 (E), 252 (F), 254 (A,K), 257 (W), 및 267 (I)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 15

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 c)를 만족하지만 a) 또는 b)를 만족하지는 않는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서 변형은 1 (C,L), 3 (R), 6 (A,H), 7 (M,V), 8 (K), 9 (Y), 13 (K,T,V), 14 (V), 15 (G,H), 18 (M,N,W), 19 (I,L,V,W), 20 (I), 22 (L,M), 24 (M,R), 25 (E), 31 (M,P,V), 37 (R,Y), 38 (A,E), 39 (C,W), 41 (V), 42 (C), 48 (L), 49 (G,L,W), 54 (E,H,M), 57 (S), 58 (D,R), 59 (D), 60 (K,Y), 61 (A,D,R), 62 (N), 63 (K,Q), 65 (Y), 66 (A,S,T), 74 (E), 76 (S), 79 (M), 84 (Q,W), 85 (F,I), 87 (A), 93 (H,N,W), 94 (K,M,P), 96 (P,R), 97 (I), 99 (P,Q), 101 (C,E,M), 102 (H), 103 (Y), 105 (F), 106 (H), 109 (T), 110 (N), 111 (F,W), 112 (F,Q), 115 (I,L), 117 (K), 119 (Q,V), 120 (I), 121 (Q), 123 (I,K), 125 (C), 128 (L,N,W), 130 (E), 131 (C,N), 132 (C), 133 (F,N,V), 136 (R), 137 (A,F,L,M,N,P), 138 (F), 140 (E,I,L,N), 143 (N), 152 (I), 154 (M,Y), 155 (T), 159 (M,W), 162 (M,P,Y), 163 (A,M,R), 165 (P), 168 (Q), 169 (Y), 170 (G), 176 (F,N,W), 180 (D,Q), 183 (H,M,Q,S,T,Y), 184 (W), 188 (E,R), 189 (E,M), 190 (D,H,R,S,Y), 192 (N,P), 199 (N,V), 200 (P), 202 (M), 206 (N), 210 (S), 212 (Q), 214 (M), 221 (F,G,Y), 223 (H,L), 224 (A,F,P), 225 (C), 226 (D), 228 (A), 229 (M,S), 231 (G), 232 (D,W), 236 (W), 238 (V), 239 (K), 243 (S), 244 (A,F,L,M,P), 246 (I), 248 (D,L,Y), 249 (G,T), 250 (D,G,K,T), 251 (M,Q,S,T,Y), 252 (W), 253 (F,H,N), 254 (N,P), 255 (W), 256 (D), 259 (W,Y), 260 (P), 262 (K), 263 (C,H,M), 265 (L,R,W), 266 (E), 및 268 (D,N)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 16

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 표면 노출 잔기(surface exposed residue)에 있고 적합한 소수성 또는 전하 표면 변형 위치이며, 상기 적합한 표면 변형 위치를 갖는 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상

이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 잔기 위치는 18, 27, 29, 33, 51, 58, 72, 75, 101, 108, 114, 121, 135, 137, 156, 163, 187, 250, 252, 및 264로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모파 이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 변형은 A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, F051T, S058M, T072R, L075Q, N101D, R108K, R108Q, R108Y, T114F, T114I, A121K, H135F, D137V, G156W, G163Y, V187N, V187W, P250E, I252A, I252T, 또는 L264P인, 변이체.

청구항 18

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성화 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 표면 노출 잔기에 있고 적합한 소수성 표면 변형 위치이며, 상기 적합한 표면 변형 위치를 갖는 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성화 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 잔기 위치는 18, 27, 29, 33, 51, 58, 72, 75, 101, 108, 114, 121, 135, 137, 156, 163, 187, 250, 252, 및 264로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모파 이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 변형은 A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, F051T, S058M, T072R, L075Q, N101D, R108K, R108Q, R108Y, T114F, T114I, A121K, H135F, D137V, G156W, G163Y, V187N, V187W, P250E, I252A, I252T, 또는 L264P인, 변이체.

청구항 20

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성화 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 표면 노출 잔기에 있고 적합한 전하 표면 변형 위치이며, 상기 적합한 표면 변형 위치를 갖는 지방분해 효소 변이체는 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성화 단편:

a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑 활성화, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성화, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상

이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 잔기 위치는 18, 27, 29, 33, 72, 101, 108, 121, 137, 및 250로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 변형은 A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, T072R, N101D, R108Q, R108Y, A121K, D137V, 또는 P250E인, 변이체.

청구항 22

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 반 투여량(half dose)에서의 세제 성능에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (S), 5 (H, I, S, T), 8 (H), 9 (K, N), 11 (H, K), 13 (N), 19 (G), 23 (K, N, Q, R), 27 (Q, R), 29 (K, R), 32 (A), 33 (D), 37 (G, H, Q), 38 (F, L, M, W, Y), 39 (I, L), 42 (W), 43 (D, I, R, T), 45 (F, Q, V), 51 (M), 53 (E), 54 (P), 56 (H, K, R), 58 (H, K, Q, W), 69 (R), 73 (R), 75 (A, R), 75 (T), 77 (I, L, T), 90 (F, T), 91 (I, Q), 94 (R), 105 (P), 108 (K), 122 (F), 125 (T), 130 (A, R), 132 (K, R), 134 (L), 137 (R), 151 (T), 155 (S), 156 (W), 163 (F, P), 164 (R), 180 (K), 183 (V), 184 (Y), 187 (G, H, N, Q, S, T, W), 189 (G, Q), 211 (I), 214 (A), 228 (R), 232 (P), 233 (Q), 244 (I), 252 (N), 및 265 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 23

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 보조제(adjuvant)와 함께 반 투여량에서의 세제 성능에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (S), 3 (T), 4 (F), 5 (H, I, S, T), 8 (H, T, V), 9 (G, H, K), 11 (K), 12 (V, W), 18 (K), 19 (G), 23 (K, Q, R), 27 (R, S), 32 (I), 38 (F, L, M, W, Y), 39 (I, P), 43 (I, R, T), 45 (F, Q), 53 (K), 54 (P), 56 (K, R), 58 (H, Q), 75 (G, Q, R), 77 (I), 90 (T), 91 (I, Q), 105 (P), 123 (N), 127 (F), 130 (A, F, H, Q, R), 131 (R), 136 (Q), 137 (R, S), 143 (S), 156 (T), 162 (G), 163 (S), 164 (R, V), 166 (G), 180 (K), 187 (G, H, N, Q, S, T, W), 188 (F), 189 (D, G), 199 (G), 228 (R), 252 (N), 264 (R), 및 265 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 24

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 전 투여량(full dose)에서의 세제 성능에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형은 1 (S), 5 (H, I, T), 23 (E, Q), 29 (H, I, R, T), 39 (H, I), 43 (R, T), 54 (T), 58 (Q), 115 (T), 130 (A, R), 154 (L), 158 (E), 180 (K), 187 (T), 228 (R), 및 269 (W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 25

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 pH 8에서의 pNPO 기질의 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 2 (I), 11 (K), 15 (S), 18 (K), 23 (C, D, E, F, H, I, K, M, N, Q, S, T, V), 24 (H), 26 (T), 27 (A, G, H, N, Q, R, S, T, V), 29 (E), 37 (P), 48 (E, Q), 50 (S), 51 (A, I, L, S, T), 56 (K, V,), 58 (M), 66 (N, Q), 75 (A, G, Q, R), 77 (I, T), 91 (E,

Q), 94 (R), 96 (K), 99 (D, S), 101 (D, H), 108 (K, M, Y), 111 (A, E, Q), 114 (F, I, V), 117 (Q), 120 (N), 121 (K), 135 (F), 137 (I, Q, R), 154 (F, I, L), 155 (G, S), 156 (W), 163 (F), 169 (S), 176 (I), 187 (H, N, W), 226 (N), 250 (E), 252 (A), 256 (T), 264 (C, H, M, P, Q, S), 265 (M), 및 269 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 26

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 pH 8에서의 pNPO 기질의 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 12 (F), 13 (Q), 15 (S), 19 (C, G), 20 (P), 23 (D, E, F, I, V), 24 (W), 26 (C, T, W, Y), 28 (D, P), 31 (E), 34 (P), 37 (C, D), 39 (E, L, P), 42 (I, V), 45 (F, V), 46 (F, G, L, W), 47 (F, M, T, W), 49 (H, V), 51 (A, G, I, L, M, S, T), 60 (L), 64 (V), 66 (Q), 68 (S, T, V), 73 (E, G, R, S), 75 (E, G, Q, R), 77 (A, L, N, T), 91 (E, Q), 94 (D), 108 (E, F, M, Q, Y), 114 (F, I, V), 127 (T), 128 (H, S, Y), 131 (R, W, Y), 132 (D), 133 (E, Q), 136 (D, Q), 139 (M), 140 (F, M, Q), 142 (Y), 154 (I), 155 (S), 156 (W), 159 (E, R), 163 (F, L, P, Y), 168 (G, L), 179 (L), 187 (H, N, Q, T), 188 (F), 189 (D), 205 (D), 208 (E), 209 (S), 214 (D), 223 (T), 225 (E), 228 (E), 237 (L, Y), 250 (E), 251 (D), 252 (A), 256 (T), 264 (C, H, P, Q, S), 및 265 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 27

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 pH 8에서의 pNPO 기질의 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 LAS 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (F, R), 4 (K, L, N, W), 5 (K), 11 (K), 23 (K), 27 (A, H, N, R, S, T, V), 37 (P), 38 (H, K, L, W, Y), 42 (V), 43 (I, R), 45 (F, Q, V), 47 (T), 49 (V), 51 (I, M, S), 56 (H, K, S, T), 58 (M, Q), 73 (S), 75 (D, E, G, Q, R), 91 (Q), 94 (R), 101 (D), 108 (K), 111 (A), 119 (D, T), 120 (Y), 154 (I), 179 (L), 187 (T), 189 (D, Q), 200 (A), 209 (S), 211 (W), 226 (N), 250 (E, Q), 251 (W), 252 (A), 및 256 (T)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 28

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 2 (I,L), 3 (D), 4 (D,I,L,W), 5 (H,Y), 8 (H,M), 9 (K), 11 (H,K), 18 (K), 23 (K), 24 (A,T), 26 (K,T), 27 (A,I,Q,T), 29 (H,I,K,R,T,V), 30 (R,V), 32 (S), 35 (K), 37 (G), 40 (M), 54 (V), 69 (A,K), 71 (R), 72 (L), 74 (A), 75 (M,S), 91 (I), 94 (R), 101 (Y), 108 (K,Y), 111 (L,T,V), 114 (I), 122 (T,Y), 123 (Q), 125 (Q), 130 (F,H), 132 (H,W), 134 (L,V), 137 (H,K,S,T,W,Y), 151 (T,W), 155 (G), 156 (W), 162 (G), 163 (Y), 166 (G), 176 (I), 180 (K), 187 (H,S,T,W), 189 (K), 232 (L,P), 233 (D,H), 237 (L,Y), 244 (I), 252 (L,T), 255 (L), 263 (I,V), 265 (M), 및 269 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 29

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPO 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (D), 2 (L), 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,Y), 8 (A,E,M), 9 (R), 18 (K), 23 (D,E,F,N,Q), 24 (A,D,E,H,N,T), 26 (G,K), 27

(A,E,I,N,Q,T), 29 (E,Q,R), 33 (D,E,F,M,Q,R,S), 37 (D,E,P,Q), 38 (D,N), 40 (M), 48 (E,Q), 49 (V), 50 (E,F), 51 (I,L,T), 54 (F,R), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 64 (N), 66 (Q), 74 (Q), 75 (E,M,N,Q,R), 77 (A,I,L,T), 87 (P), 90 (E,F,Q), 101 (D), 105 (D,P), 108 (K,Q,Y), 111 (A,E,L,Q,T), 114 (F,M), 115 (R), 117 (Q), 120 (N), 122 (Y), 123 (E,L,M,N,Q), 125 (Q), 127 (E,F,R), 130 (A,F,H,Q), 132 (K,Q,R), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,T,V,W,Y), 154 (F,L), 155 (G,S), 156 (F,W), 158 (E,F,Y), 162 (G,R), 163 (F,P,S,W,Y), 169 (S), 176 (I), 180 (K), 187 (H,N,Q,S,T,W), 189 (D,Q,R), 225 (E), 227 (M), 228 (E), 232 (P), 233 (D,G,Q), 264 (E,M,N,P,Q,R,S,T), 265 (M), 및 269 (M,Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 30

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (Q,S), 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,S,Y), 9 (M), 11 (K), 12 (F), 15 (S), 23 (F), 27 (E,N,Q,T), 29 (R), 32 (A,Q,S), 33 (D,Q), 35 (E,K,R), 40 (M), 48 (Q), 51 (I,L,M,T), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 71 (E), 75 (R), 77 (I,T), 87 (P), 105 (A), 108 (K), 111 (A,L), 114 (M), 115 (R), 127 (E,F), 130 (A), 132 (Q,R,W), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,Y), 143 (A), 155 (S), 162 (G), 163 (F,P,S,W,Y), 164 (D,R), 165 (I,Y), 187 (H,N,Q,S,W), 189 (R), 225 (E), 227 (A,M), 232 (P), 233 (Q), 244 (I), 252 (A,K,L,R), 263 (I,V), 264 (H,R,T), 및 269 (V)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 31

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB 및 pNPO 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 2 (L), 3 (D), 4 (D,L), 5 (H,Y), 8 (M), 18 (K), 24 (A,T), 26 (K), 27 (A,I,Q,T), 29 (R), 40 (M), 75 (M), 108 (K,Y), 111 (L,T), 122 (Y), 123 (Q), 125 (Q), 130 (F,H), 134 (L), 137 (H,K,S,T,W,Y), 155 (G), 156 (W), 162 (G), 163 (Y), 176 (I), 180 (K), 187 (H,S,T,W), 232 (P), 233 (D), 265 (M), 및 269 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 32

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPO 및 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,Y), 23 (F), 27 (E,N,Q,T), 29 (R), 33 (D,Q), 40 (M), 48 (Q), 51 (I,L,T), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 75 (R), 77 (I,T), 87 (P), 108 (K), 111 (A,L), 114 (M), 115 (R), 127 (E,F), 130 (A), 132 (Q,R), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,Y), 155 (S), 162 (G), 163 (F,P,S,W,Y), 187 (H,N,Q,S,W), 189 (R), 225 (E), 227 (M), 232 (P), 233 (Q), 및 264 (R,T)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 33

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB, pNPO 및 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 3 (D), 4 (D,L), 5 (H), 5 (Y), 27 (Q,T), 29 (R), 40 (M), 108 (K), 111 (L), 134 (L), 137 (H,K,S,Y), 162 (G), 163 (Y), 187 (H,S,W), 및 232 (P)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된

썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 34

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이하이고 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (Q), 9 (M), 12 (F), 15 (S), 23 (F), 27 (E), 32 (Q), 35 (E), 48 (Q), 58 (M, Q), 71 (E), 75 (R), 115 (R), 130 (A), 132 (Q, R), 137 (E, I, Q, R), 143 (A), 155 (S), 163 (F, P, S), 164 (D), 165 (I, Y), 187 (Q), 225 (E), 227 (A, M), 233 (Q), 252 (A, K,R), 264 (H, R, T), 및 269 (V)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 35

지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하고, 상기 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pH 6에서의 pNPO 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (Q,S), 2 (L), 3 (T), 4 (A, D, L, M), 5 (H, Y), 9 (K), 11 (K), 12 (F), 15 (S), 24 (A, D, E, H, N), 27 (A, E, Q, T), 29 (R), 32 (A), 33 (D, F, Q), 38 (D), 40 (M), 48 (Q), 49 (V), 51 (I, L, M, T), 56 (H, K, T), 58 (M, Q), 69 (A), 75 (R), 77 (T), 91 (Q), 94 (R), 98 (I), 105 (A), 108 (K, Y), 111 (A, L), 114 (I, M, V), 121 (K), 123 (E, L, M, N, Q), 125 (Q), 127 (E, F), 130 (A, H), 132 (R), 134 (L), 137 (E, G, H, I, K, Q, R, S, V, Y), 143 (A), 151 (P), 154 (F, I, L), 155 (S), 156 (W), 158 (Y), 162 (G), 163 (F, P, W, Y), 164 (D, R), 165 (I, Y), 180 (K), 187 (H, N, Q, S, T, W), 189 (R), 227 (M), 228 (R), 232 (P), 252 (L), 263 (I, V), 265 (M), 및 269 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체는 모 지방분해 효소에 비해 향상된 특성을 갖는, 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 향상된 특성은 세정 성능(cleaning performance), 향상된 가수분해, 변경된 기질 특이성, 세제 안정성 또는 열안정성인, 지방분해 효소 변이체.

청구항 38

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 모 지방분해 효소는 썬모마이세스 과로부터 유래된, 지방분해 효소 변이체.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 모 지방분해 효소는 썬모마이세스 라누기노수스로부터 유래된, 지방분해 효소 변이체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 지방분해 효소 변이체를 적어도 하나 포함하는, 세정 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 세정 조성물은 과립, 분말, 고체, 바(bar), 액체, 정제, 겔, 또는 페이스트 조성물인, 세정 조성물.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 세정 조성물은 세제 조성물인, 세정 조성물.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세정 조성물은 세탁 세제 조성물, 식기 세제 조성물, 또는 경질 표면 세정 조성물인, 세정 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 식기 세제는 손 식기세척 세제 조성물 또는 자동 식기세척 세제 조성물인, 세정 조성물.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 세정 조성물은 세탁 세제 조성물인, 세정 조성물.

청구항 46

제40항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 표백제를 추가로 포함하는, 세정 조성물.

청구항 47

제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세정 조성물은 포스페이트가 없는, 세정 조성물.

청구항 48

제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세정 조성물은 포스페이트를 함유하는, 세정 조성물.

청구항 49

제40항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가 효소를 추가로 포함하는, 세정 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 추가 효소는 헤미셀룰라제, 셀룰라제, 펙티나제, 지방분해 효소, 금속지방분해 효소, 자일라나제, 리파제, 포스포리파제, 에스테라제, 퍼하이드롤라제, 큐티나제(cutinase), 펙티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 케라티나제, 리덕타제, 옥시다제, 페놀옥시다제, 리폭시게나제, 리그니나제, 풀루라나제, 탄나제, 펜토사나제, 말라나제, β -글루카나제, 아라비노시다제, 하이알루로니다제, 콘드로이티나제, 락카제, 및 아밀라제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세정 조성물.

청구항 51

표면 또는 물품을 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 지방분해 효소 변이체를 적어도 하나 포함하는 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세정 방법.

청구항 52

표면 또는 물품을 제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 제시된 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세정 방법.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 상기 표면 또는 물품을 상기 세정 조성물과 각각 접촉시키는 단계 후 상기 표면 또는 물품을 행구는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물품은 식기류인, 방법.

청구항 55

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물품은 패브릭인, 방법.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표면 또는 물품을 상기 세정 조성물과 접촉시키는 단계 후 상기 표면 또는 물품을 행구는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 표면 또는 물품을 행구는 단계 후 상기 표면 또는 물품을 건조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 58

제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 제시된 세정 조성물 및 세정을 필요로 하는 표면 또는 물품을 제공하는 단계; 및 세정된 표면 또는 물품을 생성하기 위해, 상기 세정 조성물을 상기 표면 또는 물품의 상기 표면을 세정하기에 적합한 조건 하에서 세정을 필요로 하는 상기 표면 또는 물품과 접촉시키는 단계를 포함하는, 표면 또는 물품을 세정하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 행워진 표면 또는 물품을 생성하기 위해, 상기 세정된 표면 또는 물품을 행구는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 상기 행워진 표면 또는 물품을 건조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원과의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2012년 10월 12일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/713,436호의 이익을 주장하며, 그는 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0003] 리파제(lipase) 및 큐티나제(cutinase)를 포함하는 지방분해 효소는 기름 얼룩의 제거를 위한 세제 세정 조성물(detergent cleaning composition)에 사용되어 왔다. 지방분해 효소가 기능하는 한 가지 메커니즘은 지방산을 생성하기 위한 트라이글리세라이드(triglyceride)를 가수분해하는 것에 의한다. 그러나, 이러한 효소는 종종 세정 조성물에 존재하는 계면활성제 및 다른 성분에 의해 억제되어, 기름 얼룩을 제거하기 위한 효소의 능력을 방해한다. 따라서, 세정 조성물의 가혹한 환경에서 기능할 수 있는 지방분해 효소에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 개선된 지방분해 효소, 특히 세제 조성물에 유용한 효소를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 모 지방분해 효소(parent lipolytic enzyme)와 비교할 때, 치환과 같은 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소 변이체를 제공한다. 이는 세척(wash) 사이클에서 효소의 유효성을 향상시키는 표준 세제 제형 및 저계면활성제 세제 제형에서의 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소의 안정성, 효소의 열안정성, 기질 가수분해, 발현 및/또는 변형된 전하/소수성 프로파일을 향상시켜 효소를 개선함으로써 성취될 수 있다. 본 발명은 변형 리파제 지방분해 효소를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 변형 지방분해 효소를 제공하며, 이는 특히 다양한 세정 응용들에 매우 적합하고 유용하다. 본 발명은 또한 본 발명의 지방분해 효소 변이체를 사용하여 세정하는 방법을 제공한다.

[0005] 일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치(productive position)에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족한다:

- [0006] a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성(micro-swatch activity), pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(performance index, PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- [0007] b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- [0008] c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;
- [0009] 여기서, 생산 위치는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 176, 179, 180, 181, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 202, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 236, 237, 238, 239, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 및 269로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* (*Thermomyces lanuginosus*) 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0010] 일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 50% 이상은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 위치는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252, 및 264로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0011] 일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 30% 이상은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 위치는 18, 19, 20, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50, 53, 56, 60, 73, 74, 85, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 115, 125, 127, 128, 132, 133, 151, 159, 164, 179, 183, 187, 188, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 251, 254, 263, 267, 및 269로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0012] 일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 위치는 7, 11, 12, 15, 22, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 61, 63, 65, 67, 76, 77, 84, 87, 114, 117, 119, 121, 134, 135, 136, 143, 154, 155, 156, 158, 165, 166, 168, 176, 180, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 217, 221, 224, 225, 228, 229, 231, 233, 248, 249, 253, 255, 256, 265, 및 268로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0013] 일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 미만은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 위치는 14, 16, 17, 34, 41, 55, 57, 59, 62, 70, 79, 92, 100, 102, 103, 106, 109, 110, 112, 118, 126, 138, 139, 142, 149,

152, 153, 167, 169, 170, 181, 184, 192, 193, 196, 198, 205, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 226, 227, 230, 236, 238, 239, 242, 243, 246, 257, 259, 260, 262, 및 266으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0014]

일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 50% 이상은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 변형(productive modification)은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 및 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0015]

일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 30% 이상은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 변형은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 85(S,F,H,I,N,Q,T); 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);

133(R,E,F,I,N,Q,V); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y);
 164(Y,D,N,R,S,V); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);
 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S);
 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 254(D,A,H,K,N,P,T); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T);
 267(T,G,I,L,M,P,W); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치
 는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0016]

일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는
 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들
 중 15% 이상은 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 변형은
 1(E,A,C,D,F,I,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 15(Q,G,H,M,S); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,V,W,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R);
 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y);
 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y);
 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R);
 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V);
 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W);
 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V);
 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R);
 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 143(T,A,G,N,S);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);
 166(I,D,G,W); 168(V,G,L,Q); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T);
 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V);
 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 209(R,H,S,T);
 211(F,I,R,T,W); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V);
 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 231(T,G,H,K,L,M);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 248(N,D,L,Y);
 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V);
 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및
 269(L,D,F,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된

썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0017]

일 실시 형태에서, 본 발명은 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 지방분해 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서 변형은 지방분해 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나는 위에서 열거된 기준들 a, b, 및 c 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서 생산 변형은 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 14(A,S,V); 15(Q,G,H,M,S); 16(Y,H,W); 17(S,E); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 34(I,P); 35(T,E,K,R); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,T,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 41(C,V); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T); 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 55(F,G,W); 56(E,H,K,R,T,V); 57(D,S); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 59(G,D); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R); 62(D,N); 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 70(D,S); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 79(S,A,M); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T); 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 92(N,A,T); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 100(I,M); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 102(D,H); 103(I,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 106(G,H); 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 109(G,T); 110(H,N,S); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 112(G,F,Q); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V); 118(R,P); 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 126(Q,I,M); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 138(Y,F); 139(RLT); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 142(F,H,Y); 143(T,A,G,N,S); 149(G,A); 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 152(A,I,V); 153(T,S); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y); 166(I,D,G,W); 167(D,N); 168(V,G,L,Q); 169(F,S,Y); 170(S,G); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T); 181(F,L); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 184(F,W,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 192(T,N,P); 193(L,T); 196(I,V); 198(H,G,S); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 205(R,D); 206(L,N); 208(P,E,N); 209(R,H,S,T); 210(E,S); 211(F,I,R,T,W); 212(G,Q); 213(Y,S); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 218(P,T); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 226(T,D,N); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 230(V,W); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 236(V,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 238(I,V); 239(E,K); 242(D,T); 243(A,S); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 246(G,I); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 257(A,W,Y); 259(L,W,Y); 260(W,P); 262(F,D,K); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 266(G,E); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0018]

일 실시 형태에서, 본 발명은 위에서 열거된 바와 같은 적어도 하나의 지방분해 효소 변이체를 포함하는 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 헤미셀룰라제, 셀룰라제, 펙속시다제, 지방분해 효소, 금속지방분

해 효소, 자일라나제, 리파제, 포스포리파제, 에스테라제, 피하이드롤라제, 큐티나제, 펙티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 케라티나제, 리덕타제, 옥시다제, 페놀옥시다제, 리폭시게나제, 리그니나제, 폴루라나제, 탄나제, 펜토사나제, 말라나제, β -글루카나제, 아라비노시다제, 하이알루로니다제, 콘드로이티나제, 락카제, 및 아밀라제로 이루어진 군으로부터의 추가 효소를 추가로 포함한다.

[0019] 일 실시 형태에서, 본 발명은 표면 또는 물품을 위에서 열거된 적어도 하나의 지방분해 효소 변이체를 포함하는 세정 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 세정 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 pHYT-TLLwt의 플라스미드 맵이다.

도 2는 상이한 보조제(adjuvant) 수준을 갖는 TLL 리파제 효소에서 리파제 활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 개선된 지방분해 효소, 특히 세제 조성물에 유용한 효소를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 모 지방분해 효소와 비교할 때, 치환과 같은 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소 변이체를 제공한다. 이는 세척 사이클에서 효소의 유효성을 향상시키는 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소의 안정성, 효소의 열안정성, 및/또는 변형된 기질 가수분해, 및/또는 전하/소수성 프로파일을 향상시켜 효소를 개선함으로써 성취될 수 있다. 본 발명은 변형 리파제 지방분해 효소를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 변형 지방분해 효소를 제공하며, 이는 특히 다양한 세정 응용들에 매우 적합하고 유용하다. 본 발명은 본 명세서에서 제공된 변이 지방분해 효소들 (예를 들어, 변이 리파제들) 중 적어도 하나를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 그러한 조성물은 세제 조성물을 포함한다. 본 발명은 썬모마이세스 종(*Thermomyces species*)의 변이 지방분해 효소 및 하나 이상의 그러한 변이 리파제를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 지방분해 효소 변이체는 세제 조성물에 유용한 다른 효소와 조합될 수 있다. 본 발명은 또한 공지의 지방분해 효소, 예를 들어, 공지된 리파제 지방분해 효소와 비교하여 비슷하거나 향상된 세척 성능을 갖는 효소 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 지방분해 효소 변이체를 사용하여 세정하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명은 모 지방분해 효소로부터 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소의 효소 변이체를 포함한다. 효소 변이체는, 세척 성능, 기질 가수분해, 세제 조성물에서의 효소 안정성 및 효소의 열안정성에 대한 최소 성능 지수(performing index)를 갖는 한편 모 지방분해 효소로부터 향상된 이러한 특성들 중 적어도 하나를 가짐으로써, 세제 조성물에 유용할 수 있다.

[0023] 추가적으로, 본 발명은, 적합한 변형이 세척 성능, 기질 가수분해, 세제 조성물에서 효소의 안정성 및 효소의 열안정성에 대한 최소 성능 지수를 가져오는 한편, 모 지방분해 효소로부터 향상된 이러한 특성들 중 적어도 하나를 갖는 세제 조성물에 유용할 수 있는 지방분해 효소에서 하나 이상의 아미노산 위치에서의 변형, 예를 들어, 치환을 제공한다. 이러한 변형은 본 발명의 변형에 적합한 것으로 간주된다. 이러한 아미노산 위치는 모 지방분해 효소에 대한 조합 변형에 유용한 위치로 간주될 수 있다. 유용한 위치로 확인된 지방분해 효소 아미노산 위치는 세제 조성물로의 용도에 적합한 다수의 변형을 갖는 것을 추가로 특징으로 할 수 있다. 각각의 위치에 대해, 더 많은 수의 가능성있는 적합한 변형들은 특정 위치의 더 높은 생산성을 나타낸다.

[0024] 본 명세서에서 달리 정의되지 않으면, 본 발명에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 재료가 본 발명의 실시에서 사용되지만, 일부 방법 및 재료가 본 명세서에 기술된다. 따라서, 바로 이하에 정의된 용어는 전체로서 명세서에 대한 참조로서 더욱 충분하게 기술된다. 본 명세서의 상기 및 하기 둘 모두에서 언급된 모든 특허, 특허 출원, 논문 및 간행물은 본 명세서에서 참조로 명백히 포함된다.

[0025] 또한, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수형 "하나의(a, an)", 및 "상기(the)"는, 문맥에 정확하게 달리 표시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 달리 표시되지 않는다면, 핵산은 5'에서 3' 배향으로 좌측에서 우측으로 기재되고; 아미노산 서열은 각각 아미노에서 카르복시 배향으로 좌측에서 우측으로 기재된다. 본 발명은 기술된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약이 당업자에 의해 사용되는 문맥에 따라 달라질 수 있기 때문에, 이들로 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 모든 더 낮은 수치 제한이 본 명세서에 명확히 기재되어 있는 것처럼 이러한 더 낮은 수치 제한을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서 전체에 걸쳐 주어진 모든

최소의 수치 제한은 모든 더 높은 수치 제한이 본 명세서에 명확히 기재되어 있는 것처럼 이러한 더 높은 수치 제한을 포함할 것이다. 본 명세서 전체에 걸쳐 주어진 모든 수치 범위는 모든 더 좁은 수치 범위가 본 명세서에 명확히 기록되어 있는 것처럼 그러한 더 넓은 수치 범위 내에 있는 그러한 더 좁은 수치 범위를 포함할 것이다.

[0027] "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산 잔기의 중합 서열을 포함한다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서에서 호환가능하게 사용된다. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBN)에 따라 정의된 아미노산에 대한 단일 및 세 자리 코드가 본 발명을 통해 사용된다. 폴리펩티드가 유전 코드의 퇴행으로 인해 하나 초과 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다는 것이 또한 이해된다. 돌연변이는 모 아미노산에 대한 한 자리 코드와 그 뒤에, 숫자 및 이어서 변이 아미노산에 대한 한 자리 코드에 의해 명명된다. 예를 들어, 위치 87에서의 글리신 (G)을 세린 (S)으로 돌연변이화하는 것은 "G087S" 또는 "G87S"로 나타낼 수 있다. 다중 돌연변이는 돌연변이들 사이에 "-"를 삽입함으로써 표시될 수 있다. 예를 들어, 위치 87 및 90에서의 돌연변이는 "G087S-A090Y" 또는 "G87S-A90Y" 또는 "G87S + A90Y" 또는 "G087S + A090Y"로 나타낼 수 있다.

[0028] 용어 "로부터 유래된" 및 "로부터 얻어진"은 문제의 유기체의 균주에 의해 생성되거나 생성될 수 있는 지방분해 효소뿐만 아니라, 그러한 균주로부터 단리된 DNA 서열에 의해 코딩되고 그러한 DNA 서열을 함유하는 숙주 유기체에서 생성된 지방분해 효소를 말한다. 추가적으로, 상기 용어는 합성 및/또는 cDNA 기원의 DNA 서열에 의해 코딩되고 문제의 지방분해 효소의 확인된 특성을 갖는 지방분해 효소를 말한다. 예를 들어, "썬모마이세스로부터 유래된 지방분해 효소"는 썬모마이세스에 의해 자연적으로 생성된 지방분해 활성을 갖는 이러한 효소뿐 아니라 썬모마이세스 공급원에 의해 생성되지만 유전공학 기술을 사용하여 지방분해 효소를 암호화하는 핵산으로 형질전환된 비-썬모마이세스 유기체에 의해 생성되는 것과 같은 지방분해 효소를 말한다.

[0029] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "상동성은 서열 유사성 또는 동일성을 말하며, 동일성이 바람직하다. 상동성은 당업계에 공지된 표준 기술(예를 들어, 문헌[Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]; 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]; 문헌[Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]; 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 팩키지(Wisconsin Genetics Software Package)(미국 위스콘신주, 매디슨 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group))의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA와 같은 소프트웨어 프로그램; 및 문헌[Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res. 12:387-395 (1984)] 참조)을 사용하여 측정될 수 있다. 유용한 알고리즘의 하나의 예는 PILEUP이다. PILEUP은 진행적, 쌍 방식 정렬을 사용하여 관련 서열 그룹으로부터 다중 서열 정렬을 작성한다. 이것은 또한 정렬을 작성하는데 사용된 클러스터링 관계를 보여주는 계도를 그릴 수 있다. PILEUP은 펑(Feng) 및 두리틀(Doolittle)의 진행적 정렬 방법의 단순화를 사용한다(문헌[Feng and Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987)] 참조). 상기 방법은 히긴스(Higgins) 및 샤프(Sharp)에 의해 기술된 방법과 유사하다(문헌[Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989)] 참조). 유용한 PILEUP 파라미터는 3.00의 디폴트 갭 중량, 0.10의 디폴트 갭 길이 중량, 및 가중된 말단 갭을 포함한다. 유용한 알고리즘의 다른 예는 알트슐(Altschul) 등에 의해 기술된 BLAST 알고리즘이다(문헌[Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]; 및 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)] 참조). 특히 유용한 BLAST 프로그램은 WU-BLAST-2 프로그램이다(문헌[Altschul *et al.*, Meth. Enzymol. 266:460-480 (1996)] 참조). WU-BLAST-2는 다수의 검색 파라미터를 사용하는데, 이의 대부분은 디폴트 값으로 설정된다. 조정가능한 파라미터는 하기 값으로 설정된다: 오버랩(overlap) 기간 =1, 오버랩 분획 = 0.125, 워드 역치(word threshold) (T) = 11. HSP S 및 HSP S2 파라미터는 동적 값이고, 특정 서열의 조성 및 관심 서열이 검색되는 특정 데이터베이스의 조성에 따라 프로그램 자체에 의해 성립된다. 그러나, 상기 값은 민감도를 증가시키도록 조정될 수 있다.

[0030] 참고 서열과 관심 테스트 서열 사이의 퍼센트 서열 동일성은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열에 의해 공유되는 퍼센트 동일성은 본 기술 분야에 공지된 방법에 의해 서열을 정렬하고 동일성을 결정함으로써 분자들 사이의 서열 정보의 직접 비교에 의해 결정된다. 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 알고리즘이다(문헌[Altschul, *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990) 참조). BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용가능하다. 이러한 알고리즘은 먼저, 데이터베이스 서열 내 동일 길이의 워드로 정렬될 때 일부 양(positive)의 값의 역치 스코어(score) T에 부합하거나 이를 만족시키는 쿼리 서열(query sequence) 내 길이 W의 짧은 워드들을 동정함으로써 높은 스코어의 서열 쌍(high scoring sequence pair, HSP)을 동정하는 것을 수반한다. 이러한 초기의 이웃 워드 히트(word hit)들은 이들을 포함한다 더 긴 HSP를 찾기 위한 출발점으로 작용한다. 워드 히트들은 누적 정렬 스코어가 증가될 수 있는 한, 비교되는

두 서열의 각각을 따라 양 방향으로 확장된다. 워드 히트의 확장은 누적 정렬 스코어가 최대 성취 값으로부터 X 양만큼 떨어질 경우; 누적 스코어가 0 이하로 되는 경우; 또는 어느 한 서열의 말단에 도달할 경우에 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 디폴트로서 11의 워드 길이 (W), 50의 BLOSUM62 스코어링 매트릭스(scoring matrix)(문헌[Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)] 참조) 정렬 (B), 10의 기대치 (E), M'5, N'-4, 및 양 가닥들의 비교를 사용한다.

- [0031] 이어서, BLAST 알고리즘은 두 서열들 사이의 유사성에 대한 통계학적 분석을 수행한다(상기 문헌[Karlin and Altschul] 참조). BLAST 알고리즘에 의해 제공되는 한 가지 유사성의 측정은 최소 합 확률 (P(N))인데, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들 사이의 매치(match)가 우연히 일어날 가능성의 지표를 제공한다. 예를 들어, 핵산은, 테스트 핵산과 지방분해 효소 핵산의 비교에서 최소 합 확률이 약 0.1 미만, 더욱 바람직하게는 0.01 미만, 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만일 경우에, 본 발명의 지방분해 효소 핵산과 유사하다고 간주된다. 테스트 핵산이 지방분해 효소 폴리펩티드를 암호화하는 경우에는, 비교 결과로서 최소 합 확률이 약 0.5 미만, 및 더욱 바람직하게는 0.2 미만일 경우에 특정된 지방분해 효소 핵산과 유사한 것으로 간주된다.
- [0032] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서 퍼센트 "동일한" 또는 "동일성"은 각각, 비교되고 최대 유사성에 대해 정렬되었을 때 서열 비교 알고리즘을 사용하거나 시각적 검사에 의해 결정된 바와 같이, 동일한 특정 백분율의 핵산 잔기 또는 아미노산 잔기를 갖거나 또는 동일한 둘 이상의 서열을 말한다. 참조 (즉, 쿼리) 아미노산 서열에 대한 대상 아미노산 서열의 "퍼센트 서열 동일성" 또는 "% 동일성" 또는 "% 서열 동일성" 또는 "% 아미노산 서열 동일성"은 서열들이 최적으로 정렬되는 경우 비교 길이에 걸쳐서 대상 아미노산 서열이 쿼리 아미노산 서열에 대해 특정 백분율만큼 (즉, 아미노산 대 아미노산 기준으로) 동일하다는 것을 의미한다. 따라서, 2개의 아미노산 서열에 대한 80% 아미노산 서열 동일성 또는 80% 동일성은 2개의 최적으로 정렬된 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 80%가 동일하다는 것을 의미한다.
- [0033] 참조 (즉, 쿼리) 핵산 서열에 대한 대상 핵산 서열의 "퍼센트 서열 동일성" 또는 "% 동일성" 또는 "% 서열 동일성" 또는 "% 뉴클레오티드 서열 동일성"은 서열들이 최적으로 정렬되는 경우 비교 길이에 걸쳐서 대상 핵산 서열이 쿼리 서열에 대해 특정 백분율만큼 (즉, 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 기준으로) 동일하다는 것을 의미한다. 따라서, 2개의 핵산 서열에 대한 80% 뉴클레오티드 서열 동일성 또는 80% 동일성은 2개의 최적으로 정렬된 핵산 서열에서 뉴클레오티드 잔기의 80%가 동일하다는 것을 의미한다.
- [0034] "최적 정렬" 또는 "최적으로 정렬된"은 2개 (또는 그 이상)의 서열들의 정렬이 최고의 퍼센트 동일성 스코어를 제공하는 것을 말한다. 예를 들어, 2개의 단백질 서열의 최적 정렬은 각 서열에서 최대 수의 동일한 아미노산 잔기가 함께 정렬되도록 수동으로 서열을 정렬하거나, 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에서 공지된 소프트웨어 프로그램 또는 절차를 사용하여 달성될 수 있다. 2개의 핵산 서열의 최적 정렬은 각 서열에서 최대 수의 동일한 뉴클레오티드 잔기가 함께 정렬되도록 수동으로 서열을 정렬하거나, 본 명세서에 기재되거나 본 기술 분야에서 공지된 소프트웨어 프로그램 또는 절차를 사용하여 성취될 수 있다.
- [0035] 일부 실시 형태에서, 2개의 폴리펩티드 서열은 정의된 파라미터, 예를 들어, 정의된 아미노산 치환 매트릭스, 갭 존재 패널티(gap existence penalty)(또한 갭 개방 패널티로도 일컬어짐), 및 갭 확장 패널티를 사용하여 정렬되는 경우 "최적으로 정렬된" 것으로 간주되어, 그러한 서열 쌍에 대해 가능한 최고 유사성 스코어를 달성할 수 있다. BLOSUM62 스코어링 매트릭스(상기 문헌[Henikoff and Henikoff] 참조)는 종종 폴리펩티드 서열 정렬 알고리즘(예컨대, BLASTP)에서 디폴트 스코어링 치환 매트릭스로서 사용된다. 갭 존재 패널티는 정렬된 서열들 중 하나에서 단일 아미노산 갭의 도입에 대해 부과되고, 갭 확장 패널티는 갭에서의 각각의 잔기 위치에 대해 부과된다. 사용된 예시적인 정렬 파라미터는: BLOSUM62 스코어링 매트릭스, 갭 존재 패널티=11, 및 갭 확장 패널티=1이다. 정렬 스코어는 정렬이 시작되고 끝나는 각 서열의 아미노산 위치들(예를 들어, 정렬 창)에 의해 정의되고, 선택적으로 하나의 또는 둘 모두의 서열 내로 하나 또는 다수의 갭을 삽입함으로써 정의되어, 최고의 가능한 유사성 스코어를 달성할 수 있게 한다.
- [0036] 둘 이상의 서열들 사이의 최적 정렬은 시각적 검사에 의해 수동으로, 또는 예를 들어, 아미노산 서열을 위한 BLASTP 프로그램 및 핵산 서열을 위한 BLASTN 프로그램(문헌[Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997)] 참조; 또한 국립 생명공학 정보 센터(NCBI) 웹사이트 참조)과 같은 그러나 이로 제한되는 않는 컴퓨터를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0037] 관심 폴리펩티드가 모 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대해 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97%

이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 99.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경우, 관심 폴리펩티드는 모 폴리펩티드에 대해 "실질적으로 동일하다"고 말할 수 있다. 그러한 2개의 폴리펩티드들 사이의 퍼센트 동일성은 최적으로 정렬된 2개의 폴리펩티드 서열의 검사에 의해 수동으로 또는 표준 파라미터를 사용하는 소프트웨어 프로그램 또는 알고리즘(예를 들어, BLAST, ALIGN, CLUSTAL)을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 하나의 지표는 첫 번째 폴리펩티드가 두 번째 폴리펩티드와 번역학적으로 교차 반응하는 것이다. 전형적으로, 보존 아미노산 치환에 의해 상이한 폴리펩티드는 번역학적으로 교차 반응한다. 따라서, 폴리펩티드는 예를 들어, 2개의 펩티드가 하나의 보존 아미노산 치환 또는 하나 이상의 보존 아미노산 치환에 의해서만 상이한 경우, 두 번째 폴리펩티드에 대해 실질적으로 동일하다.

[0038] 관심 핵산이 모 핵산의 뉴클레오티드 서열에 대해 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 99.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우, 관심 핵산은 모 핵산에 대해 "실질적으로 동일하다"고 말할 수 있다. 그러한 2개의 핵산들 사이의 퍼센트 동일성은 최적으로 정렬된 2개의 핵산 서열의 검사에 의해 수동으로 또는 표준 파라미터를 사용하는 소프트웨어 프로그램 또는 알고리즘(예를 들어, BLAST, ALIGN, CLUSTAL)을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 하나의 지표는 2개의 핵산 분자들이 엄격한 조건 하에서 (예를 들어, 중간 내지 높은 엄격성의 범위 내에서) 서로 혼성화되는 것이다.

[0039] 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 이것이, 예를 들어, 다른 단백질, 핵산, 세포 등을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 다른 구성요소로부터 부분적으로 또는 완전히 분리될 때 "단리된다". 유사하게, 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 이것이, 예를 들어, 다른 단백질, 핵산, 세포 등을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 다른 구성요소로부터 부분적으로 또는 완전히 분리될 때 "단리된다". 물 기준으로, 단리된 종은 조성물에서 다른 종보다 훨씬 풍부하다. 예를 들어, 단리된 종은 존재하는 모든 거대분자 종들의 (물 기준으로) 적어도 약 50%, 약 70%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100%를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 관심 종은 본질적인 균질성으로 정제된다(즉, 오염 종은 종래의 검출 방법으로 조성물 내에서 측정될 수 없다). 순도 및 균질성은 본 기술 분야에 공지된 다수의 기술들, 예를 들어, 단백질 또는 핵산 샘플의 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔을 사용한 다음, 염색으로 시각화하여 결정될 수 있다. 원한다면, 고-분해능 기술, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 유사한 수단이 재료의 정제에 사용될 수 있다.

[0040] 핵산 또는 폴리펩티드에 적용되는 바와 같이, 용어 "정제된"은 대체로 본 기술분야에서 공지된 분석 기술들에 의해 결정된 바와 같이 다른 구성요소가 본질적으로 없는 핵산 또는 폴리펩티드를 나타낸다(예를 들어, 정제된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 전기영동 겔, 크로마토그래피의 용출액, 및/또는 밀도 구배 원심분리되는 매질에서 별개의 밴드를 형성한다. 예를 들어, 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드가 생기게 하는 핵산 또는 폴리펩티드는 "정제되어 있다". 정제된 핵산 또는 폴리펩티드는 (예를 들어, 물 기준으로 한 중량%) 순도가 적어도 약 50%, 통상 적어도 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7%, 약 99.8%, 또는 그 이상이다. 관련된 의미에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 분자들, 예를 들어 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에 대한 조성물을 농후화하는 방법을 제공한다. 정제 또는 농후화 기술의 적용 후에 분자의 농도가 실질적으로 증가할 때 조성물이 분자에 대해 농축된다. 실질적으로 순수한 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 각각 본 발명의 실질적으로 순수한 변이 지방분해 효소 또는 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드)는 전형적으로 특정 조성물 내 모든 거대분자 종들의 (물 기준으로) 적어도 약 55 중량%, 약 60 중량%, 약 70 중량%, 약 80 중량%, 약 85 중량%, 약 90 중량%, 약 91 중량%, 약 92 중량%, 약 93 중량%, 약 94 중량%, 약 95 중량%, 약 96 중량%, 약 97 중량%, 약 98 중량%, 약 99 중량%, 약 99.5 중량% 또는 그 이상을 포함할 것이다.

[0041] 주어진 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 위치는 전형적으로 서열 번호 4에 나타난 *써모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL 아미노산 서열의 대응하는 아미노산 잔기의 위치의 번호 매기기를 사용하여 본 명세서에서 번호가 매겨진다. 따라서, 서열 번호 4의 T. *라누기노수스*(*T. lanuginosus*) 리파제 TLL 아미노산 서열은 참고 모 서열로서 역할을 한다. 주어진 아미노산 서열, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 변이 지방분해 효소 아미노산 서열은 본 명세서에 기재된 바와 같은 정렬 알고리즘을 사용하여 TLL 서열(서열 번호 4)과 정렬될 수 있고, TLL 서열에서의 아미노산 잔기와 정렬(바람직하게는 최적으로 정렬)된 주어진 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기는 리파제 TLL 서열에서의 대응하는 아미노산 잔기를 참고하여 편리하게 번호가 매겨질 수 있다.

- [0042] 본 발명의 지방분해 효소
- [0043] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 지방분해 효소는 트라이글리세라이드 또는 인지질을 분해하는 능력과 같은 지방 분해 능력을 나타내는 효소, 폴리펩티드, 또는 단백질을 포함한다. 지방분해 효소는 예를 들어 리파제, 포스포리파제, 에스테라제 또는 큐티나제일 수 있다. 지방분해 효소는 α/β 하이드롤라제 접합을 갖는 지방분해 효소일 수 있다. 이들 효소는 전형적으로 세린, 아스파르트산 및 히스티딘 잔기의 3작용기 촉매(catalytic triad)를 갖는다. α/β 하이드롤라제는 리파제 및 큐티나제를 포함한다. 큐티나제는 리파제가 종종 지방-물 계면의 존재 하에서 구조 변화(conformational change)를 겪는 계면활성을, 있더라도, 거의 나타내지 않는다(문헌[Longhi and Cambillau(1999) Biochimica et Biophysica Acta 1441:185-96]). 지방분해 효소의 활성 단편은 지방 분해 능력을 보유하는 지방분해 효소의 일부이다. 활성 단편은 3작용기 촉매를 보유한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 지방분해 활성은 본 기술 분야에 공지된 임의의 과정에 따라 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Gupta et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 37:63-71, 2003]; 미국 특허 제5,990,069호; 및 국제 특허 출원 공개 WO 96/1 8729A1호 참조).
- [0044] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 지방분해 효소는 α/β 하이드롤라제이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 지방분해 효소는 리파제이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 지방분해 효소는 큐티나제이다.
- [0045] 지방분해 효소의 생산 위치
- [0046] 본 발명은, 적합한 변형이 세척 성능, 기질 가수분해, 세제 조성물에서 효소의 안정성 및 효소의 열안정성에 대한 최소 성능 지수를 가져오는 한편, 모 지방분해 효소로부터 향상된 이러한 특성들 중 적어도 하나를 갖는 세제 조성물에 유용할 수 있는 지방분해 효소에서 아미노산 위치를 제공한다. 이러한 변형은 본 발명의 변형에 적합한 것으로 간주된다.
- [0047] 본 발명의 지방분해 효소의 안정성은 표준, 예를 들어 서열 번호 3의 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 안정성과 비교될 수 있다.
- [0048] 용어 "열적 안정성" 및 "열안정성"은, 예를 들어 변경된 온도에 노출되면서, 지방분해, 가수분해, 세정 또는 본 명세서에 개시된 다른 프로세스 동안 지배적인 조건 하에서 종종 주어진 기간에 걸쳐 확인된 온도에 노출된 후, 특정된 양의 효소적 활성을 보유하는 본 발명의 리파제와 관련된다. 변경된 온도는 증가 또는 감소된 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 리파제는 주어진 기간, 예를 들어 적어도 약 60 분, 약 120 분, 약 180 분, 약 240 분, 약 300 분 등에 걸쳐 변경된 온도에 노출된 후, 적어도 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%의 지방분해 활성을 보유한다.
- [0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 향상된 특성의 변이체 지방분해 효소는 대응하는 모 지방분해 효소(예를 들어, 야생형 또는 자연-발생 지방분해 효소)에 대해 향상되거나 개선된 세척 또는 세정 성능(cleaning performance), 및/또는 보유된 세척 또는 세정 성능을 선택적으로 갖는 향상되거나 개선된 안정성을 갖는 변이 지방분해 효소를 포함한다. 변이 지방분해 효소의 향상된 특성은 향상된 세척 또는 세정 성능 및/또는 향상된 안정성 및/또는 향상된 기질 가수분해 및/또는 향상된 발현을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 하기 특성들 중 하나 이상을 나타내는 본 발명의 변이 지방분해 효소를 제공한다: 향상된 손 세척 성능, 향상된 손 또는 수동 식기세척 성능, 향상된 자동 식기세척 성능, 향상된 세탁 성능, 및/또는 참고 모 지방분해 효소(예를 들어, 야생형 지방분해 효소, 예컨대 야생형 리파제)에 대한 향상된 안정성.
- [0050] 유용한 위치로 확인된 지방분해 효소 아미노산 위치는 세제 조성물에 사용하기 적합한 다른 변형들을 가질 수 있다. 변형은 특정 위치에서의 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 변형은 치환이다. 각각의 위치에 대해, 더 많은 가능하고 적합한 변형이 위치에 대한 더 높은 생산성 성적을 야기한다. 예를 들어, 아미노산 위치는 생산 위치에서 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 적어도 50%, 30% 또는 15%를 가질 수 있고, 여기서 변형은 하기 안정성 기준들 중 적어도 하나를 만족한다:
- [0051] a) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- [0052] b) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치; 또는

- [0053] c) 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치.
- [0054] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 50% 이상을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치는 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252, 및 264를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0055] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 50% 이상을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 및 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0056] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 30% 이상이지만 50% 미만을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치는 위치 18, 19, 20, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50, 53, 56, 60, 73, 74, 85, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 115, 125, 127, 128, 132, 133, 151, 159, 164, 179, 183, 187, 188, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 251, 254, 263, 267, 및 269를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0057] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 30% 이상을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y); 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y); 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 85(S,F,H,I,N,Q,T);

86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q);
 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y);
 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y);
 164(Y,D,N,R,S,V); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);
 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,Y); 190(G,D,H,R,S,Y); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S);
 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 254(D,A,H,K,N,P,T); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T);
 267(T,G,I,L,M,P,W); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호
 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0058]

적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 15% 이상이지만 30% 미만을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치는 위치
 7, 11, 12, 15, 22, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 61, 63, 65, 67, 76, 77, 84, 87, 114, 117, 119, 121, 134,
 135, 136, 143, 154, 155, 156, 158, 165, 166, 168, 176, 180, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 217,
 221, 224, 225, 228, 229, 231, 233, 248, 249, 253, 255, 256, 265, 및 268을 포함하고, 여기서 리파제 변이
 체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하
 여 번호가 매겨진다.

[0059]

적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 15% 이상을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형
 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 15(Q,G,H,M,S); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R);
 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y);
 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y);
 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R);
 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V);
 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W);
 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V);
 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R);
 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 143(T,A,G,N,S);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);

166(I,D,G,W); 168(V,G,L,Q); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T);
 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V);
 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 209(R,H,S,T);
 211(F,I,R,T,W); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V);
 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 231(T,G,H,K,L,M);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 248(N,D,L,Y);
 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V);
 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및
 269(L,D,F,M,Q,V,W)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스
 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0060]

적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 하나 이상의 변형이지만 15% 미만을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치
 는 위치 14, 16, 17, 34, 41, 55, 57, 59, 62, 70, 79, 92, 100, 102, 103, 106, 109, 110, 112, 118, 126,
 138, 139, 142, 149, 152, 153, 167, 169, 170, 181, 184, 192, 193, 196, 198, 205, 206, 208, 210, 212,
 213, 218, 226, 227, 230, 236, 238, 239, 242, 243, 246, 257, 259, 260, 262, 및 266을 포함하고, 여기서
 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서
 열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0061]

적합한 변형으로서 테스트된 하나 이상의 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형
 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 14(A,S,V); 15(Q,G,H,M,S); 16(Y,H,W); 17(S,E); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W);
 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W);
 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y);
 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y);
 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 34(I,P);
 35(T,E,K,R); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 41(C,V); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 55(F,G,W); 56(E,H,K,R,T,V); 57(D,S); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 59(G,D);
 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R); 62(D,N); 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y);
 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W);
 70(D,S); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S);
 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 79(S,A,M);
 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T); 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y);
 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 92(N,A,T); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V);
 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W);
 100(I,M); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 102(D,H); 103(I,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 106(G,H); 108(R,E,F,K,M,Q,Y);
 109(G,T); 110(H,N,S); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 112(G,F,Q); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V);
 117(W,H,K,Q,V); 118(R,P); 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q);
 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 126(Q,I,M);
 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T);
 136(P,D,Q,R); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 138(Y,F); 139(RLT);
 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 142(F,H,Y); 143(T,A,G,N,S); 149(G,A); 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 152(A,I,V);
 153(T,S); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);
 166(I,D,G,W); 167(D,N); 168(V,G,L,Q); 169(F,S,Y); 170(S,G); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V);
 180(A,D,K,Q,T); 181(F,L); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 184(F,W,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);

188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 192(T,N,P); 193(L,T); 196(I,V); 198(H,G,S); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 205(R,D); 206(L,N); 208(P,E,N); 209(R,H,S,T); 210(E,S); 211(F,I,R,T,W); 212(G,Q); 213(Y,S); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 218(P,T); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 226(T,D,N); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 230(V,W); 231(T,G,H,K,L,M); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 236(V,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 238(I,V); 239(E,K); 242(D,T); 243(A,S); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 246(G,I); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 257(A,W,Y); 259(L,W,Y); 260(W,P); 262(F,D,K); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 266(G,E); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0062] 적합한 변형을 갖는 본 발명의 추가적인 지방분해 효소 변형은 변형 11(A,E,I), 23(A), 24(Q,S), 27(K,L), 29(N), 30(E,G,I,S,Y), 31(T), 33(C,I,P,T,V), 45(A,G,S,T), 48(N,R,T,V), 49(C,Y), 50(M), 51(H,V), 56(A,M,N,S), 58(A,F), 71(C,F,P), 73(Q,T), 74(I,M,T,W), 75(K), 91(K,N,Y), 94(A,H), 101(A), 108(A), 111(G,H,I,K,M,S,Y), 122(K,L,Q), 128(T,V), 130(K,M), 133(D,H,L,W), 135(A,D,M,N,Y), 140(Y), 159(G), 163(Q), 183(C), 187(C,I), 188(A,M,W), 190(W), 227(A,I,S), 233(F,I,V), 251(V), 및 252(M,V)를 포함한다.

[0063] 이러한 아미노산 위치는 모 지방분해 효소에 대한 조합 변형에 유용한 위치로 간주될 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 위치들 중 임의의 위치에 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소를 포함한다.

[0064] 지방분해 효소의 적합한 변형

[0065] 본 발명은 모 지방분해 효소로부터 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소의 효소 변이체를 포함한다. 효소 변이체는, 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소 안정성 및 효소의 열안정성에 대한 최소 성능 지수를 갖는 한편 모 지방분해 효소로부터 향상된 이러한 특성들 중 적어도 하나를 가짐으로써, 세제 조성물에 유용할 수 있다.

[0066] 적합성 기준들 중 세 가지 모두를 만족하는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 1 (A,D,F,I,N,P,S,W,Y), 2 (I,L), 3 (D,G,Y), 4 (D,F,W), 5 (H,I,L,S,T,V,Y), 6 (I,T), 7 (Y), 8 (G,H,I,L,M,T,V,W,Y), 9 (H,K), 11 (V), 13 (H,N), 14 (S), 16 (W), 17 (E), 18 (K), 19 (G), 20 (T), 23 (D,E,H,I,K,N,Q,T,V), 24 (A,D,E,H,I,L,N,P,T,V,W), 25 (I,L,T), 26 (G,K,M,S,T,V,W,Y), 27 (A,E,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y), 28 (D,E,I,N,S), 29 (E,H,K,L,M,R,T,V), 31 (D,H,S), 33 (D,E,F,L,Q,R,S), 34 (P), 37 (D,E,G,I,K,P,Q,W), 38 (D,F,H,I,K,L,M,N,Y), 39 (E,H,I,L,S,V), 40 (M,S), 42 (G,I,W), 43 (R,T), 44 (I), 45 (F,V), 46 (D,L,M), 47 (H), 48 (E,H,P,Q), 49 (V), 50 (L,R,S), 51 (A,E,G,I,L,M,S), 52 (A,G,I,V), 54 (P,T,V), 56 (H,K,R,T), 58 (M), 60 (G), 63 (T), 64 (G), 66 (H,M,W), 67 (I,V), 68 (G,I,S,T,V), 69 (I,K,S,T), 70 (S), 71 (D,H,K,Q,R,S,T), 72 (A,D,E,F,H,I,L,N,R,S,V,Y), 73 (H,R,S), 74 (H,S), 75 (A,E,G,H,I,Q,S,T,V), 79 (A), 85 (T), 86 (P,T), 87 (G), 90 (A,E,F,N), 91 (E,H,I,M,Q,R), 92 (T), 94 (R), 95 (G,Q,V,W), 96 (A,K), 97 (D,T), 98 (Q), 99 (D,S,T,W), 101 (D,H,Y), 105 (K), 108 (K,Q,Y), 111 (A,E,L,Q,T,V), 114 (F,I,M,V), 115 (T), 118 (P), 119 (T), 120 (Y), 121 (K), 122 (H,I), 123 (G,M,N,W), 125 (G,Q), 127 (G,T), 130 (A,G,H,T), 131 (H,I,Q), 132 (H,R), 134 (L,V), 135 (K), 137 (E,G,H,K,Q,T,Y), 139 (T), 151 (I,T,V), 154 (I,L), 155 (G,S), 158 (E,F), 162 (G,R), 163 (N,P,Y), 164 (V), 166 (G), 176 (I,L), 179 (L,Q,V), 180 (K), 181 (L), 187 (G,H,L,N,Q,S,T,W), 188 (C,T), 189 (D,G,N,Q,R,S), 191 (F,L,V), 196 (V), 199 (G), 202 (P,V), 208 (E), 211 (I,W), 216 (N,W), 217 (K), 223 (Q,S,T,V), 225 (E,K,R), 227 (M), 228 (R), 232 (I,M,T), 233 (D,G,H,Q), 237 (I,L,Y), 242 (T), 244 (I), 250 (Q,R), 251 (D,W), 252 (A,D,G,H,Q,R,S,T), 255 (L), 256 (A,S), 257 (Y), 262 (D), 264 (E,M,N,P,Q,R), 265 (M,Q), 267 (L,W), 및 269 (D,M,Q,V,W)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 썬모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0067] 적합성 기준들 중 a)와 b) 둘 모두를 만족하지만 c)를 만족하지는 않는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 1 (Q,T), 2 (F,G,M,P), 3 (K,T), 4 (A,G,I,K,L,M,N,R,S), 5 (K,W), 6 (E,M), 8 (A,E), 9 (E,G,N,R), 11 (H,K,Y), 12 (F,H,V), 13 (Q), 15 (S), 18 (Q), 19 (C), 20 (G,S), 23 (C,F,L,M,S,W), 24 (Y), 25 (C,H,K), 26 (C), 27 (F), 28 (H,M,P,Q,R), 29 (Q,W,Y), 30 (D,V), 31 (E,Q), 32 (A,I,M,R,S), 35 (K), 37 (C), 38 (V,W), 39 (P,T,Y), 40 (W), 42 (V), 43 (D,M), 45 (Q), 46 (F,G,V,W), 47 (T), 50 (A), 51 (N,R,T), 52

(E,R,W), 53 (E,G,H,K,S), 54 (R,Y), 55 (G), 56 (V), 64 (C,E,N,V), 66 (N,Q,R), 67 (Q), 69 (A,G,H,N,W), 71 (V,W,Y), 72 (P), 73 (E,G,K), 74 (N,Q), 75 (D,N,R,Y), 76 (H), 77 (I,L,N,T), 86 (L,M), 87 (P,V), 90 (Q,T), 91 (F), 94 (D), 97 (Q), 98 (D,E,I), 99 (K), 105 (A,D,E,P), 108 (E,M), 122 (E,N), 123 (E,L,Q), 125 (N,T), 126 (I), 127 (E,F,R), 128 (H,S), 130 (F,Q), 131 (R,W,Y), 132 (D,K,W), 133 (E,Q), 135 (F,T), 136 (D,Q), 137 (S,V), 139 (L), 140 (F,M,Q,T), 143 (A,G,S), 149 (A), 151 (N), 154 (F), 156 (F,W), 158 (Y), 159 (E), 163 (S,W), 164 (N,S), 165 (I), 166 (D,W), 167 (N), 168 (L), 179 (E,I), 183 (V), 188 (H), 189 (K,V), 200 (A), 205 (D), 209 (S,T), 214 (D), 216 (G,Q), 217 (H), 218 (T), 223 (M), 226 (N), 228 (E), 229 (K), 231 (K,L,M), 252 (K,L,N), 254 (H), 255 (F), 256 (T), 263 (I,V), 264 (H,S,T), 267 (P), 및 269 (F)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0068]

적합성 기준들 중 a)를 또는 b)와 c) 둘 모두를 만족하지만 세 가지 모두를 만족하지는 않는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 1 (E,R,V), 2 (V,H,T), 3 (S,E,Q), 4 (Q,Y), 5 (D), 6 (L,Q,V), 7 (F), 8 (N), 9 (Q,A,I), 11 (N), 12 (L), 13 (F), 14 (A), 15 (Q), 16 (Y), 17 (S), 18 (A,C,H,S), 19 (A,T), 20 (A,P), 22 (C), 23 (G,P), 24 (K,F), 25 (N,A,D,G,V,W), 26 (N,L,Q), 27 (D), 28 (A,F,G,L), 29 (P,C,I), 30 (A,H,R,W), 31 (G), 32 (T,Q), 33 (N,K), 34 (I), 35 (T,E,R), 37 (T,A,F,L,M), 38 (G,T), 39 (N), 40 (A), 41 (C), 42 (P), 43 (E,I), 44 (V,H,T), 45 (E), 46 (K,E), 47 (A,D,E,F,M), 48 (D), 49 (A,H,K), 50 (T,D,W), 51 (F), 52 (L,T), 53 (Y,L,W), 54 (S), 55 (F), 56 (E), 57 (D), 58 (S,G,H,K,Q,W), 59 (G), 60 (V), 61 (G,L), 62 (D), 63 (V), 64 (T,D,I,L), 65 (G,V), 66 (F,I,L,V), 67 (L), 68 (A,C,W), 69 (L), 70 (D), 71 (N,E), 72 (T,K), 73 (N), 74 (K,A,D,G), 75 (L), 76 (I,V), 77 (V,A), 79 (S), 84 (R), 85 (S,H,N,Q), 86 (I,V,Y), 87 (E,D), 90 (I,V), 91 (G), 92 (N), 93 (L,D,K,Q,R), 94 (N,G,T,V), 95 (F,K,L), 96 (D), 97 (L,A,M), 98 (K,H), 99 (E), 100 (I), 101 (N), 102 (D), 103 (I), 105 (S,W), 106 (G), 108 (R,F), 109 (G), 110 (H,S), 111 (D), 112 (G), 114 (T), 115 (S,G,M,R,V), 117 (W,H,V), 118 (R), 119 (S,D,I), 120 (V,G,H,N,S,W), 121 (A), 122 (D,A,F), 123 (T), 125 (R,Y), 126 (Q), 127 (K), 128 (V,C,I), 130 (D,V,W,Y), 131 (A,K,S,T), 132 (V,Q), 133 (R,I), 134 (E), 135 (H), 136 (P), 137 (D,I,R,W), 138 (Y), 139 (R), 140 (V), 142 (F,H,Y), 143 (T), 149 (G), 151 (L,M,W), 152 (A), 153 (T,S), 154 (V), 155 (A), 156 (G,M), 158 (D), 159 (L,Q,R), 162 (N,D,E,F,H,I,K,Q,S), 163 (G,F,L), 164 (Y), 165 (D), 166 (I), 167 (D), 168 (V,G), 169 (F,S), 170 (S), 176 (V), 179 (R,H,K), 180 (A,T), 181 (F), 183 (E), 184 (F,Y), 187 (V), 188 (Q), 189 (T), 190 (G), 191 (G), 192 (T), 193 (L,T), 196 (I), 198 (H,G,S), 199 (T), 200 (N,S), 202 (I,L), 205 (R), 206 (L), 208 (P), 209 (R,H), 210 (E), 211 (F,R,T), 212 (G), 213 (Y), 214 (S,A), 216 (S,V), 217 (S,V), 218 (P), 221 (W), 223 (K,A), 224 (S), 225 (G), 226 (T), 227 (L,H), 228 (V), 229 (P), 230 (V,W), 231 (T,H), 232 (R,P), 233 (N), 236 (V), 237 (K,H,T,W), 238 (I), 239 (E), 242 (D), 243 (A), 244 (T,Q,S), 246 (G), 248 (N), 249 (Q), 250 (P,S), 251 (N), 252 (I,C,E), 253 (P,R), 254 (D,T), 255 (I), 256 (P), 257 (A), 259 (L), 260 (W), 262 (F), 263 (G,K), 264 (L,C,G), 265 (I), 266 (G), 267 (T,G,M), 268 (C,H), 및 269 (L)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0069]

적합성 기준들 중 b)만을 만족하는 (b)를 만족하지만 a) 또는 c)를 만족하지는 않는) 본 발명의 지방분해 효소 변형은 2 (K), 3 (A,H), 4 (P), 6 (K,Y), 7 (H), 9 (D,W), 12 (W), 13 (A,M,Y), 15 (M), 16 (H), 20 (Q), 22 (H), 23 (R), 25 (S), 29 (G,S), 30 (L,N), 33 (M), 37 (H), 39 (Q), 40 (F), 47 (W), 48 (G), 50 (F,K), 51 (D,P,Y), 52 (M), 54 (F,G,K,W), 55 (W), 58 (I), 60 (L), 64 (K,R,Y), 65 (L), 66 (G,Y), 67 (H), 68 (Y), 69 (D), 75 (M), 84 (H), 86 (Q), 90 (Y), 92 (A), 93 (I,P,V), 94 (S), 95 (H,T), 96 (V), 98 (M), 100 (M), 115 (N), 117 (Q), 122 (S,T,Y), 125 (I), 126 (M), 127 (D), 128 (Y), 130 (C,R), 132 (I), 134 (P), 140 (C), 151 (P), 152 (V), 156 (T), 164 (D,R), 165 (Y), 188 (F), 208 (N), 213 (S), 216 (D), 227 (C), 229 (I), 232 (C,L), 237 (E), 249 (E), 250 (E), 252 (F), 254 (A,K), 257 (W), 및 267 (I)를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0070]

적합성 기준들 중 c)만을 만족하는 (c)를 만족하지만 a) 또는 b)를 만족하지는 않는) 본 발명의 지방분해 효소 변형은 1 (C,L), 3 (R), 6 (A,H), 7 (M,V), 8 (K), 9 (Y), 13 (K,T,V), 14 (V), 15 (G,H), 18 (M,N,W), 19 (I,L,V,W), 20 (I), 22 (L,M), 24 (M,R), 25 (E), 31 (M,P,V), 37 (R,Y), 38 (A,E), 39 (C,W), 41 (V), 42 (C), 48 (L), 49 (G,L,W), 54 (E,H,M), 57 (S), 58 (D,R), 59 (D), 60 (K,Y), 61 (A,D,R), 62 (N), 63 (K,Q), 65 (Y), 66 (A,S,T), 74 (E), 76 (S), 79 (M), 84 (Q,W), 85 (F,I), 87 (A), 93 (H,N,W), 94 (K,M,P), 96

(P,R), 97 (I), 99 (P,Q), 101 (C,E,M), 102 (H), 103 (Y), 105 (F), 106 (H), 109 (T), 110 (N), 111 (F,W), 112 (F,Q), 115 (I,L), 117 (K), 119 (Q,V), 120 (I), 121 (Q), 123 (I,K), 125 (C), 128 (L,N,W), 130 (E), 131 (C,N), 132 (C), 133 (F,N,V), 136 (R), 137 (A,F,L,M,N,P), 138 (F), 140 (E,I,L,N), 143 (N), 152 (I), 154 (M,Y), 155 (T), 159 (M,W), 162 (M,P,Y), 163 (A,M,R), 165 (P), 168 (Q), 169 (Y), 170 (G), 176 (F,N,W), 180 (D,Q), 183 (H,M,Q,S,T,Y), 184 (W), 188 (E,R), 189 (E,M), 190 (D,H,R,S,Y), 192 (N,P), 199 (N,V), 200 (P), 202 (M), 206 (N), 210 (S), 212 (Q), 214 (M), 221 (F,G,Y), 223 (H,L), 224 (A,F,P), 225 (C), 226 (D), 228 (A), 229 (M,S), 231 (G), 232 (D,W), 236 (W), 238 (V), 239 (K), 243 (S), 244 (A,F,L,M,P), 246 (I), 248 (D,L,Y), 249 (G,T), 250 (D,G,K,T), 251 (M,Q,S,T,Y), 252 (W), 253 (F,H,N), 254 (N,P), 255 (W), 256 (D), 259 (W,Y), 260 (P), 262 (K), 263 (C,H,M), 265 (L,R,W), 266 (E), 및 268 (D,N)을 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0071] 표면 변형

[0072] 본 발명은 표면 노출 아미노산(surface exposed amino acid)에서 하나 이상의 변형을 갖는 지방분해 효소의 효소 변이체를 포함한다. 효소 변이체에서 표면 변형은 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소 안정성 및 효소의 열 안정성에 대한 최소 성능 지수를 갖는 한편 모 지방분해 효소로부터 향상된 이러한 특성들 중 적어도 하나를 가짐으로써, 세제 조성물에 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 표면 변형은 그 위치에서 아미노산의 소수성 및/또는 전하를 바꾼다. 소수성은 본 기술 분야에 공지된 기술들, 예를 들어 화이트(White) 및 윌리(Wimley) (문헌[White,S.H. and Wimley, W.C., (1999) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28:319-65])에 기재된 기술들을 사용하여 결정될 수 있다.

[0073] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "표면 특성"은 단백질의 표면에 의해 나타나는 소수성 및 친수성과 같은 특성 뿐만 아니라 정전하와 관련하여 사용될 수 있다.

[0074] 적합한 변형으로서 적어도 하나의 표면 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치는 위치 18, 27, 29, 33, 51, 58, 72, 75, 101, 108, 114, 121, 135, 137, 156, 163, 187, 250, 252, 및 264를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0075] 적합한 변형으로서 적어도 하나의 표면 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형 A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, F051T, S058M, T072R, L075Q, N101D, R108K, R108Q, R108Y, T114F, T114I, A121K, H135F, D137V, G156W, G163Y, V187N, V187W, P250E, I252A, I252T, 또는 L264P를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0076] 변화가 소수성(그러나 전하는 아님)의 변화인 적합한 변형으로서 적어도 하나의 표면 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치는 위치 18, 27, 29, 33, 51, 58, 72, 75, 101, 108, 114, 121, 135, 137, 156, 163, 187, 250, 252, 및 264를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0077] 변화가 소수성(그러나 전하는 아님)의 변화인 적합한 변형으로서 적어도 하나의 표면 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형 A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, F051T, S058M, T072R, L075Q, N101D, R108K, R108Q, R108Y, T114F, T114I, A121K, H135F, D137V, G156W, G163Y, V187N, V187W, P250E, I252A, I252T, 또는 L264P를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0078] 변화가 전하(그러나 소수성은 아님)의 변화인 적합한 변형으로서 적어도 하나의 표면 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 위치는 위치 18, 27, 29, 33, 72, 101, 108, 121, 137, 및 250을 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0079] 변화가 전하(그러나 소수성은 아님)의 변화인 적합한 변형으로서 적어도 하나의 표면 변형을 갖는 본 발명의 지방분해 효소 변형은 변형 A018K, D027N, D027S, D027T, D027V, P029E, N033D, N033E, N033R, T072R, N101D, R108Q, R108Y, A121K, D137V, 또는 P250E를 포함하고, 여기서 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 써모마이세스 라누기노수스 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

- [0080] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 반 투여량(half dose)에서의 세제 성능에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (S), 5 (H, I, S, T), 8 (H), 9 (K, N), 11 (H, K), 13 (N), 19 (G), 23 (K, N, Q R), 27 (Q, R), 29 (K, R), 32 (A), 33 (D), 37 (G, H, Q), 38 (F, L, M, W, Y), 39 (I, L), 42 (W), 43 (D, I, R, T), 45 (F, Q, V), 51 (M), 53 (E), 54 (P), 56 (H, K, R), 58 (H, K, Q, W), 69 (R), 73 (R), 75 (A, R), 75 (T), 77 (I, L, T), 90 (F,T), 91 (I,Q), 94 (R), 105 (P), 108 (K), 122 (F), 125 (T), 130 (A, R), 132 (K,R), 134 (L), 137 (R), 151 (T), 155 (S), 156 (W), 163 (F, P), 164 (R), 180 (K), 183 (V), 184 (Y), 187 (G, H, N, Q, S, T, W), 189 (G, Q), 211 (I), 214 (A), 228 (R), 232 (P), 233 (Q), 244 (I), 252 (N), 및 265 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0081] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 보조제와 함께 반 투여량에서의 세제 성능에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (S), 3 (T), 4 (F), 5 (H, I, S, T), 8 (H, T, V), 9 (G, H, K), 11 (K), 12 (V, W), 18 (K), 19 (G), 23 (K, Q, R), 27 (R, S), 32 (I), 38 (F, L, M, W, Y), 39 (I, P), 43 (I, R, T), 45 (F, Q), 53 (K), 54 (P), 56 (K, R), 58 (H, Q), 75 (G, Q, R), 77 (I), 90 (T), 91 (I, Q), 105 (P), 123 (N), 127 (F), 130 (A, F, H, Q, R), 131 (R), 136 (Q), 137 (R, S), 143 (S), 156 (T), 162 (G), 163 (S), 164 (R, V), 166 (G), 180 (K), 187 (G, H, N, Q, S, T, W), 188 (F), 189 (D, G), 199 (G), 228 (R), 252 (N), 264 (R), 및 265 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0082] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 전 투여량(full dose)에서의 세제 성능에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (S), 5 (H, I, T), 23 (E, Q), 29 (H, I, R, T), 39 (H, I), 43 (R, T), 54 (T), 58 (Q), 115 (T), 130 (A, R), 154 (L), 158 (E), 180 (K), 187 (T), 228 (R), 및 269 (W)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0083] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 pH 8에서의 pNPO 기질의 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 2 (I), 11 (K), 15 (S), 18 (K), 23 (C,D,E,F,H,I,K,M,N,Q,S,T,V), 24 (H), 26 (T), 27 (A,G,H,N,Q,R,S,T,V), 29 (E), 37 (P), 48 (E, Q), 50 (S), 51 (A,I,L,S,T), 56 (K,V), 58 (M), 66 (N, Q), 75 (A, G, Q, R), 77 (I, T), 91 (E, Q), 94 (R), 96 (K), 99 (D, S), 101 (D, H), 108 (K, M, Y), 111 (A, E, Q), 114 (F, I, V), 117 (Q), 120 (N), 121 (K), 135 (F), 137 (I, Q, R), 154 (F, I, L), 155 (G, S), 156 (W), 163 (F), 169 (S), 176 (I), 187 (H, N, W), 226 (N), 250 (E), 252 (A), 256 (T), 264 (C, H, M, P, Q, S), 265 (M), 및 269 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0084] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 pH 8에서의 pNPO 기질의 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 세제 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 12 (F), 13 (Q), 15 (S), 19 (C, G), 20 (P), 23 (D, E, F, I, V), 24 (W), 26 (C, T, W, Y), 28 (D, P), 31 (E), 34 (P), 37 (C, D), 39 (E, L, P), 42 (I, V), 45 (F, V), 46 (F, G, L, W), 47 (F, M, T, W), 49 (H, V), 51 (A, G, I, L, M, S, T), 60 (L), 64 (V), 66 (Q), 68 (S, T, V), 73 (E, G, R, S), 75 (E, G, Q, R), 77 (A, L, N, T), 91 (E, Q), 94 (D), 108 (E, F, M, Q, Y), 114 (F, I, V), 127 (T), 128 (H, S, Y), 131 (R, W, Y), 132 (D), 133 (E, Q), 136 (D, Q), 139 (M), 140 (F, M, Q), 142 (Y), 154 (I), 155 (S), 156 (W), 159 (E, R), 163 (F, L, P, Y), 168 (G, L), 179 (L), 187 (H, N, Q, T), 188 (F), 189 (D), 205 (D), 208 (E), 209 (S), 214 (D), 223 (T), 225 (E), 228 (E), 237 (L, Y), 250 (E), 251 (D), 252 (A), 256 (T), 264 (C, H, P, Q, S), 및 265 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

- [0085] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 pH 8에서의 pNPO 기질의 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 LAS 안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (F, R), 4 (K, L, N, W), 5 (K), 11 (K), 23 (K), 27 (A, H, N, R, S, T, V), 37 (P), 38 (H, K, L, W, Y), 42 (V), 43 (I, R), 45 (F, Q, V), 47 (T), 49 (V), 51 (I, M, S), 56 (H, K, S, T), 58 (M, Q), 73 (S), 75 (D, E, G, Q, R), 91 (Q), 94 (R), 101 (D), 108 (K), 111 (A), 119 (D, T), 120 (Y), 154 (I), 179 (L), 187 (T), 189 (D, Q), 200 (A), 209 (S), 211 (W), 226 (N), 250 (E, Q), 251 (W), 252 (A), 및 256 (T)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0086] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 2 (I,L), 3 (D), 4 (D,I,L,W), 5 (H,Y), 8 (H,M), 9 (K), 11 (H,K), 18 (K), 23 (K), 24 (A,T), 26 (K,T), 27 (A,I,Q,T), 29 (H,I,K,R,T,V), 30 (R,V), 32 (S), 35 (K), 37 (G), 40 (M), 54 (V), 69 (A,K), 71 (R), 72 (L), 74 (A), 75 (M,S), 91 (I), 94 (R), 101 (Y), 108 (K,Y), 111 (L,T,V), 114 (I), 122 (T,Y), 123 (Q), 125 (Q), 130 (F,H), 132 (H,W), 134 (L,V), 137 (H,K,S,T,W,Y), 151 (T,W), 155 (G), 156 (W), 162 (G), 163 (Y), 166 (G), 176 (I), 180 (K), 187 (H,S,T,W), 189 (K), 232 (L,P), 233 (D,H), 237 (L,Y), 244 (I), 252 (L,T), 255 (L), 263 (I,V), 265 (M), 및 269 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0087] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPO 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (D), 2 (L), 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,Y), 8 (A,E,M), 9 (R), 18 (K), 23 (D,E,F,N,Q), 24 (A,D,E,H,N,T), 26 (G,K), 27 (A,E,I,N,Q,T), 29 (E,Q,R), 33 (D,E,F,M,Q,R,S), 37 (D,E,P,Q), 38 (D,N), 40 (M), 48 (E,Q), 49 (V), 50 (E,F), 51 (I,L,T), 54 (F,R), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 64 (N), 66 (Q), 74 (Q), 75 (E,M,N,Q,R), 77 (A,I,L,T), 87 (P), 90 (E,F,Q), 101 (D), 105 (D,P), 108 (K,Q,Y), 111 (A,E,L,Q,T), 114 (F,M), 115 (R), 117 (Q), 120 (N), 122 (Y), 123 (E,L,M,N,Q), 125 (Q), 127 (E,F,R), 130 (A,F,H,Q), 132 (K,Q,R), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,T,V,W,Y), 154 (F,L), 155 (G,S), 156 (F,W), 158 (E,F,Y), 162 (G,R), 163 (F,P,S,W,Y), 169 (S), 176 (I), 180 (K), 187 (H,N,Q,S,T,W), 189 (D,Q,R), 225 (E), 227 (M), 228 (E), 232 (P), 233 (D,G,Q), 264 (E,M,N,P,Q,R,S,T), 265 (M), 및 269 (M,Q)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0088] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (Q,S), 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,S,Y), 9 (M), 11 (K), 12 (F), 15 (S), 23 (F), 27 (E,N,Q,T), 29 (R), 32 (A,Q,S), 33 (D,Q), 35 (E,K,R), 40 (M), 48 (Q), 51 (I,L,M,T), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 71 (E), 75 (R), 77 (I,T), 87 (P), 105 (A), 108 (K), 111 (A,L), 114 (M), 115 (R), 127 (E,F), 130 (A), 132 (Q,R,W), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,Y), 143 (A), 155 (S), 162 (G), 163 (F,P,S,W,Y), 164 (D,R), 165 (I,Y), 187 (H,N,Q,S,W), 189 (R), 225 (E), 227 (A,M), 232 (P), 233 (Q), 244 (I), 252 (A,K,L,R), 263 (I,V), 264 (H,R,T), 및 269 (V)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0089] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB 및 pNPO 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 2 (L), 3 (D), 4 (D,L), 5 (H,Y), 8 (M), 18 (K), 24 (A,T), 26 (K), 27 (A,I,Q,T), 29 (R), 40 (M), 75 (M), 108 (K,Y), 111 (L,T), 122 (Y), 123 (Q), 125 (Q), 130 (F,H), 134 (L), 137 (H,K,S,T,W,Y), 155 (G), 156 (W), 162 (G), 163 (Y), 176 (I), 180 (K), 187 (H,S,T,W), 232 (P), 233 (D), 265 (M), 및 269 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

- [0090] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPO 및 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 3 (D,T), 4 (A,D,L,M), 5 (H,Y), 23 (F), 27 (E,N,Q,T), 29 (R), 33 (D,Q), 40 (M), 48 (Q), 51 (I,L,T), 56 (H,K,R,T), 58 (M,Q), 75 (R), 77 (I,T), 87 (P), 108 (K), 111 (A,L), 114 (M), 115 (R), 127 (E,F), 130 (A), 132 (Q,R), 134 (L), 137 (E,G,H,I,K,Q,R,S,Y), 155 (S), 162 (G), 163 (F,P,S,W,Y), 187 (H,N,Q,S,W), 189 (R), 225 (E), 227 (M), 232 (P), 233 (Q), 및 264 (R,T)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0091] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB, pNPO 및 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 3 (D), 4 (D,L), 5 (H), 5 (Y), 27 (Q,T), 29 (R), 40 (M), 108 (K), 111 (L), 134 (L), 137 (H,K,S,Y), 162 (G), 163 (Y), 187 (H,S,W), 및 232 (P)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0092] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pNPB 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이하이고 pNPP 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (Q), 9 (M), 12 (F), 15 (S), 23 (F), 27 (E), 32 (Q), 35 (E), 48 (Q), 58 (M, Q), 71 (E), 75 (R), 115 (R), 130 (A), 132 (Q, R), 137 (E, I, Q, R), 143 (A), 155 (S), 163 (F, P, S), 164 (D), 165 (I, Y), 187 (Q), 225 (E), 227 (A, M), 233 (Q), 252 (A, K,R), 264 (H, R, T), 및 269 (V)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0093] 본 발명의 지방분해 효소 위치는 모 지방분해 효소에 대한 아미노산 변형을 갖고, 여기서 변형은 발현 및 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고 pH 6에서의 pNPO 가수분해에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 1.1 이상인 변형이고, 생산 변형이 1 (Q,S), 2 (L), 3 (T), 4 (A, D, L, M), 5 (H, Y), 9 (K), 11 (K), 12 (F), 15 (S), 24 (A, D, E, H, N), 27 (A, E, Q, T), 29 (R), 32 (A), 33 (D, F, Q), 38 (D), 40 (M), 48 (Q), 49 (V), 51 (I, L, M, T), 56 (H, K, T), 58 (M, Q), 69 (A), 75 (R), 77 (T), 91 (Q), 94 (R), 98 (I), 105 (A), 108 (K, Y), 111 (A, L), 114 (I, M, V), 121 (K), 123 (E, L, M, N, Q), 125 (Q), 127 (E, F), 130 (A, H), 132 (R), 134 (L), 137 (E, G, H, I, K, Q, R, S, V, Y), 143 (A), 151 (P), 154 (F, I, L), 155 (S), 156 (W), 158 (Y), 162 (G), 163 (F, P, W, Y), 164 (D, R), 165 (I, Y), 180 (K), 187 (H, N, Q, S, T, W), 189 (R), 227 (M), 228 (R), 232 (P), 252 (L), 263 (I, V), 265 (M), 및 269 (M)로 이루어진 군으로부터 선택되고, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0094] 본 발명의 폴리펩티드
- [0095] 본 발명은 "본 발명의 폴리펩티드"로 총괄적으로 불릴 수 있는 신규한 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들어, 효소적 활성(예를 들어, 지방분해 활성)을 갖는 변이 지방분해 효소 폴리펩티드를 포함하여, 단리된, 재조합된, 실질적으로 순수한, 또는 비자연적으로 발생하는 변이 지방분해 효소 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 세정 응용에 유용하고 세척을 필요로 하는 물품 또는 표면(예를 들어, 물품의 표면)을 세정하는 방법에 유용한 세정 조성물에 포함될 수 있다.
- [0096] 일부 실시 형태에서, 지방분해 효소 변이체는 *썬모마이세스* 속으로부터의 모 지방분해 효소의 변이체일 수 있다. 서로에 대해 그리고 서열 번호 4에 나타낸 바와 같은 *썬모마이세스 라누기노수스*(TLL)로부터의 지방분해 효소에 대해 높은 동일성을 갖는 다양한 지방분해 효소들이 *썬모마이세스* 속에서 발견되어 왔다. 상기 섹션에서 설명된 모든 지방분해 효소 변이체는 *썬모마이세스* 속으로부터의 모 지방분해 효소의 변이체일 수 있고, 더욱 구체적으로 서열 번호 4에 나타낸 바와 같은 *썬모마이세스 라누기노수스* (TLL)로부터의 지방분해 효소의 변이체일 수 있다.
- [0097] 일부 실시 형태에서, 지방분해 효소 변이체는 *썬모마이세스* 속으로부터의 지방분해 효소에 대해 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 변이체일 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 지방분해 효소 변이체는 서열 번호 4에 나타낸 바와 같은 *썬모마이세스 라누기노수스*(TLL)로부터의 지방분해 효소에 대해

50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 변이체일 수 있다.

- [0098] *썬모마이세스 라누기노수스*(TLL)로부터 클로닝된(cloned) 리파제에 관한 조성물 및 방법이 설명된다. 조성물 및 방법은 클로닝되고 발현된 TLL이 세제 조성물의 존재 하에서 (카르복실산 에스테르에 작용하는) 카르복실산 에스테르 하이드롤라제 활성을 갖는 관찰에 부분적으로 기초한다. TLL의 이러한 특징으로 인해, 이는 세제 조성물에서 발견되는 계면활성제 및 다른 성분의 존재 하에서 효소가 지방을 가수분해할 수 있는 다양한 세정 응용에서의 사용에 매우 적합하게 된다.
- [0099] TLL이 다양한 자연 및 합성 기질에 대해 활성을 나타내는 한편, 효소는 C4-C16 기질들에 선호도를 나타내었고, C8 기질에 대해 피크 활성을 가졌다. 이러한 특이성 프로파일로 인해 TLL은 단쇄, 중쇄 및 장쇄 트라이글리세라이드의 가수분해에 매우 적합하게 되고 단쇄, 중쇄 및 장쇄 지방산 에스테르를 수반하는 에스테르 교환 반응을 수행하기에 매우 적합하게 된다.
- [0100] 일 태양에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 변이 TLL 폴리펩티드를 제공한다. 모 TLL 폴리펩티드는 (PDB: 1DT3 으로서 제시된 성숙 리파제의 아미노산 서열을 갖는 리조무코르 미하이(*Rhizomucor mihei*) 리파제 유사체인 페밀리 abH23.01(리파제 엔지니어링 데이터베이스(Lipase Engineering Database), www.led.uni-stuttgart.de) 유래) *썬모마이세스 라누기노수스*로부터 단리되었다. 성숙 TLL 폴리펩티드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는다. 유사하게, 실질적으로 동일한 TLL 폴리펩티드는 자연에서, 예를 들어 다른 균주들에서 또는 *T. 라누기노수스*의 단리체에서 발생할 수 있다. 이러한 그리고 다른 재조합 TLL 폴리펩티드는 본 발명의 조성물 및 방법을 포함한다.
- [0101] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 단리된, 재조합된, 실질적으로 순수한, 또는 비자연적으로 발생하는, 지방분해 활성을 갖는 변이 지방분해 효소를 포함하고, 폴리펩티드는 본 명세서에서 제공되는 것과 같은 모 지방분해 효소에 대해 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.5% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0102] 일부 실시 형태에서, 변이체 폴리펩티드는 예시된 TLL 폴리펩티드에 대해 특정된 정도의 아미노산 서열 상동성, 예를 들어, 서열 번호 3 또는 4의 아미노산에 대해 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, 또는 심지어 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 변이체이다. 상동성은, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이, BLAST, ALIGN, 또는 CLUSTAL 과 같은 프로그램을 사용하여 아미노산 서열 정렬에 의해 결정될 수 있다.
- [0103] 또한, 지방분해 활성을 갖는 변이 지방분해 효소를 암호화하는 단리된, 재조합된, 실질적으로 순수한, 또는 비자연적으로 발생하는 서열이 제공되는데, 상기 변이 지방분해 효소(예를 들어, 변이 리파제)는 서열 번호 4의 아미노산 서열과는 50개 이하, 40개 이하, 30개 이하, 35개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기(들)만큼 상이한 아미노산 서열을 포함하고, 변이 리파제의 아미노산 위치는 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL 아미노산 서열과 변이 지방분해 효소 아미노산 서열의 정렬에 의해 결정된 것과 같이 서열 번호 4에 나타난 *썬모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에서 대응하는 아미노산 위치의 번호에 따라 번호가 매겨진다.
- [0104] 위에서 언급한 바와 같이, 본 발명의 변이 지방분해 효소 폴리펩티드는 효소적 활성(예를 들어, 지방분해 활성)을 가지므로 식기류 물품, 식탁용 식기류 물품, 패브릭, 및 경질 표면을 가진 물품(예를 들어, 식탁, 식탁 윗면, 벽, 가구 물품, 바닥, 천장 등의 경질 표면)을 세정하는 방법을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 세정 응용에 유용하다. 본 발명의 하나 이상의 변이 지방분해 효소 폴리펩티드를 포함하는 예시적인 세정 조성물이 아래에서 설명된다. 본 발명의 변이 지방분해 효소 폴리펩티드의 효소적 활성(예를 들어, 지방분해 효소 활성)은 당업자에게 공지된 과정을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다. 아래에 제시된 실시예는 효소적 활성, 세정 성능, 세제 안정성 및/또는 열안정성을 평가하기 위한 방법을 설명한다. 얼룩(예를 들어, 지방 얼룩)의 제거, 경질 표면의 세정, 또는 세탁물, 식기류 또는 식탁용 식기류 물품(들)의 세정에 있어서 본 발명의 변이 지방분해 효소의 성능은 본 기술 분야에 공지된 과정을 이용하여 그리고/또는 실시예에 제시된 과정을 이용함으로써 용이하게 결정될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 폴리펩티드는, 폴리펩티드의 효소적 활성을 실질적으로 변경하지 않는 변화의 경우를 포함하여, 보존

적 또는 비보존적인, 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실, 및/또는 치환과 같은 다양한 변화를 겪을 수 있다. 유사하게, 본 발명의 핵산은 또한, 특정 코돈이 동일하거나 상이한 아미노산을 암호화하여 침묵 변이(silent variation)(예를 들어, 예컨대 암호화된 아미노산이 핵산 돌연변이에 의해 변경되지 않은 경우, 뉴클레오티드 서열에서의 돌연변이가 아미노산 서열에서의 침묵 돌연변이를 야기함) 또는 비침묵 변이를 야기하도록 하는 하나 이상의 코돈에서의 하나 이상의 핵산의 하나 이상 치환, 서열에서 하나 이상의 핵산(또는 코돈)의 하나 이상의 결실, 서열에서 하나 이상의 핵산(또는 코돈)의 하나 이상의 첨가 또는 삽입, 및/또는 서열에서 하나 이상의 핵산(또는 코돈)의 분할 또는 하나 이상의 절단과 같은 다양한 변화를 겪을 수 있다. 핵산 서열에서의 많은 그러한 변화는 원래의 핵산 서열에 의해 암호화된 변이 지방분해 효소와 비교하여, 생성된 암호화된 변이 지방분해 효소의 효소적 활성을 실질적으로 변경하지 않을 수 있다. 본 발명의 핵산은 또한 발현 시스템(예를 들어, 박테리아 발현 시스템)에서 최적의 발현을 제공하는 하나 이상의 코돈을 포함하도록 변형될 수 있는 한편, 원한다면, 상기 하나 이상의 코돈은 여전히 동일한 아미노산을 암호화한다.

[0106]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 아미노산 치환을 갖는 서열을 포함하고 또한 보존적 및 비보존적 치환과 같은 하나 이상의 추가적인 아미노산 치환을 포함하는, 원하는 효소적 활성(예를 들어, 지방분해 효소 활성 또는 세정 성능 활성)을 갖는 변이 지방분해 효소 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드 속을 제공하는 데, 여기서 폴리펩티드는 원하는 효소적 활성(예를 들어, 변이 지방분해 효소의 세정 활성 또는 성능에 반영된 바와 같은 지방분해 효소 활성 또는 리파제 활성)을 나타내고, 유지하고 또는 대략적으로 유지한다. 본 발명에 따른 아미노산 치환은 하나 이상의 비보존적 치환 및/또는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 보존적 아미노산 잔기 치환은 전형적으로 아미노산 잔기의 하나의 기능적 부류 내 멤버를 동일한 기능적 부류에 속하는 잔기와 교환하는 것을 포함한다(동일한 아미노산 잔기는 기능적으로 상동성인 것으로 또는 퍼센트 기능적 상동성의 계산 시 보존된 것으로 간주된다). 보존적 아미노산 치환은 전형적으로 아미노산 서열에서 아미노산을 기능적으로 유사한 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 예를 들어, 알라닌, 글리신, 세린, 및 트레오닌은 기능적으로 유사하므로 서로 보존적 아미노산 치환체로서 역할을 할 수 있다. 아스파르트산 및 글루탐산은 서로 보존적 치환체로서 역할을 할 수 있다. 아스파라긴 및 글루타민은 서로 보존적 치환체로서 역할을 할 수 있다. 알지닌, 라이신, 및 히스티딘은 서로 보존적 치환체로서 역할을 할 수 있다. 아이소류신, 류신, 메티오닌, 및 발린은 서로 보존적 치환체로서 역할을 할 수 있다. 페닐알라닌, 타이로신, 및 트립토판은 서로 보존적 치환체로서 역할을 할 수 있다.

[0107]

다른 보존적 아미노산 치환체 그룹들이 구상될 수 있다. 예를 들어, 아미노산은 유사한 기능 또는 화학적 구조 또는 조성(예를 들어, 산성, 염기성, 지방족, 방향족, 황-함유)에 따라 그룹화될 수 있다. 예를 들어, 지방족 그룹은 글리신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 아이소류신 (I)을 포함할 수 있다. 서로 보존적인 치환으로 간주되는 아미노산을 포함하는 다른 그룹은 방향족: 페닐알라닌 (F), 타이로신 (Y), 트립토판 (W); 황-함유: 메티오닌 (M), 시스테인 (C); 염기성: 알지닌 (R), 라이신 (K), 히스티딘 (H); 산성: 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 비극성 비대전 잔기, 시스테인 (C), 메티오닌 (M), 및 프롤린 (P); 친수성 비대전 잔기: 세린 (S), 트레오닌 (T), 아스파라긴 (N), 및 글루타민 (Q)을 포함한다. 추가적인 아미노산 그룹은 당업자에게 공지되어 있고 다양한 표준 교과서에 기재되어 있다. 상기 치환 그룹과 함께 한 본 명세서에서의 폴리펩티드 서열의 목록은 모든 보존적으로 치환된 폴리펩티드 서열의 명확한 목록을 제공한다.

[0108]

더 보존적인 치환은 위에서 설명된 아미노산 잔기 클래스 내에 존재하고, 이는 또한 또는 대안적으로 적합할 수 있다. 더 보존적인 치환을 위한 보존 그룹은: 발린-류신-아이소류신, 페닐알라닌-타이로신, 라이신-알지닌, 알라닌-발린, 및 아스파라긴-글루타민을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 본 발명은 지방분해 활성을 갖는 단리된 또는 재조합된 변이 지방분해 효소 폴리펩티드(예를 들어, 변이 리파제)를 제공하고, 상기 변이 지방분해 효소 폴리펩티드는 서열 번호 4의 아미노산에 대해 적어도 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99.5%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 변이 지방분해 효소에서 하나의 아미노산의 다른 하나로의 보존적 치환이 변이 지방분해 효소의 효소적 활성 또는 세정 성능 활성을 유의하게 변경할 것으로 예상되지는 않는다. 생성된 지방분해 효소의 효소적 활성 또는 세정 성능 활성은 표준 검정법 및 본 명세서에 기재된 검정법을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0109]

본 발명의 폴리펩티드 서열의 보존적으로 치환된 변이체(예를 들어, 본 발명의 변이 지방분해 효소)는 작은 백분율의, 종종 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 14%, 약 13%, 약 12%, 약 11%, 약 10%, 약 9%, 약 8%, 약 7%, 또는 약 6% 미만의 폴리펩티드 서열의 아미노산의, 또는 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1% 미만의 폴리펩티드 서열의 아미노산의 동일한 보존적 치환 그룹의 보존적으로 선택된 아미노산으로의 치환을 포함한다.

- [0110] 본 발명의 핵산
- [0111] 본 발명은 "본 발명의 핵산" 또는 "본 발명의 폴리뉴클레오티드"로 총괄적으로 불릴 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된, 비자연적으로 발생하는, 또는 재조합된 핵산(또는 본 명세서에서 "폴리뉴클레오티드"로 지칭됨)을 제공한다. 아래에서 설명된 모두를 포함하는 본 발명의 핵산은 전형적으로 관심 폴리펩티드 또는 그의 단편을 암호화하는 서열을 포함하는 플라스미드 발현 벡터의 발현을 통한, 본 발명의 폴리펩티드의 재조합 생산(예를 들어, 발현)에 유용하다. 앞서 논의된 바와 같이, 폴리펩티드는 세정을 필요로 하는 물질 또는 표면(예를 들어, 물질의 표면)을 세정하기 위한 세정 응용 및 세정 조성물에 유용한 효소적 활성(예를 들어, 지방분해 활성)을 갖는 변이 리파제 폴리펩티드를 포함하는 변이 지방분해 효소 폴리펩티드를 포함한다.
- [0112] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 "본 발명의 폴리펩티드"라는 제목의 섹션에서 앞서 설명된 그리고 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 본 발명의 (임의의 융합 단백질 등을 포함하는) 임의의 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된, 재조합된, 실질적으로 순수한, 또는 비자연적으로 발생하는 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 위에서 그리고 본 명세서의 다른 곳에서 설명된 본 발명의 임의의 폴리펩티드 들 중 둘 이상의 조합을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된, 재조합된, 실질적으로 순수한, 또는 비자연적으로 발생하는 핵산을 제공한다.
- [0113] 또한 지방분해 활성을 갖는 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리된, 재조합된, 실질적으로 순수한, 또는 비자연적으로 발생하는 핵산이 제공되고, 상기 변이 지방분해 효소(예를 들어, 변이 리파제)는 서열 번호 4의 아미노산 서열과는 50개 이하, 40개 이하, 30개 이하, 35개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이한 아미노산 서열을 포함하고, 변이 리파제의 아미노산 위치는 *써모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL 아미노산 서열과 변이 지방분해 효소 아미노산 서열의 정렬에 의해 결정된 것과 같이 서열 번호 1에 나타난 *써모마이세스 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에서 대응하는 아미노산 위치의 번호에 따라 번호가 매겨진다.
- [0114] 전술된 바와 같이, 본 발명은 *써모마이세스* 리파제의 리파제 변이체를 암호화하는 핵산을 제공하는데, 리파제 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 4에 제시된 *T. 라누기노수스* 리파제 TLL의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.
- [0115] 본 발명의 핵산은 임의의 적합한 합성, 조작, 및/또는 단리 기술, 또는 이들의 조합을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 표준 핵산 합성 기술, 예를 들어 당업자에게 공지된 고상 합성 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 본 발명의 핵산의 합성은 또한, 자동화된 합성 방법에서 전형적으로 실행되는 고전적인 포스포아미다이트 방법(예를 들어, 문헌[Beaucage *et al.* Tetrahedron Letters 22:1859-69 (1981)] 참조); 또는 매테스(Matthes) 등에 의해 설명된 방법(문헌[Matthes *et al.*, EMBO J. 3:801-805 (1984)] 참조)을 사용하는 화학적 합성을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는, 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 가능해질 (또는 대안적으로 완성될) 수 있다. 본 발명의 핵산은 또한 자동 DNA 합성기를 사용하여 생산될 수 있다. 맞춤형 핵산은 다양한 상업적 공급원(예를 들어, 더 미드랜드 서티파이드 리에이전즈 컴퍼니(The Midland Certified Reagent Company), 더 그레이트 아메리칸 진 컴퍼니(the Great American Gene Company), 오페론 테크놀로지즈 인크.(Operon Technologies Inc.), 및 DNA2.0)로부터 주문될 수 있다. 핵산을 합성하기 위한 다른 기술들 및 관련 원리들이 본 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Itakura *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323 (1984)]; 및 문헌[Itakura *et al.*, Science 198:1056 (1984)] 참조).
- [0116] 본 발명의 변형된 변이 지방분해 효소를 제조하는 방법
- [0117] 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 본 발명의 변형된 폴리뉴클레오티드를 생성하기에 적합한 다양한 방법, 예를 들어, 부위-포화 돌연변이법, 스캐닝 돌연변이법, 삽입 돌연변이법, 결실 돌연변이법, 랜덤 돌연변이법, 부위-지정 돌연변이법(site-directed mutagenesis), 및 지정-진화(directed-evolution)와 더불어 다양한 다른 재조합 접근법을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 방법이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 변형된 폴리뉴클레오티드 및 단백질(예를 들어, 변이 지방분해 효소)을 제조하는 방법은 DNA 셔플링(shuffling) 방법, 유전자의 비상동성 재조합을 기조로 하는 방법, 예를 들어 ITCHY(문헌[Ostermeier *et al.*, 7:2139-44 (1999)] 참조), SCRACHY(문헌[Lutz *et al.* 98:11248-53 (2001)] 참조), SHIPREC(문헌[Sieber *et al.*, 19:456-60 (2001)], 및 NRR(문헌[Bittker *et al.*, 20:1024-9 (2001)]; 문헌[Bittker *et al.*, 101:7011-6 (2004)] 참조),

및 무작위 및 표적화된 돌연변이, 결실 및/또는 삽입을 삽입하기 위한 올리고뉴클레오타이드의 사용에 의존하는 방법(문헌[Ness *et al.*, 20:1251-5 (2002); Coco *et al.*, 20:1246-50 (2002)]; 문헌[Zha *et al.*, 4:34-9 (2003)]; 문헌[Glaser *et al.*, 149:3903-13 (1992)] 참조)을 포함한다.

[0118]

본 발명의 변이 지방분해 효소를 생산하기 위한 벡터, 세포, 및 방법

[0119]

본 발명은 본 명세서에서 설명된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 명세서에서 설명된 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)를 적어도 하나 포함하는 단리된 또는 재조합된 벡터, 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하는 단리된 또는 재조합된 발현 벡터 또는 발현 카세트(cassette), 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하는 단리된, 실질적으로 순수한, 또는 재조합된 DNA 작제물(construct), 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하는 단리된 또는 재조합된 세포, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하는 세포를 포함하는 세포 배양물, 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하는 세포 배양물, 및 하나 이상의 그러한 벡터, 핵산, 발현 벡터, 발현 카세트, DNA 작제물, 세포, 세포 배양물, 또는 이들의 임의의 조합 또는 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0120]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하는 본 발명의 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 DNA 작제물)를 적어도 하나 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 일부의 그러한 재조합 세포는 그러한 적어도 하나의 벡터로 형질전환 또는 형질주입된다. 그러한 세포는 전형적으로 숙주 세포로 불린다. 일부의 그러한 세포는 바실러스(*Bacillus*) 종 세포, 예를 들어 *B. 서브틸리스*(*B. subtilis*) 세포를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 박테리아 세포를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하는 재조합 세포(예를 들어, 재조합 숙주 세포)를 제공한다.

[0121]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 벡터는 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열이 효과적인 유전자 발현에 필요한 하나 또는 추가적인 핵산 분절에 작동가능하게 연결된 발현 벡터 또는 발현 카세트(예를 들어, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터)이다. 벡터는 전사 종결자 및/또는 선택 유전자, 예를 들어, 항미생물제-함유 배지에서 성장에 의해 플라즈미드-감염 숙주 세포의 연속적인 배양 유지를 가능하게 하는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있다.

[0122]

발현 벡터는 플라즈미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래될 수 있고, 또는 대안적인 실시 형태에서, 둘 모두의 요소를 포함한다. 예시적인 벡터는 pXX, pC194, pJH101, pE194, pHp13(문헌[Harwood and Cutting [eds.], Chapter 3, Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons [1990]; *B. 서브틸리스*에 적합한 복제 플라즈미드는 p. 92에 나열된 것들을 포함함] 참조; 또한 문헌[Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, in Sonenshein *et al.*, [eds.] *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], pp. 615-624] 참조)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0123]

관심 단백질(예를 들어, 변이 지방분해 효소)의 세포 내의 발현 및 생산을 위해, 변형된 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 적어도 하나의 카피를 포함하는 그리고 바람직하게는 다수의 카피들을 포함하는 적어도 하나의 발현 벡터가 지방분해 효소의 발현에 적합한 조건 하에서 세포 내로 형질전환된다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 (벡터 내에 포함된 다른 서열과 더불어) 숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 한편, 다른 실시 형태에서는, 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라즈미드 벡터가 세포 내에 자율적 염색체 외 요소로서 남아있다. 본 발명은 염색체 외 핵산 요소와 숙주 세포 게놈 내로 통합되는 인커밍(incoming) 뉴클레오타이드 서열 둘 모두를 제공한다. 본 명세서에 기재된 벡터는 본 발명의 변이 지방분해 효소의 생산에 유용하다. 일부 실시 형태에서, 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 작제물은 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 박테리아 염색체 내로의 통합 및 선택적인 증폭을 가능하게 하는 통합 벡터 상에 존재한다. 통합을 위한 부위의 예는 당업자에게 공지되어 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사는 선택된 전구체 지방분해 효소에 대한 야생형 프로모터인 프로모터에 의해 유발된다. 일부 다른 실시 형태에서, 프로모터는 전구체 지방분해 효소에 이종이지만, 숙주 세포 내에서 기능적이다. 구체적으로, 박테리아 숙주 세포에서 사용하기에 적합한 프로모터의 예는, 예를 들어, amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpaII 프로모터, *B. 스테아로써모필루스*(*B. stearothermophilus*) 말토제닉 아밀라제 유전자, *B. 아밀로리쿠에파시엔스*(*B. amyloliquefaciens*)(BAN) 아밀라제 유전자, *B. 서브틸리스* 알칼리 지방분해 효소 유전자, *B. 클라우시*(*B. clausii*) 알칼리 지방분해 효소 유전자, *B. 푸밀리스*(*B.*

pumilis) 자일로시다제 유전자, *B. 썬린지엔시스(B. thuringiensis) cryIIIA*, 및 *B. 리체니포르미스(B. licheniformis)* 알파-아밀라제 유전자의 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 추가적인 프로모터는 P_R 또는 P_L 프로모터, 및 대장균(*E. coli*) *lac*, *trp* 또는 *tac* 프로모터뿐만 아니라 A4 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0124]

본 발명의 변이 지방분해 효소는 박테리아 및 진균을 포함하는 임의의 적합한 그람-양성 미생물의 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 변이 지방분해 효소는 진균 및/또는 박테리아 기원의 숙주 세포에서 생산된다. 일부 실시 형태에서, 숙주 세포는 바실러스 중, 스트렙토마이세스 중(*Streptomyces sp.*), 에셰리키아 종(*Escherichia sp.*) 또는 아스퍼질루스 종(*Aspergillus sp.*)이다. 일부 실시 형태에서, 변이 지방분해 효소는 바실러스 중 숙주 세포에 의해 생산된다. 본 발명의 변이 지방분해 효소의 생산에 사용되는 바실러스 중 숙주 세포의 예는 *B. 리체니포르미스*, *B. 렌투스(B. lentus)*, *B. 서브틸리스*, *T. 리누기노수스*, *B. 렌투스*, *B. 브레비스(B. brevis)*, *B. 스테아로썬모필루스*, *B. 알칼로필루스(B. alkalophilus)*, *B. 코아굴란스(B. coagulans)*, *B. 썬쿨란스(B. circulans)*, *B. 푸미리스(B. pumilis)*, *B. 썬린지엔시스*, *B. 클라우시*, 및 *B. 메가테리움(B. megaterium)*, 및 바실러스 속 내 다른 유기체를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, *B. 서브틸리스* 숙주 세포는 변이 지방분해 효소의 생산을 위해 사용된다. 미국 특허 제5,264,366호 및 제4,760,025호(RE 34,606)는 본 발명의 변이 지방분해 효소를 생산하기 위해 사용될 수 있는 다양한 바실러스 숙주 균주를 설명하지만, 다른 적합한 균주도 사용될 수 있다.

[0125]

본 발명의 변이 지방분해 효소를 생산하는데 사용될 수 있는 몇몇 산업적 박테리아 균주는 자연적으로 발생하는 균주 및/또는 재조합 균주의 변이체뿐만 아니라, 비재조합 (즉, 야생형) 바실러스 중 균주를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 숙주 균주는 재조합 균주이고, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 숙주 내로 도입되었다. 일부 실시 형태에서, 숙주 균주는 *B. 서브틸리스* 숙주 균주이고, 특히 재조합 바실러스 서브틸리스 숙주 균주이다. 수많은 *B. 서브틸리스* 균주가 공지되어 있는데, 예를 들어, 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 내지 PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110, 및 PEP 211 균주(예를 들어, 문헌[Hoch *et al.*, Genetics 73:215-228 [1973]] 참조; 또한, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제4,450,235호와 제4,302,544호, 및 EP 0134048호 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 발현 숙주 세포로서 *B. 서브틸리스*의 사용이 본 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Palva *et al.*, Gene 19:81-87 [1982]]; 문헌[Fahnestock and Fischer, J. Bacteriol., 165:796-804 [1986]]; 및 문헌[Wang *et al.*, Gene 69:39-47 [1988]] 참조).

[0126]

일부 실시 형태에서, 바실러스 숙주 세포는 하기 유전자들 중 적어도 하나에 돌연변이 또는 결실을 포함하는 바실러스 종이다: *degU*, *degS*, *degR* 및 *degQ*. 바람직하게는, 돌연변이는 *degU* 유전자에 있고, 및 더욱 바람직하게는, 돌연변이는 *degU(Hy)32*에 있다(예를 들어, 문헌[Msadek *et al.*, J. Bacteriol. 172:824-834 [1990]]; 및 문헌[Olmos *et al.*, Mol. Gen. Genet. 253:562-567 [1997]] 참조). 하나의 적합한 숙주 균주는 *degU32(Hy)* 돌연변이를 옮기는 바실러스 서브틸리스이다. 일부 실시 형태에서, 바실러스 숙주는 *scoCA*(예를 들어, 문헌[Caldwell *et al.*, J. Bacteriol. 183:7329-7340 [2001] 참조); *spoIIE*(예를 들어, 문헌[Arigoni *et al.*, Mol. Microbiol. 31:1407-1415 [1999] 참조); 및/또는 *oppA* 또는 *opp* 오페론의 다른 유전자(예를 들어, 문헌[Perego *et al.*, Mol. Microbiol. 5:173-185 [1991]] 참조)에 돌연변이 또는 결실을 포함한다. 사실, *oppA* 유전자에서의 돌연변이와 동일한 표현형을 야기하는 *opp* 오페론에서의 임의의 돌연변이는 본 발명의 변경된 바실러스 균주의 일부 실시 형태에서 사용될 것으로 간주된다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이는 단독으로 발생하는 한편, 다른 실시 형태에서, 돌연변이들의 조합이 존재한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 생산하는데 사용될 수 있는 변경된 바실러스 숙주 세포주는 위에서 언급된 유전자의 하나 이상에 돌연변이를 이미 포함하는 바실러스 숙주 균주이다. 또한, 내인성 지방분해 효소 유전자의 돌연변이(들) 및/또는 결실을 포함하는 바실러스 중 숙주 세포가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 바실러스 숙주 세포는 *aprE* 및 *nprE* 유전자의 결실을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 바실러스 중 숙주 세포는 5가지 지방분해 효소 유전자들의 결실을 포함하는 한편, 다른 실시 형태에서, 바실러스 중 숙주 세포는 9가지 지방분해 효소 유전자들의 결실을 포함한다(예를 들어, 본 명세서에서 참조로 포함된 미국 특허 출원 공개 제2005/0202535호 참조).

[0127]

숙주 세포는 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 암호화하는 적어도 하나의 핵산으로 형질전환된다. 핵산이 벡터 내로 포함되든 또는 플라스미드 DNA의 존재 없이 사용되든, 일부 실시 형태에서, 이는 전형적으로 미생물, 바람직하게는 대장균 세포 또는 컴피턴트(competent) 바실러스 세포 내로 도입된다. 플라스미드 DNA 작제물 또는 벡터를 사용하고 그러한 플라스미드

DNA 작제물 또는 벡터를 *바실러스* 세포 또는 *대장균* 세포 내로 형질전환시켜 핵산 (예를 들어, DNA)을 그러한 세포 내로 도입하는 방법이 공지되어 있다. 일부 실시 형태에서, 플라스미드는 *대장균* 세포로부터 단리된 후, *바실러스* 세포 내로 형질전환된다. 그러나, *대장균*과 같은 증개 미생물을 사용하는 것이 필수적인 것은 아니고, 일부 실시 형태에서, DNA 작제물 또는 벡터가 *바실러스* 숙주 내로 직접 도입된다.

[0128]

당업자는 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 *바실러스* 세포 내로 도입하는 적합한 방법을 잘 알고 있다(예를 들어, 문헌[Ferrari *et al.*, "Genetics," in Harwood *et al.* [eds.], *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. [1989], pp. 57-72]; 문헌[Saunders *et al.*, *J. Bacteriol.* 157:718-726 [1984]]; 문헌[Hoch *et al.*, *J. Bacteriol.* 93:1925-1937 [1967]]; 문헌[Mann *et al.*, *Current Microbiol.* 13:131-135 [1986]]; 문헌[Holubova, *Folia Microbiol.* 30:97 [1985]]; 문헌[Chang *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 168:11-115 [1979]]; 문헌[Vorobjeva *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 7:261-263 [1980]]; 문헌[Smith *et al.*, *Appl. Env. Microbiol.* 51:634 [1986]]; 문헌[Fisher *et al.*, *Arch. Microbiol.* 139:213-217 [1981]]; 및 문헌[McDonald, *J. Gen. Microbiol.* 130:203 [1984]] 참조). 사실, 원형질체 형질전환 및 회합, 형질도입, 및 원형질체 융합을 포함하는 형질전환과 같은 방법은 공지되어 있고 본 발명에서의 사용에 적합하다. 형질전환 방법은 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 핵산을 포함하는 DNA 작제물 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는데 사용된다. 본 기술 분야에 공지된, *바실러스* 세포를 형질전환하는 방법은, 부분적으로 상동성인 레지던트(resident) 플라스미드를 옮기는 컴피턴트 세포에 의한 도너(donor) 플라스미드의 흡수(uptake)를 수반하는 플라스미드 마커 레스큐(rescue) 형질전환과 같은 방법을 포함한다(문헌[Contente *et al.*, *Plasmid* 2:555-571 [1979]]; 문헌[Haima *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 223:185-191 [1990]]; 문헌[Weinrauch *et al.*, *J. Bacteriol.* 154:1077-1087 [1983]]; 및 문헌[Weinrauch *et al.*, *J. Bacteriol.* 169:1205-1211 [1987]] 참조). 이러한 방법에서, 인커밍 도너 플라스미드는 염색체 형질전환을 모방하는 프로세스에서 레지던트 "헬퍼(helper)" 플라스미드의 상동성 영역과 재결합한다.

[0129]

일반적으로 사용되는 방법에 더하여, 일부 실시 형태에서, 숙주 세포는 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 핵산을 포함하는 DNA 작제물 또는 벡터로 직접 형질전환된다(즉, 중간체 세포는 숙주 세포 내로의 도입 전에 DNA 작제물 또는 벡터의 증폭, 또는 그렇지 않다면 처리하는 데 사용되지 않는다). 본 발명의 DNA 작제물 또는 벡터의 숙주 세포 내로의 도입은 플라스미드 또는 벡터 내로의 삽입 없이 핵산 서열(예를 들어, DNA 서열)을 숙주 세포 내로 도입하기 위한 본 기술 분야에 공지된 그러한 물리적 및 화학적 방법을 포함한다. 그러한 방법은 염화칼슘 침전, 전기천공법, 네이키드(naked) DNA, 리포솜 등을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 추가 실시 형태에서, DNA 작제물 또는 벡터는 플라스미드 내로 삽입되지 않고 플라스미드와 공동형질전환된다. 추가 실시 형태에서, 선택 마커는 본 기술 분야에 공지된 방법에 의해 변경된 *바실러스* 균주로부터 결실된다(문헌[Stahl *et al.*, *J. Bacteriol.* 158:411-418 [1984]]; 및 문헌[Palmeros *et al.*, *Gene* 247:255-264 [2000]] 참조).

[0130]

일부 실시 형태에서, 본 발명의 형질전환된 세포는 종래의 영양 배지에서 배양된다. 적합한 특정 배양 조건, 예를 들어, 온도, pH 등은 당업자에게 공지되어 있고 과학 문헌에 잘 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 또는 핵산을 적어도 하나 포함하는 배양물(예를 들어, 세포 배양물)을 제공한다. 또한 본 발명의 핵산, 벡터, 또는 DNA 작제물을 적어도 하나 포함하는 조성물을 제공한다.

[0131]

일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열로 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 지방분해 효소의 발현을 허용하는 조건 하에서 적합한 영양 배지에서 배양되고, 그 후에 생성된 지방분해 효소는 배양물로부터 회수된다. 세포를 배양하는데 사용된 배지는 숙주 세포를 성장시키기 적합한 임의의 종래 배지, 예를 들어, 적절한 보충물을 포함하는 복합 배지 또는 최소 배지를 포함한다. 적합한 배지는 상업적 공급자로부터 입수가 가능하거나 또는 공개된 레시피에 따라 준비될 수 있다(예를 들어, 문헌[the catalogues of the American Type Culture Collection] 참조). 일부 실시 형태에서, 세포에 의해 생산된 지방분해 효소는, 예를 들어, 원심분리 또는 여과에 의해 배지로부터 숙주 세포를 분리하는 과정, 염(예를 들어, 황산암모늄)으로 상청액 또는 여과물의 단백질을 침전시키는 과정, 크로마토그래픽 정제(예를 들어, 이온 교환, 겔 여과, 친화성 등)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 종래 과정에 의해 배양 배지로부터 회수된다. 변이 지방분해 효소를 회수하거나 정제하기에 적합한 임의의 방법이 본 발명에서 사용된다.

[0132]

일부 실시 형태에서, 재조합 숙주 세포에 의해 생산되는 변이 지방분해 효소는 배양 배지 내로 분비된다. 정제 가능 도메인(purification facilitating domain)을 암호화하는 핵산 서열이 가용성 단백질의 정제를 가능하게

하는데 사용될 수 있다. 변이 지방분해 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터 또는 DNA 작제물은 변이 지방분해 효소의 정제를 가능하게 하기 위해 정제 가능 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Kroll *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]] 참조). 그러한 정제 가능 도메인은, 예를 들어, 고정된 금속 상에서 정제가 가능한 히스티딘-트립토판 모듈과 같은 금속 킬레이팅 펩티드(문헌[Porath, Protein Expr. Purif. 3:263-281 [1992]] 참조), 고정된 면역글로불린 상에서 정제가 가능한 단백질 A 도메인, 및 FLAHS 연장(extension)/친화성 정제 시스템에서 사용되는 도메인(예를 들어, 미국 워싱턴주 시애틀 소재의 이뮤넥스 코퍼레이션(Immunex Corp.)으로부터 입수가 가능한 단백질 A 도메인)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 정제 도메인과 이중 단백질 사이의 절단가능한 링커(linker) 서열의 함유물(inclusion), 예를 들어 인자(Factor) XA 또는 엔테로키나제(enterokinase)(예를 들어, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 입수가 가능한 서열)가 또한 정제를 돕는데 사용된다.

[0133] 본 발명의 변이 지방분해 효소와 같은 효소의 효소적 활성을 검출하고 측정하는 검정법이 공지되어 있다. 지방분해 효소(예를 들어, 본 발명의 변이 지방분해 효소)의 활성을 검출하고 측정하기 위한 다양한 검정법들이 또한 당업자에게 공지되어 있다. 특히, 리파제 검정법에 대한 추가 기준을 기초로 하는 검정법들이 지방분해 효소 활성을 측정하는데 유용하다. 다양한 방법들이 숙주 세포에서 성숙 지방분해 효소(예를 들어, 본 발명의 성숙 변이 지방분해 효소)의 생산 수준을 결정하는데 사용될 수 있다. 그러한 방법은, 예를 들어, 지방분해 효소에 특정된 다중클론 또는 단일클론 항체를 사용하는 방법을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 예시적인 방법은 효소 결합 면역흡착제 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역검정법(radioimmunoassay, RIA), 형광 면역검정법(fluorescent immunoassay, FIA), 및 형광 활성화 세포 분리법(fluorescent activated cell sorting, FACS)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 이들 및 다른 검정법들은 본 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158:1211 [1983]] 참조).

[0134] 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 성숙 변이 지방분해 효소를 제조하거나 생산하는 방법을 제공한다. 성숙 변이 지방분해 효소는 신호 펩티드 서열 또는 프로펩티드 서열을 포함하지 않는다. 일부 방법은, 예를 들어, *바실러스* 종 세포(예를 들어, *B. 서브틸리스* 세포)와 같은 재조합 박테리아 숙주 세포에서 본 발명의 변이 지방분해 효소를 제조하거나 생산하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 변이 지방분해 효소를 생산하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 변이 지방분해 효소의 생산에 도움이 되는 조건 하에서 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 그러한 방법은 배양물로부터 변이 지방분해 효소를 회수하는 단계를 추가로 포함한다.

[0135] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 변이 지방분해 효소를 생산하는 방법을 제공하는데, 본 방법은: (a) 본 발명의 변이 지방분해 효소를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 세포(예를 들어, *B. 서브틸리스* 세포와 같은 박테리아 세포)의 개체군 내로 도입하는 단계; 및 (b) 발현 벡터에 의해 암호화된 변이 지방분해 효소의 생산에 도움이 되는 조건 하에서 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 그러한 방법은 (c) 세포로부터 또는 배양 배지로부터 변이 지방분해 효소를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0136] 패브릭 및 가정용 케어 제품

[0137] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 지방분해 효소 변이체는, 부가 물질 및 지방분해 효소 변이체를 포함하고 패브릭 및 가정용 케어 제품인 조성물에 사용될 수 있다. 적합한 조성물의 예는 실시예 1에서 설명된다.

[0138] 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 지방분해 효소 변이체를 포함하는 패브릭 및 가정용 케어 제품 조성물은 (총 조성물 중량을 기준으로) 하기 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 약 0.0005 중량% 내지 약 0.5 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 0.1 중량%, 또는 심지어 약 0.002 중량% 내지 약 0.05 중량%의 상기 지방분해 효소 변이체; 및 하기 중 하나 이상: 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 패브릭 색조 부여제; 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%의 향료 캡슐; 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 냉수 가용성 증백제; 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 표백 촉매; 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 박테리아 세정 셀룰라제; 및/또는 약 0.05 중량% 내지 약 20 중량%의 게르베(Guerbet) 비이온성 계면활성제.

[0139] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 지방분해 효소(예를 들어, 본 발명의 변이 지방분해 효소)의 "세척 성능"은 조성물에 변이 지방분해 효소를 첨가하지 않은 세제와 비교하여 세제에 대한 추가적인 세정 성능을 제공하는 세척에 대한 지방분해 효소의 기여를 말한다. 세척 성능은 관련 세척 조건 하에서 비교된다. 일부 테스트 시스템에서, 다른 관련 인자, 예를 들어 세제 조성물, 거품 농도(sud concentration), 물 경도, 세척 역학, 시간, pH, 및/또는 온도는 소정의 시장 세그먼트(예를 들어, 손 또는 수동 식기세척, 자동 식기세척, 식기류 세정, 식

탁용 식기류 세정, 패브릭 세정 등)에서 가정 응용에 전형적인 조건을 모방하는 방식으로 제어될 수 있다.

- [0140] 일부 실시 형태에서, 패브릭 및 가정용 케어 제품 조성물은 과립 또는 분말 세탁용 세제이다.
- [0141] 일부 실시 형태에서, 패브릭 및 가정용 케어 제품 조성물은 액체 세탁용 세제 또는 식기 세척 세제이다.
- [0142] 패브릭 및 가정용 케어 제품은 유체 및 고체를 포함하는 임의의 적합한 형태로 제공되도록 의도된다. 패브릭 및 가정용 케어 제품은 특히 액체 형태인 경우, 단위 투여량 파우치의 형태일 수 있고, 전형적으로 패브릭 및 가정용 케어 제품은 적어도 부분적으로, 또는 심지어 완전히, 수용성 파우치로 둘러싸인다. 추가적으로, 적어도 하나의 지방분해 효소 변이체를 포함하는 패브릭 및 가정용 케어 제품의 일부 실시 형태에서, 패브릭 및 가정용 케어 제품은 위에서 상세히 설명된 파라미터들 및/또는 특징들의 임의의 조합을 가질 수 있다.
- [0143] 세정 조성물
- [0144] 세정 조성물 및 세정 제형은 임의의 대상물, 물품, 및/또는 표면을 세정, 표백, 소독, 및/또는 살균하기에 적합한 임의의 조성물을 포함한다. 그러한 조성물 및 제형은, 예를 들어, 세정 또는 세제 조성물을 포함하는 액체 및/또는 고체 조성물(예를 들어, 액체, 정제, 겔, 바(bar), 과립, 및/또는 고체 세탁물 세정 또는 세제 조성물 및 미세 패브릭 세제 조성물; 예를 들어 유리, 목재, 세라믹 및 금속 주방 조리대 및 창을 위한 경질 표면 세정 조성물 및 제형; 카페트 세정제; 오븐 세정제; 패브릭 청정제(freshener); 패브릭 유연제; 및 직물(textile), 세탁물 부스터(booster) 세정 조성물 또는 세제 조성물, 세탁물 부가 세정 조성물, 및 세탁물 예비 얼룩빼기(pre-spotter) 세정 조성물; 손 또는 수동 식기세척 조성물(예를 들어, "손" 또는 "수동" 식기세척 세제) 및 자동 식기세척 조성물(예를 들어, "자동 식기세척 세제")을 포함하는 식기세척 조성물)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.
- [0145] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세정 조성물 또는 세정 제형은, 달리 표시되지 않는다면, 과립 또는 분말형 다목적 또는 강력(heavy-duty) 세척제, 특히 세정 세제; 액체, 과립, 겔, 고체, 정제, 또는 페이스트-형 다목적 세척제, 특히 소위 강력 액체(HDL) 세제 또는 강력 분말 세제(HDD) 유형; 액체 미세-패브릭 세제; 고-발포(high-foaming) 유형인 것을 포함하는 손 또는 수동 식기세척제; 가정 및 공공시설의 사용을 위한 다양한 정제, 분말, 고체, 과립, 액체, 겔, 및 린스-보조 유형을 포함하는 손 또는 수동 식기세척제, 자동 식기세척제, 또는 식기류 또는 식탁용 식기류 세척제; 항균성 손 세척 유형, 세정 바, 구강세척액, 의치 세정제, 차 샴푸, 카페트 샴푸, 욕실 세정제를 포함하는 액체 세정제 및 소독제; 사람 및 다른 동물을 위한 헤어 샴푸 및/또는 헤어-린스; 샤워젤 및 폼 바스 및 금속 세정제; 및 세정 보조제, 예를 들어, 표백 첨가제 및 "얼룩-스틱(stain-stick)" 또는 전처리 유형이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 과립 조성물은 "컴팩트(compact)" 형태이고; 일부 실시 형태에서, 액체 조성물은 "농축된" 형태이다.
- [0146] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세제 조성물" 또는 "세제 제형"은 특정 패브릭 및/또는 비-패브릭 대상물 또는 물품을 포함하는 오염된 또는 더러운 대상물의 세정을 위한 세척 매질에 사용하기 위해 의도된 조성물과 관련하여 사용된다. 본 발명의 그러한 조성물은 임의의 특정 세제 조성물 또는 제형으로 제한되지는 않는다. 사실, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세제는 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하고, 이외에도, 하나 이상의 계면활성제, 트랜스퍼라제(들), 가수분해 효소, 옥시도 리덕타제, 증강제(builder)(예를 들어, 증강제 염), 표백제, 표백 활성화제, 청분제(bluing agent), 형광 염료, 케이킹(caking) 억제제, 마스킹제(masking agent), 효소 활성화제, 산화방지제, 및/또는 가용화제를 포함한다. 몇몇 경우에, 증강제 염은 규산염 및 인산염의 혼합물이며, 바람직하게는 포스페이트(예를 들어, 트라이폴리인산나트륨)보다 실리케이트(예를 들어, 메타규산나트륨)가 더 많은 혼합물이다. 세정 조성물 또는 세제 조성물과 같은, 그러나 이로 제한되지 않는 본 발명의 일부 조성물은 어떠한 포스페이트(예를 들어, 인산염 또는 포스페이트 증강제)도 함유하지 않는다.
- [0147] 달리 언급되지 않는다면, 본 명세서에서 제공되는 모든 성분 또는 조성물 수준은 그 성분 또는 조성물의 활성 수준에 대하여 정해지고, 구매가능한 공급원에 존재할 수 있는 불순물, 예를 들어, 잔류 용매 또는 부산물은 배제된다. 효소 성분 중량은 총 활성 단백질을 기준으로 한다. 달리 표시되지 않는다면, 모든 백분율 및 비는 중량을 기준으로 계산된다. 달리 표시되지 않는다면, 모든 백분율 및 비는 총 조성물을 기준으로 계산된다. 예시적인 세제 조성물에서, 효소 수준은 총 조성물의 중량에 대한 순수한 효소에 의해 표시되고, 달리 특정되지 않는다면, 세제 성분은 총 조성물의 중량을 기준으로 표시된다.
- [0148] 본 명세서에 표시된 바와 같이, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 계면활성제, 증강제, 표백제, 표백 활성화제, 표백 촉매, 기타 효소, 효소 안정화 시스템, 킬레이트제, 광학 증백제, 오염 방지 중합체, 이염제

(dye transfer agent), 분산제, 거품 억제제, 염료, 향료, 착색제, 충전제 염, 향수성 물질(hydrotrope), 광활성제, 형광 물질, 패브릭 컨디셔너, 가수분해성 계면활성제, 방부제, 산화방지제, 수축방지제, 주름방지제, 살균제, 살진균제, 색조 얼룩(color speckle), 실버케어(silvercare), 변색방지제 및/또는 부식방지제, 알칼리성 공급원, 가용화제, 담체, 가공 보조제(processing aid), 안료, 및 pH 조절제를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 부가 물질을 추가로 포함한다(예를 들어, 모두가 본 명세서에 참조로 포함된 미국 특허 제6,610,642호, 제6,605,458호, 제5,705,464호, 제5,710,115호, 제5,698,504호, 제5,695,679호, 제5,686,014호, 및 제5,646,101호 참조). 특정 세정 조성 물질의 실시 형태가 아래에서 상세히 예시된다. 세정 부가 물질이 세정 조성물에서 본 발명의 변이 지방분해 효소와 상용성이 없는 실시 형태에서는, 이때에는 세정 부가 물질 및 지방분해 효소(들)를 두 성분의 조합이 적절할 때까지 분리된 채로 (즉, 서로 접촉되지 않는 채로) 유지하는 적합한 방법이 사용된다. 그러한 분리 방법은 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법(예를 들어, 겔캡(gelcap), 캡슐화, 정제, 물리적 분리 등)을 포함한다.

[0149] **리파제 함유 세제 조성물**

[0150] 본 발명의 세제 조성물은, 예를 들어, 세탁 첨가제 조성물 및 얼룩진 패브릭의 전처리에 사용하기 적합한 조성물을 포함하는 손세탁 및 기계세탁 세제 조성물, 린스 첨가 패브릭 유연제 조성물, 및 일반적으로 가정용 경질 표면 세정 작업 및 식기류 세척 작업에 사용하기 위한 조성물로서 제형화될 수 있다.

[0151] 본 발명에 따른 세제 조성물은 액체, 페이스트, 겔, 바 또는 과립형일 수 있다. (사용 농도에서 수용액에서 측정된) pH는 통상 중성 또는 알칼리성, 예를 들어, 7 내지 11의 범위, 특히 9 내지 11의 범위에 있을 것이다. 본 발명에 따른 과립 조성물은 또한 "컴팩트 형"일 수 있는데, 즉, 종래의 과립 세제보다 상대적으로 높은, 즉, 550 내지 950 g/l의 밀도를 가질 수 있다.

[0152] 본 발명의 조성물은 하나 이상의 보조제(예를 들어, 패브릭으로부터의 지방산 제거에 효율적인 계면활성제) 및 하나 이상의 지방분해 효소를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 보조제 및 지방분해 효소는 단일 조성물에 존재한다. 다른 실시 형태에서, 보조제 및 지방분해 효소는 패브릭 상의 기름 얼룩에 접촉되기 전에 조합되거나 기름 얼룩 상에서 조합되는 개별 조성물들에 존재한다.

[0153] 본 발명의 세정 조성물은 지방분해 효소와의 조합에 사용되는 하나 이상의 보조제(계면활성제)를 포함할 수 있다. 적합한 보조제는 알짜 전하가 없는 상대적으로 작은 친수성 부분 및 선형의 또는 포화된 소수성 부분을 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 소수성 부분은 적어도, 6개, 7개, 8개, 또는 9개의 인접한 지방족 탄소들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 소수성 부분은 환형이다. 일부 실시 형태에서, 소수성 부분은 분지형이 아니다. 적합한 계면활성제는 당-기반(sugar-based) 화합물 및 썬비터이온성 화합물을 포함한다. 적합한 보조제가 WO2011078949호에 개시되고, 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0154] 당-기반 계면활성제는 말토피라노시드, 티오말토피라노시드, 글루코피라노시드, 및 그 유도체를 포함한다. 말토스-기반 계면활성제는 대체로 글루코스-기반 계면활성제보다 더 효과적이었다. 일부 실시 형태에서, 바람직한 당-기반 계면활성제는 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 및 심지어 7개 이상의 탄소의 소수성 꼬리 사슬 길이를 갖는다. 꼬리는 지방족 또는 환형일 수 있다. 꼬리는 비분지형일 수 있지만, 충분한 사슬 길이에 의해 분지가 허용된다.

[0155] 당-기반 계면활성제의 특정 예는 노닐-β-D-말토피라노시드, 데실-β-D-말토피라노시드, 운데실-β-D-말토피라노시드, 도데실-β-D-말토피라노시드, 트라이데실-β-D-말토피라노시드, 테트라데실-β-D-말토피라노시드, 헥사데실-β-D-말토피라노시드, n-도데실-β-D-말토피라노시드 등, 2,6-다이메틸-4-헵틸-β-D-말토피라노시드, 2-프로필-1-헵틸-β-D-말토피라노시드, 노닐-β-D-글루코피라노시드, 노닐-β-D-글루코피라노시드, 데실-β-D-글루코피라노시드, 도데실-β-D-글루코피라노시드, 수크로스 모노도데카노에이트, 소정의 사이클로헥실알킬-β-D-말토시드(예를 들어, 사이말(CYMAL)[®] 및 사이글라(CYGLA)), 및 MEGA[™] 계면활성제를 포함한다.

[0156] 보조제는 비당(non-sugar) 비이온성 계면활성제일 수 있다. 예시적인 계면활성제는 9개 이하의 에톡실레이트 반복을 갖는 트라이톤(Triton)을 포함한다. 특정 트라이톤은 아나포(ANAPOE)[®]-X-100 및 아나포[®]-X-114이다. 일부 실시 형태에서, 보조제는 적어도 약 9개의 탄소의 소수성 꼬리를 갖는 비이온성 포스핀 옥사이드 계면활성제이다. 예시적인 계면활성제는 다이메틸데실포스핀 옥사이드 및 다이메틸도데실포스핀 옥사이드를 포함한다.

[0157] 보조제는 포스-콜린(FOS-choline)과 같은 썬비터이온성 계면활성제일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 포스-콜린은 12개 이상의 사슬 길이를 갖는 소수성 꼬리를 갖는다. 소수성 꼬리는 포화되거나 불포화될 수 있고, 환형일

수 있다. 예시적인 포스-콜린 계면활성제는 포스-콜린[®]-12, 포스-콜린[®]-13, 포스-콜린[®]-14, 라이소포스(LYSOFOS)-콜린[®]-14, 포스-콜린[®]-15, 포스-콜린[®]-16, 포스-메아(MEA)[®]-12, 도데카포스(DODECAFOS), ISO 운세트(unsat) 11-10, ISO 11-6, 사이오포(CYOF0), 노폴(NOPOL)-포스, 사이클로포스(CYCLOFOS)[®] (사이말[®])-5, -6, -7, -8 등, 등을 포함한다.

[0158] 일부 경우에, 보조제는 설포베타인 쯔비터이온성 계면활성제일 수 있다. 바람직한 설포베타인 계면활성제, 예를 들어, 안저젠트(ANZERGENT)[®] 3-12 및 안저젠트[®] 3-14는 적어도 12개의 탄소를 갖는 소수성 꼬리를 갖는다. 쯔비터이온성 산화물 및 칩스(CHAPS)-기반 계면활성제(예를 들어, 칩스 및 칩소(CHAPSO))는 또한 전형적으로 설포베타인보다 높은 투여량에서 효과적이다.

[0159] 일부 경우에, 보조제는 음이온성 세제, 예를 들어, 사르코신(sarcosine)일 수 있다. 바람직한 사르코신은 적어도 10개의 탄소를 갖는 소수성 꼬리를 갖는다. 일부 경우에, 보조제는 또한 테옥시콜레이트일 수 있다.

[0160] 보조제는 0.001% 이상, 0.005% 이상, 0.01% 이상, 0.05% 이상, 0.1% 이상, 또는 그 이상, 또는 0.01 ppm 이상, 0.05 ppm 이상, 0.1 ppm 이상, 0.5 ppm 이상, 1 ppm 이상, 5 ppm 이상, 10 ppm 이상, 또는 그 이상의 양으로 조성물에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 보조제는 미리 선택된 범위, 예를 들어, 약 0.001 내지 0.01%, 약 0.01 내지 0.1%, 약 0.1 내지 1%, 또는 약 0.01 내지 1 ppm, 약 0.1 내지 1 ppm, 또는 약 1 내지 10 ppm으로 존재할 수 있다. 일부 경우에, 최적 활성은 소정 범위에 걸쳐 관찰되는데, 그 범위 초과 및 미만에서는 활성이 감소된다.

[0161] 세제의 계면활성제 시스템은 비이온성, 음이온성, 양이온성, 양성(ampholytic), 및/또는 쯔비터이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 계면활성제는 전형적으로 0.1 중량% 내지 60 중량%, 예를 들어, 1 중량% 내지 40 중량%, 특히 10 내지 40 중량%, 바람직하게는 약 3 중량% 내지 약 20 중량%의 수준으로 존재한다. 세제는 통상 0 내지 50%의 음이온성 계면활성제, 예를 들어, 선형 알킬벤젠설포네이트(LAS), 알파-올레핀 설포네이트(AOS), 알킬 설페이트(지방산 알코올 설페이트)(AS), 알코올 에톡시설페이트(AEOS 또는 AES), 이차 알칸 설포네이트(SAS), 알파-설포 지방산 메틸 에스테르, 알킬- 또는 알케닐석신산 또는 비누를 포함할 것이다.

[0162] 세제는 알킬 페놀의 비이온성 계면활성제 폴리알킬렌 옥사이드(예를 들어, 폴리에틸렌 옥사이드) 축합체를 0 내지 40% 포함할 수 있다. 바람직한 비이온성 계면활성제는 (예를 들어, WO 92106154호에 기재된 바와 같은) 알코올 에톡시레이트(AEO 또는 AE), 카르복실화 알코올 에톡시레이트, 노닐페놀 에톡시레이트, 알킬폴리글리코시드, 알킬다이메틸아민옥사이드, 에톡실화 지방산 모노에탄올아미드, 지방산 모노에탄올아미드, 알킬(N-메틸)-글루코사이드 또는 폴리하이드록시 알킬 지방산 아미드이다.

[0163] 반극성 비이온성 계면활성제는 다른 범주의 비이온성 계면활성제이고, 이는 약 10 내지 약 18개의 탄소 원자를 갖는 1개의 알킬 부분 및 약 1 내지 약 3개의 탄소 원자를 포함하는 하이드록시알킬 기 및 알킬 기로 이루어진 군으로부터 선택된 2개의 부분을 포함하는 수용성 아민 옥사이드; 약 10 내지 약 18개의 탄소 원자를 갖는 1개의 알킬 부분 및 약 1 내지 약 3개의 탄소 원자를 포함하는 하이드록시알킬 기 및 알킬 기로 이루어진 군으로부터 선택된 2개의 부분을 포함하는 수용성 포스핀 옥사이드; 및 약 10 내지 약 18개의 탄소 원자를 갖는 1개의 알킬 부분 및 약 1 내지 약 3개의 탄소 원자를 갖는 하이드록시알킬 및 알킬 부분으로 이루어진 군으로부터 선택된 부분을 포함하는 수용성 설포사이드를 포함한다. 특히, 아민 옥사이드 계면활성제는 C₁₀-C₁₈ 알킬 다이메틸 아민 옥사이드 및 C₈-C₁₂ 알콕시 에틸 다이하이드록시 에틸 아민 옥사이드를 포함한다.

[0164] 세제 조성물은 양이온성 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 사용되는 양이온성 세제성 계면활성제는 하나의 장쇄 하이드로카빌 기를 갖는 것이다. 그러한 양이온성 계면활성제의 예는 암모늄 계면활성제, 예를 들어, 알킬 트라이메틸 암모늄 할로겐화물을 포함한다. 매우 바람직한 양이온성 계면활성제는 수용성 4차 암모늄 화합물이다. 적합한 4차 암모늄 화합물의 예는 코코넛 트라이메틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; 코코넛 메틸 다이하이드록시 에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; 데실 트라이에틸 암모늄 클로라이드; 데실 다이메틸 하이드록실 에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; C₁₂-15 다이메틸 하이드록실 에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; 코코넛 다이메틸 하이드록실 에틸 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; 미리스틸 트라이메틸 암모늄 메틸 설페이트; 라우릴 다이메틸 벤질 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; 라우릴 다이메틸 (에테녹시)₄ 암모늄 클로라이드 또는 브로마이드; 콜린 에스테르, 다이알킬 이미다졸린을 포함한다.

[0165] 세제 조성물은 양성 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제는 2차 또는 3차 아민의 지방족

유도체, 또는 헤테로사이클릭 2차 및 3차 아민의 지방족 유도체로 광범위하게 기재될 수 있고, 여기서 지방족 라디칼은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다. 지방족 치환체 중 하나는 적어도 약 8개의 탄소 원자, 전형적으로 약 8 내지 약 18개의 탄소 원자를 포함하고, 적어도 하나는 음이온 수용성 기, 예를 들어, 카르복시, 설포네이트, 설페이트를 포함한다. 이러한 정의 내에 있는 화합물의 예는 소듐 3-(도데실아미노) 프로피오네이트, 소듐 3-(도데실아미노)- 프로판-1-설포네이트, 소듐 2-(도데실아미노)에틸 설페이트, 소듐 2-(다이메틸아미노)옥타데카노에이트, 다이-소듐 3-(N-카르복시메틸도데실아미노)프로판-I-설포네이트, 다이소듐 옥타데실-이미노다이아세테이트, 소듐-1-카르복시메틸-2-운데실이미다졸, 및 소듐 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-설파토-3-도데코시-프로필아민이다. 소듐 3-(도데실아미노)프로판-I-설포네이트가 바람직하다.

[0166] 썬비터이온성 계면활성제가 또한, 특히 세탁 범위 내의, 세제 조성물에 사용된다. 이러한 계면활성제는 2차 및 3차 아민의 유도체, 헤테로사이클릭 2차 및 3차 아민의 유도체, 또는 4차 암모늄, 4차 포스포늄 또는 3차 설포늄 화합물의 유도체로서 광범위하게 기재될 수 있다. 4차 화합물에서 양이온성 원소는 헤테로사이클릭 고리의 부분일 수 있다. 이러한 화합물 모두에는, 음이온 수용성 기, 예를 들어, 카르복시, 설포네이트, 설페이트, 포스페이트 또는 포스포네이트를 함유하는 적어도 하나의 지방족 치환체 및 약 3 내지 18개의 탄소 원자를 함유하는, 직쇄 또는 분지형의 적어도 하나의 지방족 기가 있다. 썬비터이온성 계면활성제와 조합된 에톡실화 썬비터이온성 화합물은 특히 세탁 응용에서 점토 오염을 제거하는 데 사용되어 왔다.

[0167] 세제는 제올라이트, 다이포스페이트, 트라이포스페이트, 포스포네이트, 시트레이트, 니트릴로트라이아세트산(NTA), 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산(DTMPA), 알킬- 또는 알케닐석신산, 가용성 실리케이트 또는 층상 실리케이트(예를 들어, 핵스트(Hoechst)로부터의 SKS-6)와 같은 1 내지 65%의 세제 증강제 또는 착화제(complexing agent)를 포함할 수 있다. 세제는 또한 증강되지 않을 수 있는데, 즉, 세제 증강제가 본질적으로 없을 수 있다.

[0168] 세제 증강제는 인-함유 유형 및 인-비함유 유형으로 세분화될 수 있다. 인-함유 무기 알칼리 세제 증강제의 예는 수용성 염, 특히 알칼리 금속 피로인산염, 오르토인산염, 폴리인산염 및 포스포산염을 포함한다. 인-비함유 유기 증강제의 예는 수용성 알칼리 금속 카르보네이트, 보레이트 및 실리케이트뿐만 아니라 층상 다이실리케이트 및 다양한 유형의 수불용성 결정질 또는 비결정질 알루미늄 실리케이트를 포함하고, 이들 중 제올라이트가 가장 잘 알려진 대표적인 예이다. 적합한 유기 증강제의 예는 석시네이트, 말로네이트, 지방산 말로네이트, 지방산 설포네이트, 카르복시메톡시 석시네이트, 폴리아세테이트, 카르복실레이트, 폴리카르복실레이트, 아미노폴리카르복실레이트 및 폴리아세틸 폴리카르복실레이트의 알칼리 금속, 암모늄 또는 치환된 암모늄 염을 포함한다.

[0169] 세제 조성물 내에 포함하기에 적합한 킬레이트제는 에틸렌다이아민-N,N'-다이석신산(EDDS) 또는 이의 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄, 또는 치환된 암모늄 염, 또는 이들의 혼합물이다. 바람직한 EDDS 화합물은 유리산(free acid) 형태 및 이의 나트륨 또는 마그네슘 염이다. 그러한 EDDS의 바람직한 나트륨 염의 예는 Na2EDDS 및 Na4EDDS를 포함한다. 그러한 EDDS의 바람직한 마그네슘 염의 예는 MgEDDS 및 Mg2EDDS를 포함한다. 마그네슘 염이 조성물 내에 포함하기에 가장 바람직하다.

[0170] 세제는 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있다. 예는 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 폴리(비닐피롤리돈)(PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리카르복실레이트, 예를 들어, 폴리아크릴레이트, 말레산/아크릴산 공중합체 및 라우릴 메타크릴레이트/아크릴산 공중합체이다.

[0171] 세제 조성물은 염소계/브롬계 또는 산소계 표백제를 포함할 수 있다. 표백제는 코팅되거나 캡슐화될 수 있다. 무기 염소계/브롬계 표백제의 예는 차아염소산 또는 차아브롬산 리튬, 나트륨 또는 칼슘, 및 염소화 인산삼나트륨이다. 표백 시스템은 또한 테트라아세틸-에틸렌다이아민(TAED) 또는 노나노일옥시벤젠설포네이트(NOBS)와 같은 과산-형성 표백 활성화제와 조합될 수 있는 과붕산염 또는 과탄산염과 같은 과산화수소 공급원을 포함할 수 있다. 유기 염소/브롬계 표백제의 예는 트라이클로로아이스시아누르산, 트라이브로모아이스시아누르산 및 다이클로로아이스시아누르산과 같은 헤테로사이클릭 N-브로모 및 N-클로로 이미드, 및 칼륨 및 나트륨과 같은 수용성 양이온을 갖는 이들의 염이다. 하이단톤인 화합물이 또한 적합하다. 표백 시스템은 또한, 예를 들어, 아미드, 이미드 또는 설포네이트의 퍼옥시산을 포함할 수 있다.

[0172] 식기세척 세제에서, 산소 표백제는, 예를 들어, 바람직하게는 표백 전구체와 함께 무기 과산염(persalt)의 형태로, 또는 퍼옥시산 화합물로서 바람직하다. 적합한 퍼옥시 표백 화합물의 전형적인 예는 사산화물 및 일산화물 둘 모두의 알칼리 금속 과붕산염, 알칼리 금속 과탄산염, 과규산염 및 과인산염이다. 바람직한 활성화제 물질은 테트라아세틸에틸렌다이아민(TAED), 노나노일옥시벤젠설포네이트(NOBS), 3,5-트라이메틸-헥사놀옥시벤젠설포

네이트(ISONOBS) 또는 펜타아세틸글루코스(PAG)이다.

[0173] 본 발명의 리과제, 또는 선택적으로 세제 조성물에 포함된 다른 효소는 통상 조성물의 0.00001 중량% 내지 3 중량%의 효소 단백질 수준, 바람직하게는 조성물의 0.0001 중량% 내지 1 중량%의 효소 단백질 수준, 더욱 바람직하게는, 조성물의 0.001 중량% 내지 0.5 중량%의 효소 단백질 수준, 심지어 더욱 바람직하게는 조성물의 0.01 중량% 내지 0.2 중량%의 효소 단백질 수준으로 세제 조성물에 포함된다. 리과제 단백질의 양은 세제 그램당 0.001 내지 30 mg 또는 세척액의 리터당 0.001 내지 100 mg일 수 있다. 본 발명의 리과제 변이체는 70 내지 100 중량%의 음이온성 계면활성제 및 0 내지 30 중량%의 비이온성 계면활성제, 특히 80 내지 100 중량%의 음이온성 계면활성제, 및 0 내지 20 중량%의 비이온성 계면활성제를 갖는 음이온성 및 비이온성 계면활성제의 조합을 포함하는 세제에 특히 적합하다. 추가로 기재되는 바와 같이, 본 발명의 일부 바람직한 리과제는 또한 40 내지 70%의 음이온성 계면활성제 및 30 내지 60%의 비이온성 계면활성제를 포함하는 세제에 적합하다. 본 발명의 리과제에 더하여, 세제 조성물은 세정 성능 및/또는 패브릭 케어의 이점을 제공하는 다른 효소, 예를 들어, 프로테아제, 추가의 리과제, 큐티나제, 아밀라제, 셀룰라제, 퍼옥시다제, 옥시다제(예를 들어, 락카제), 만나나제, 옥시도리덕타제, 및/또는 펙테이트 리아제를 포함할 수 있다.

[0174] 세제 조성물의 효소는 종래의 안정화제(예를 들어, 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤과 같은 폴리올, 당 또는 당 알코올, 젖산, 붕산, 또는 방향족 보레이트 에스테르와 같은 붕산 유도체)를 사용하여 안정화될 수 있다. 효소 안정제로서 보론산 또는 보린산 유도체는 붕산, 티오펜-3-보론산, 티오펜-2-보론산, 4-메틸티오펜-2-보론산, 5-에틸티오펜-2-보론산, 5-메틸티오펜-2-보론산, 5-브로모티오펜-2-보론산, 5-클로로티오펜-2-보론산, 다이벤조티오펜-1-보론산, 다이벤조푸란-1-보론산, 다이벤조푸란-4-보론산, 피콜린-2-보론산, 다이페닐보린산(에탄올아민 착물), 5-메톡시티오펜-2-보론산, 티오나프트렌-1-보론산, 푸란-2-보론산, 푸란-3-보론산, 2,5-다이메틸-티오펜-3-보론산, 벤조푸란-1-보론산, 3-메톡시티오펜-2-보론산, 5-n-프로필-티오펜-2-보론산, 5-메톡시푸란-2-보론산, 3-브로모티오펜-2-보론산, 5-에틸푸란-2-보론산, 4-카르바졸 에틸 보론산을 포함한다.

[0175] 선택적 성분은 거품 억제제이다(이는, 예를 들어, 실리콘-알킬화 폴리실록산 물질, 및 실리카-실리콘 혼합물로 예시되고, 여기서 실리카는 실리카 에어로겔 및 크세로겔 및 다양한 유형의 소수성 실리카의 형태이다). 거품 억제제는 미립자로서 포함될 수 있고, 여기서, 거품 억제제는 유리하게는 수용성 또는 수분산성이고 실질적으로 표면-비활성 세제 불투과성 담체 내에 방출가능하게 포함된다. 대안적으로, 거품 억제제는 액체 담체 내에 용해되거나 분산될 수 있고, 다른 성분들 중 하나 이상의 성분 상에 분무되어 적용될 수 있다.

[0176] 세제는 또한 무기 또는 유기 유연제를 포함할 수 있다. 무기 유연제는 스�멕타이트 점토(5% 내지 15%)에 의해 예시된다. 유기 패브릭 유연제(0.5% 내지 5%)는 수불용성 3차 아민, 및 이와 모노 C₁₂-C₁₄ 4차 암모늄 염 및 다이-장쇄 아마이드(di-long-chain amide) 또는 고분자량의 폴리에틸렌 옥사이드 물질의 조합을 포함한다.

[0177] 세제는 또한 종래의 다른 세제 성분, 예를 들어, 점토를 포함하는 패브릭 컨디셔너, 해고제 물질, 폼 부스터(foam booster)/폼 억제제(foam depressor)(식기세척 세제에서의 폼 억제제), 부식방지제, 오염물-현탁제 또는 분산제(0 내지 10%), 오염물-재침착방지제(anti-soil-redeposition agent), 염료, 탈수제, 살세균제, 광학 증백제, 연마제, 변색 억제제, 발색제, 및/또는 캡슐화된 또는 캡슐화되지 않은 향료를 포함할 수 있다.

액체 세제 제형	
비이온성 (네오돌(Neodol) 25-7) AE	25%
음이온성 (비스타(Vista) C-S50) LAS	5%
트라이에탄올아민	5%
에탄올	10%
안정제	0.5, 2.5, 5%
프로테아제	1%
아밀라제	0.3%
물	최대 100%
pH = 9.0로 조절	
아밀라제 후 리과제 삽입	0.001- 1%

[0178]

성분	세제 제형					
	I (%) 분말	II (%) 분말	III (%) 분말	IV (%) 분말	V (%) 액체	VI (%) 액체
선형 알킬벤젠설포네이트(산으로 계산됨) 또는 알킬 설페이트, 알파 올레핀 설포네이트, 알파-설포 지방산 메틸 에스테르, 알칸설포네이트, 비누	7-12	6-11	5-9	8-12	15-21	15-21
알코올 에톡시설페이트 (예를 들어, C ₁₂₋₁₈ 알코올 1-2 EO) 또는 알킬 설페이트 (예를 들어, C ₁₆₋₁₈)	1-4	1-3	--			
지방산으로서의 비누 (예를 들어, C ₁₆₋₂₂ 또는 올레산)	--	--	1-3		3-13	3-10
알코올 에톡시레이트 (예를 들어, C ₁₄₋₁₅ 또는 C ₁₂₋₁₅ 7EO 또는 5EO)	5-9	5-9	7-14	10-25	12-18	3-9
알케닐석신산 (C ₁₂₋₁₄)					0-13	
아미노에탄올					8-18	
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	14-20	15-21	10-17	14-22		
가용성 실리케이트 (Na ₂ O, 2SiO ₂ 로서)	2-6	1-4	3-9	1-5		
제올라이트 (NaAlSi ₃ O ₈ 로서)	15-22	24-34	23-33	25-35		14-22
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄ 로서)	0-6	4-10	0-4	0-10		
소듐 시트레이트/시트르산 (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇) 또는 칼륨 시트레이트	0-15	0-15	--		2-8	9-18
과붕산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O로서) 또는 붕산염 (B ₄ O ₇ 로서)	11-18	--	8-16		0-2	0-2
TAED	2-6	--	2-8			
포스포네이트 (예를 들어, EDTMPA)	--	--	0-1		0-3	
에탄올					0-3	
카르복시메틸셀룰로오스	0-2	0-2	0-2	0-2		0-2
중합체 (PEG, PVP)					0-3	0-3
고정 중합체(anchoring polymer) (예를 들어, 말레인산/아크릴산 공중합체 PVP, PEG)	0-3	1-6	1-3	1-3		0-3
프로필렌 글리콜					8-14	
글리세롤						0-5
효소 (알칼리 리파제)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5
부성분 (예를 들어, 거품 억제제, 향료, 광학 증백제, 광포백제)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5

[0179]

세제 제형						
성분	VII (%) 분말	VIII (%) 분말	IX (%) 분말	X (%) 액체	XI (%) 액체	XII (%) 분말
선형 알킬벤젠설포네이트(산으로 계산됨) 또는 알킬 설페이트, 알파-올레핀 설포네이트, 알파-설포 지방산 메틸 에스테르, 알칸설포네이트, 비누		8-14	6-12	15-23	20-32	25-40
지방 알코올 설페이트	5-10					
에톡실화 지방산 모노에탄올아미드	3-9	5-11				
알코올 에톡실레이트 (예를 들어, C ₁₂₋₁₈ 알코올 1-2 EO, 또는 C ₁₂₋₁₅ 2-3 EO) 또는 알킬 설페이트 (예를 들어, C ₁₆₋₁₈)				8-15		
지방산으로서의 비누 (예를 들어, C ₁₆₋₂₂ 또는 올레산 또는 라우르산)	0-3	0-3	2-6	0-3		
알코올 에톡실레이트 (예를 들어, C ₁₄₋₁₅ 또는 C ₁₂₋₁₅ 7EO 또는 5EO)			1-4	3-9	6-12	1-10
알케닐석신산 (C ₁₂₋₁₄)						
아미노에탄올				1-5	2-6	
탄산나트륨 (Na ₂ CO ₃)	5-10	4-10	14-22			8-25
가용성 실리카이트 (Na ₂ O, 2SiO ₂ 로서)	1-4	1-4				5-15
제올라이트 (NaAlSi ₃ O ₈ 로서)	20-40	30-50	18-32			15-28
황산나트륨 (Na ₂ SO ₄ 로서)	2-8	3-11	5-20			0-5
소듐 시트레이트/시트르산 (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇) 또는 칼륨 시트레이트		5-12	3-8	5-10	8-14	
향수성 물질 (예를 들어, 소듐 블투엔설포네이트)				2-6		
과탄산나트륨 (NaBO ₃ ·H ₂ O, 또는 NaBO ₃ ·4H ₂ O로서) 또는 붕산염 (B ₄ O ₇ 로서)	12-18		4-9	0-2	1-3	0-20
TAED (또는 NOBS)	2-7		1-5			0-5
포스포네이트 (예를 들어, EDTMPA)						
에탄올				1-3		
카르복시메틸셀룰로오스			0-2	0-1		
중합체 (PEG, PVP)						
고정 중합체 (예를 들어, 말레산/아크릴산 공중합체 PVP, PEG)	1-5	1-5	1-5		0-3	
프로필렌 글리콜				2-5		
글리세롤					3-8	
효소 (알칼리 리파제)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5
부성분 (예를 들어, 기포 억제제, 향료, 광학 증백제, 광표백제)	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-3

[0180]

음이온성 모델 세제 A

[0181]

모델 과립 세제(총 계면활성제 중 90% 음이온성, 용액 중 pH 10.2)는 하기 성분들(중량%)을 혼합하여 제조된다:

[0182]

8.7% 음이온성 계면활성제: LAS (C₁₀-C₁₃)

[0183]

7.4% 음이온성 계면활성제: AS (C₁₂)

[0184]

1.8% 비이온성 계면활성제: 알코올 에톡실레이트 (C₁₂-C₁₅ 7EO)

[0185]

30% 제올라이트 P (웨살라이트(Wessalite) P)

[0186]

18% 탄산나트륨

[0187]

5% 소듐 시트레이트

[0188]

17% 황산나트륨

[0189]

0.3% 카르복시-메틸-셀룰로오스

[0190]

6.5% 과탄산나트륨 일수화물

[0191]

2.1% NOBS

[0192]

음이온성 모델 세제 B

[0193]

두 번째 모델 과립 세제(총 계면활성제 중 79% 음이온성, 용액 중 pH 10.2)는 하기 성분들(중량%)을 혼합하여

[0194]

제조된다:

- [0195] 27% 음이온성 계면활성제: AS (C₁₂)
- [0196] 7% 비이온성 계면활성제 (C₁₂₋₁₅, 7EO)
- [0197] 60% 제올라이트 P (웨살라이트 P)
- [0198] 5% 탄산나트륨
- [0199] 0.6% 소칼란(Sokalan) CP5
- [0200] 1.5% 카르복시-메틸-셀룰로오스
- [0201] 음이온성/비이온성 모델 세제
- [0202] 모델 세제 용액(총 계면활성제 중 32% 음이온성, pH 10.2)은 하기 성분들을 순수(pure water) 중 3.2 mM Ca²⁺/Mg²⁺(5:1)에 첨가하여 제조된다:
- [0203] 0.300 g/l의 알킬 설페이트 (AS; C₁₄₋₁₆);
- [0204] 0.650 g/l의 알코올 에톡실레이트 (AEO; C₁₂₋₁₄, 6EO);
- [0205] 1.750 g/l의 제올라이트 P
- [0206] 0.145 g/l의 Na₂CO₃
- [0207] 0.020 g/l의 소칼란 CP5
- [0208] 0.050 g/l의 CMC(카르복시-메틸 셀룰로오스)
- [0209] **저 세제 조성물**
- [0210] 유럽 세탁 분말 세제
- [0211] 6%가 LAS이고 3%가 AES이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 47%의 증강제를 추가로 함유하였다.
- [0212] 3%가 AES이고 6%가 LAS이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 47%의 증강제를 추가로 포함하였고, 이는 5% 폴리카르복실레이트 중합체를 포함하였다.
- [0213] 3%가 AES이고 6%가 LAS이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 47%의 증강제를 추가로 포함하였고, 이는 5% 폴리카르복실레이트 중합체를 함유하였다.
- [0214] 6%가 LAS이고 3%가 AES이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트, 및 실리케이트로 이루어진 47%의 증강제, 5%의 폴리카르복실레이트 분산 중합체, 15%의 과붕산나트륨, 및 4%의 테트라아세틸-에틸렌-다이아민(TAEO)을 추가로 함유하였다.
- [0215] 6%가 LAS이고 3%가 AES이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 22%의 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트로 이루어진 47%의 증강제, 및 5%의 폴리카르복실레이트 분산 중합체를 추가로 함유하였다.
- [0216] 6%가 LAS이고 3%가 AES이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 22%의 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트로 이루어진 47%의 증강제, 및 5%의 폴리카르복실레이트 분산 중합체를 추가로 함유하였다.
- [0217] 6%가 LAS이고 3%가 AES이고 6%가 비이온성 계면활성제인 15%의 계면활성제. 이는 지방산, 22%의 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트로 이루어진 47%의 증강제, 및 5%의 폴리카르복실레이트 분산 중합체를 추가로 함유하였다.
- [0218] 8.1%가 LAS이고 6.5%가 AS이고 4.0%가 비이온성 계면활성제이고 2.5%가 양이온성 계면활성제(DSDMAC)인 21%의

계면활성제. 이는 지방산, 카르보네이트, 제올라이트 A, 실리케이트, 및 시트레이트로 이루어진 64%의 증강제를 추가로 함유하였고, 또한 2.7%의 분산 중합체를 포함하였다.

[0219] 11%가 LAS이고 5.9%가 비이온성 계면활성제이고 4.1%가 비누인, 비누를 포함하는 16.9%의 계면활성제, 및 63%의 증강제.

[0220] 유럽 액체 세탁 세제

[0221] 16.9%가 AS이고 6.7%가 비이온성 계면활성제이고 3.5%가 양이온성 계면활성제(DSDMAC)인 27%의 계면활성제. 이는 지방산, 카르보네이트, 시트레이트, 및 붕산으로 이루어진 18.7%의 증강제를 추가로 함유하였다.

[0222] 북미 세탁 액체 세제

[0223] 16%가 AES이고 5%가 LAS이고 2%가 비이온성 계면활성제인 23%의 계면활성제. 이는 비누, 시트르산, DTPA 및 칼슘 포르메이트를 포함하는 6%의 증강제를 추가로 함유하였다.

[0224] 세제 조성물에서 계면활성제의 수준을 정상 수준의 50%로 감소시키고, 이를 0.1%의 리파제 단백질로 치환하여 더 나은 성능을 얻었다.

[0225] 16%가 AES이고 5%가 LAS이고 2%가 비이온성 계면활성제인 23%의 계면활성제. 이는 비누, 시트르산, DTPA 및 칼슘 포르메이트로 이루어진 6%의 증강제, 및 5%의 폴리-카르복실레이트 분산 중합체를 추가로 함유하였다.

[0226] 북미 세탁 분말 세제

[0227] 7.8%가 LAS이고 6.7%가 AS이고 1.8%가 비이온성 계면활성제인 16.3%의 계면활성제, 및 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 60%의 증강제.

[0228] 11.5%가 LAS이고 3.4%가 비이온성 계면활성제인 14.9%의 계면활성제, 및 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 55%의 증강제.

[0229] 4.5%가 LAS이고 13%가 AS이고 2%가 비이온성 계면활성제인 19.5%의 계면활성제, 및 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 61%의 증강제.

[0230] 일본 세탁 분말 세제

[0231] 11.1%가 LAS이고 11.6%가 에스테르 설포네이트이고 1.6%가 비이온성 계면활성제인 24.3%의 계면활성제, 및 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트 및 실리케이트를 포함하는 60%의 증강제.

[0232] 15 27.5%가 LAS이고 0.4%가 비이온성 계면활성제인 27.9%의 계면활성제, 및 제올라이트 A, 카르보네이트, 시트레이트, 포스페이트 및 실리케이트를 포함하는 64%의 증강제.

[0233] 유럽 컬러 콤팩트 세탁 분말

[0234] 8.1%가 LAS이고 6.5%가 AS이고 2.5%가 아르퀴트(Arguat) 2T -70이고 4%가 비이온성 계면활성제인 21.1%의 계면활성제 시스템, 및 지방산, 제올라이트 A, 카르보네이트, 시트르산 및 실리케이트를 포함하는 64%의 증강제. 계면활성제 시스템은 증강제와는 별도로 제조하였다. 계면활성제 시스템은 비이온성 계면활성제로서 네오돌 25-7 또는 루텐솔(Lutensol) ON60을 사용하여 제조하였다.

세제 조성물				
성분	실시에 1	실시에 2	실시에 3	실시에 4
재료	수준 (있는 그대로의 부 (part))	수준 (있는 그대로의 부)	수준 (있는 그대로의 부)	수준 (있는 그대로의 부)
글리세롤	3.17	3.17	3.17	3.17
MPG	5.7	5.7	5.7	5.7
NaOH	2.13	2.13	2.13	2.13
TEA	2.05	2.05	2.05	2.05
네오들 25-7	12.74	12.74	12.74	12.74
F-염료	0.18	0.18	0.18	0.18
시트르산	1.71	1.71	1.71	1.71
LAS (LAS 산으로서)	8.49	8.49	8.49	8.49
지방산	3.03	3.03	3.03	3.03
엠펜젠(Empigen) BB	1.5	1.5	1.5	1.5
SLES	4.24	4.24	4.24	4.24
디퀘스트(Dequest) 2066	0.875	0.875	0.875	0.875
페이턴트 블루(Patent Blue)	0.00036	0.00036	0.00036	0.00036
에씨드 옐로우(Acid Yellow)	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005
유타제	0.0512	0.0512	0.0512	0.0512
향료	0.734	0.734	0.734	0.734
붕사(Borax)	10	10	10	10
사비나제(Savinase)	2.362	2.362	2.362	2.362
스테인자임(Stainzyme)	0.945	0.945	0.945	0.945
비누	3.03	3.03	3.03	3.03
(니폰 쇼쿠바이(Nippon Shokubai)로부터의) EPEI 20E0: 중량 평균 분자량이 약 600 이고, 평균 20 개의 에틸렌 옥사이드 부분과의 알콕실화에 의해 변형된 폴리에틸렌이민	5.5	5.5	5.5	9
리파제	3	3	3	3
(클라리언트(Clariant)로부터의) 텍스케어(Texcare) SRN170 방오 중합체	0	7.5	0	0
(바스프(BASF)로부터의) 소콜란(Sokolan) CP5 방오 중합체	0	0	20	0

[0235]

효소적 세제 및 표백 조성물	
성분	중량%
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	6.5
11 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C14-C15 1 차 알코올	2
소듐 스테아레이트	1
규산나트륨	7
소듐 카르복시메틸 셀룰로오스	0.5
Na ₂ SO ₄	37
삼인산오나트륨	15
오르토인산삼나트륨	5
형광제	0.2
에틸렌 다이아민 테트라아세트산	0.5
물	6.2
염료	0.01
리파제	0.001-1
표백 시스템	과붕산나트륨 + SNOBS, 과붕산나트륨 + TAED, DPDA, MPS; 모두 용액 중에서 1.5 mmol 의 과산을 생성함

[0236]

효소적 세제 및 표백 조성물	
성분	중량%
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	8.5
11 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C14-C15 1 차 알코올	4
경화된 평지씨유 나트륨 비누	1.5
삼인산나트륨	33
탄산나트륨	5
규산나트륨	6
황산나트륨	20
물	9
형광제, 오염물-현탁제, 염료, 향료	소량
폼 방지 과립	1.2
디퀘스트(Dequest) R 2047 (34% 순도)	0.3
리파제	0.001-1

[0237]

세제 조성물		
성분	중량%	중량%
소듐 알킬벤젠설포네이트	24	28
트라이폴리인산오나트륨	15	2.1
알칼리성 규산나트륨 나트륨	10	12
카르복시메틸셀룰로오스 소듐	0.6	0.6
설페이트	32.5	15.4
형광제	0.4	0.4
탄산나트륨	10	35
기타 + 물	100%까지	100%까지
리파제	0.001-1	0.001-1

[0238]

효소적 세제 조성물	
성분	중량%
소듐 선형 도데실벤젠설포네이트	13.35
소듐 C ₁₂ -C ₁₃ 알코올 (6.5 E0) 설페이트	6.67
탄산나트륨	54.2
트라이폴리인산나트륨	9.01
규산나트륨	4.6
수산화나트륨	1.66
소듐 카르복시메틸셀룰로오스	0.5
디퀘스트 2006	1.9
향료, 염료, 물	적당량
리파제	0.001-1
프로테아제 (알칼라제(Alcalase))	20 GU/mL

[0239]

액체 세탁 세제 제형	
성분	중량부
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	8.5
7 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C12-C15 1 차 알코올	4
경화된 평지씨유 나트륨 비누	1.5
삼인산나트륨	33
탄산나트륨	5
규산나트륨	6
황산나트륨	20
물	9
형광제, 오염물-현탁제, 염료, 향료	소량
과불산나트륨	12
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED) (과립)	2
단백질 가수분해 효소 (노보(NOVO)로부터의 사비나제)	0.4
리파제	0.001-1
프로테아제 (알칼라제)	20 GU/mL

[0240]

액체 세제 조성물				
	A	B	C	D
소듐 도데실벤젠 설포네이트	9	9	9	9
7 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C13-C15 선형 1 차 알코올 (예를 들어, 신페로닉(Synperonic) A7)	1	4	4	1
3 몰의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C13-C15 선형 1 차 알코올 (예를 들어, 신페로닉 A3)	3	0	0	3
트라이폴리인산나트륨	23	23	0	0
제올라이트 유형 4A	0	0	24	24
아크릴산과 말레산 무수물의 공중합체	0	0	4	4
소듐 폴리아크릴레이트	2	2	0	0
알칼리성 실리케이트	5	5		
형광제	0.25	0.25	0.16	0.16
EDTA	0.15	0.15	0.18	0.18
SCMC	0.5	0.5	0.55	0.55
염	2	2	0	0
황산나트륨	26.8	26.8	22.31	22.31
탄산나트륨	0	0	10.3	10.3
수분	10	10	11	11
TAED	3	3	3.3	3.3
과불산나트륨 일수화물	10	10	8	8
칼슘 디케스트® 2047	0.7	0.7	0.3	0.3
폼 억제제	3	3	2.5	2.5
향료	0.2	0.2	0	0
알칼리성 프로테아제 (사비나제 (A) 6T)	0.4	0.4	0.4	0.4
리파제	0.001-1			

[0241]

식기세척 조성물	
성분	중량%
트라이폴리인산나트륨	24
소다회	20
이규산나트륨	11
6 몰의 에틸렌 옥사이드 및 24 몰의 프로필렌 옥사이드와 축합된, 선형 C10 알코올	2.5
황산나트륨	44
물	100 까지
리파제	0.001-1

[0242]

[0243]

본 발명의 세정 조성물은, 예를 들어, 세탁 응용, 경질 표면 세정, 식기세척 응용, 및 의치, 치아, 모발 및 피부와 같은 미용 응용에 유리하게 이용된다. 추가로, 저온 용액에서의 증가된 효과라는 독특한 이점으로 인해, 본 발명의 효소는 세탁 응용에 이상적으로 적합하다. 나아가, 본 발명의 효소는 과립 및 액체 조성물에 사용된다.

[0244]

본 발명의 변이 지방분해 효소는 또한 세정 첨가제 제품에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 저온 용액 세정 응용이 사용된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 효소를 적어도 하나 포함하는 세정 첨가제 제품을 제공하고, 이는 추가적인 표백 효과가 요구되는 경우 세척 프로세스에 포함시키기에 이상적으로 적합하다. 그러한 예는 저온 용액 세정 응용을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 첨가제 제품은 그의 가장 단순한 형태의 하나 이상의 지방분해 효소이다. 일부 실시 형태에서, 첨가제는 세정 프로세스에 대한 첨가를 위한 투여 형태로 포장된다. 일부 실시 형태에서, 첨가제는 과산화의 공급원이 이용되고 증가된 표백 효과가 요구되는 세정 프로세스에 대한 첨가를 위한 투여 형태로 포장된다. 환, 정제, 젤캡 또는 미리 측정된 분말 또는 액체와 같은 기타 단일 투여 단위를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 임의의 적합한 단일 투여 단위 형태가 본 발명과 함께 사용된다. 일부 실시 형태에서, 그러한 조성물의 부피를 증가시키기 위해 충전제(들) 또는 담체 물질(들)이 포함된다. 적합한 충전제 또는 담체 물질은 다양한 황산염, 탄산염 및 규산염뿐만 아니라 탈크, 점토 등을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 적합한 액체 조성물용 충전제 또는 담체 물질은 물 또는 폴리올 및 다이올을 포함하는 저분자량의 1차 및 2차 알코올을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 그러한 알코올의 예는 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 아이소프로판올을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 그러한 물질을 약 5% 내지 약 90%로 함유한다. pH를 감소시키기 위해 산성 충전제를 사용할 수 있다. 대안적으로, 일부 실시 형태에서, 세정 첨가제는 아래에서 더욱 충분히 설명되는 부가

성분들을 포함한다.

- [0245] 본 발명의 세정 조성물 및 세정 첨가제는 본 명세서에서 제공된 지방분해 효소 변이체들 중 적어도 하나의 유효량을, 단독 또는 다른 지방분해 효소 및/또는 추가 효소와 조합하여, 필요로 한다. 요구되는 효소의 수준은 본 발명의 지방분해 효소 변이체의 하나 이상의 첨가에 의해 달성된다. 전형적으로, 본 발명의 세정 조성물은 본 발명의 변이 지방분해 효소들 중 적어도 하나를 약 0.0001 중량% 이상, 약 0.0001 내지 약 10, 약 0.001 내지 약 1, 또는 심지어 약 0.01 내지 약 0.1 중량%로 포함한다.
- [0246] 본 명세서에서 세정 조성물은 전형적으로 수성 세정 작업에서의 사용 동안, 세척수가 약 5.0 내지 약 11.5, 또는 약 6.0 내지 8.0 또는 심지어 약 7.5 내지 약 10.5의 pH를 가지도록 제형화된다. 액체 제품 제형들은 전형적으로 순 pH가 약 3.0 내지 약 9.0 또는 심지어 약 3 내지 약 8이 되도록 제형화된다. 과립 세탁 제품은 전형적으로 약 6 내지 약 11, 또는 심지어 약 8 내지 약 10의 pH를 갖도록 제형화된다. 추천되는 사용 수준에서의 pH 조절 기술은 완충액, 알칼리, 산 등의 사용을 포함하고, 당업자들에게 공지되어 있다.
- [0247] 적합한 "낮은 pH 세정 조성물"은 전형적으로 순 pH가 약 3 내지 약 8이고, 전형적으로 이러한 pH 환경에서 가수분해되는 계면활성제를 전형적으로 포함하고 있지 않다. 그러한 계면활성제는 적어도 하나의 에틸렌 옥사이드 부분 또는 심지어 약 1 내지 약 16 몰의 에틸렌 옥사이드를 포함하는 소듐 알킬 설페이트 계면활성제를 포함한다. 그러한 세정 조성물은 전형적으로 수산화나트륨, 모노에탄올아민 또는 염산과 같은 pH 조절제의 충분한 양을 포함하여, 순 pH가 약 3 내지 약 8인 그러한 세정 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 전형적으로 적어도 하나의 산 안정성 효소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 액체인 반면, 다른 실시 형태에서는 고체이다. 그러한 액체 조성물의 pH는 전형적으로 순 pH로서 측정된다. 그러한 고체 조성물의 pH는 상기 조성물의 10% 고체 용액으로서 측정되는데, 이때 용매는 증류수이다. 달리 표시되지 않는다면, 이러한 실시 형태들에서, 모든 pH 측정은 20°C에서 행해진다.
- [0248] 일부 실시 형태에서, 변이 지방분해 효소(들)가 과립 조성물 또는 액체 중에서 이용될 때, 저장 동안 과립 조성물의 다른 성분으로부터 변이 지방분해 효소를 보호하기 위해 변이 지방분해 효소가 캡슐화된 입자의 형태인 것이 바람직할 수 있다. 추가적으로, 캡슐화는 또한 세정 프로세스 동안 변이 지방분해 효소의 이용가능성을 제어하는 수단이다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화는 변이 지방분해 효소(들) 및/또는 추가 효소의 성능을 향상시킨다. 이러한 점에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소는 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 캡슐화 재료로 캡슐화된다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 전형적으로 본 발명의 변이 지방분해 효소(들)에 대한 촉매의 적어도 일부를 캡슐화한다. 전형적으로, 캡슐화 재료는 수용성 및/또는 수분산성이다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 0°C 이상의 유리 전이 온도(Tg)를 갖는다. 유리 전이 온도는 WO 97/11151호에 보다 상세히 기재되어 있다. 캡슐화 재료는 전형적으로 탄수화물, 천연 또는 합성 검(gum), 키틴, 키토산, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체, 실리카이트, 포스페이트, 보레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 파라핀 왁스, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 캡슐화 재료가 탄수화물인 경우, 이는 전형적으로 단당류, 올리고당류, 다당류, 및 이들의 조합으로 부터 선택된다. 일부 전형적인 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 전분이다 (예를 들어, EP 0 922 499호; 미국 특허 제4,977,252호; 미국 특허 제5,354,559호, 및 미국 특허 제5,935,826호 참조). 일부 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 열가소성 물질, 아크릴로니트릴, 메타크릴로니트릴, 폴리아크릴로니트릴, 폴리메타크릴로니트릴 및 이들의 혼합물과 같은 플라스틱으로 제조된 미세구체(microsphere)이고; 사용되는 구매가능한 미세구체는 익스판셀(EXPANCEL)®(스웨덴 소재의 스톡빅스베르켄(Stockviksverken)), 및 PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, 익스텐도스피어스(EXTENDOSPHERES)®, 럭스실(LUXSIL)®, 큐-셀(Q-CEL)®, 및 스페리셀(SPHERICEL)®(미국 펜실베이니아주 밸리 포지 소재의 피큐 코퍼레이션(PQ Corp.))로 공급되는 것들을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.
- [0249] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 변이 지방분해 효소는 세탁 세제 및 식기 세제를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 세정 산업에 특히 사용된다. 이들 응용은 효소를 다양한 환경적 스트레스 하에 둔다. 본 발명의 변이 지방분해 효소는 다양한 조건 하에서의 안정성 때문에, 현재 사용되는 많은 효소들에 비해 이점을 제공한다.
- [0250] 실제로, 다양한 세제 제형, 세척수 부피, 세척수 온도, 및 세척 시간을 포함하여, 세척에 관련된 지방분해 효소가 노출되는 다양한 세척 조건들이 있다. 또한, 상이한 지리학적 지역에서 사용되는 세제 제형은 세척수에 존재하는 그의 관련 성분의 농도가 상이하다. 예를 들어, 유럽의 세제는 세척수 중에 전형적으로 약 2000 내지 10000 ppm의 세제 성분을 가지는 반면, 아시아의 세제는 세척수 중에 전형적으로 대략 300 내지 2500 ppm의 세제 성분을 갖는다. 북아메리카, 특히 미국에서, 세제들은 세척수 중에 전형적으로 약 300ppm 내지 1500ppm의

세제 성분이 존재한다.

[0251] 고 세제 농도 시스템은 세척수 중에 약 2000 ppm 초과와 세제 성분이 존재하는 세제를 포함한다. 유럽의 세제는 세척수 중에 대략 2000 내지 10000 ppm의 세제 성분을 가지므로, 일반적으로 고 세제 농도 시스템으로 고려된다.

[0252] 라틴 아메리카의 세제는 일반적으로 고 거품의 포스페이트 증강제 세제이고, 라틴 아메리카에서 사용되는 세제의 범위는, 세척수 중의 세제 성분이 1500 ppm 내지 6000 ppm 범위이므로, 중 및 고 세제 농도 둘 모두에 속할 수 있다. 상기에서 언급한 바와 같이, 브라질은 전형적으로 세척수 중에 대략 1500 ppm의 세제 성분이 존재한다. 그러나, 기타 고 거품의 포스페이트 증강제 세제 지역들은, 다른 라틴 아메리카 국가들에 제한되지 않고, 세척수 중에 최대 약 6000 ppm의 세제 성분이 존재하는 고 세제 농도 시스템을 가질 수 있다.

[0253] 앞의 내용에 비추어, 전 세계적으로 전형적인 세척 용액 중의 세제 조성물의 농도는 약 300 ppm 미만의 세제 조성물("저 세제 농도 지역") 부터 유럽에서의 10000 ppm 및 고 거품의 포스페이트 증강제 지역에서의 약 6000 ppm까지로 다양하다는 것이 분명하다.

[0254] 전형적인 세척 용액의 농도는 경험적으로 결정된다. 예를 들어, 미국에서, 전형적인 세탁기는 약 64.4 L 부피의 세척 용액을 수용한다. 따라서, 세척 용액 내의 약 1000 ppm의 세제의 농도를 수득하기 위해서, 64.4 L의 세척 용액에 약 64.4 g의 세제 조성물을 첨가하여야 한다. 이러한 양은 소비자가 세제가 제공되는 계량컵을 이용하여 세척수 내로 계량하여 넣는 전형적인 양이다.

[0255] 추가적인 예로서, 상이한 지역들에서는 상이한 세척 온도가 사용된다. 일본에서 세척수의 온도는 전형적으로 유럽에서 사용되는 것보다 낮다. 예를 들어, 북아메리카 및 일본에서 세척수의 온도는 전형적으로 약 10 내지 약 30℃(예를 들어, 약 20℃)인 반면, 유럽에서 세척수의 온도는 전형적으로 약 30 내지 약 60℃(예를 들어, 약 40℃)이다. 그러나, 에너지를 절약하기 위하여, 많은 소비자들은 냉수 세척을 사용하는 것으로 바꾸고 있다. 또한, 일부 추가 지역에서, 냉수는 전형적으로 식기세척 응용뿐만 아니라 세탁을 위해서도 사용된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 "냉수 세척"은 약 10℃ 내지 약 40℃, 또는 약 20℃ 내지 약 30℃, 또는 약 15℃ 내지 약 25℃뿐만 아니라, 약 15℃ 내지 약 35℃의 범위 내의 모든 다른 조합, 및 10℃ 내지 40℃ 내의 모든 범위의 온도에서의 세척에 적합한 "냉수 세제"를 사용한다.

[0256] 추가적인 예로서, 상이한 지역에서는 전형적으로 물의 경도가 상이하다. 물의 경도는 보통 혼합된 Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 칼슘당 그레인(grain)으로 설명된다. 경도는 물 중의 칼슘(Ca^{2+}) 및 마그네슘(Mg^{2+})의 양의 측정치이다. 미국에서 대부분의 물은 경질이나, 경도의 정도는 다양하다. 중경수(Moderately hard water)(60 내지 120 ppm) 내지 경수(121 내지 181 ppm)는 60 내지 181 백만분율(part per million)(U.S. 칼슘당 그레인으로 환산된 백만분율은 17.1 동일값의 칼슘당 그레인으로 나눈 ppm #임)의 경질 광물을 갖는다.

물	칼슘당 그레인	백만분율
연수	1.0 미만	17 미만
약경수	1.0 내지 3.5	17 내지 60
중경수	3.5 내지 7.0	60 내지 120
경수	7.0 내지 10.5	120 내지 180
고경수	10.5 초과	180 초과

[0257]

[0258] 유럽의 물의 경도는 전형적으로 혼합된 Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 칼슘당 약 10.5 초과(예를 들어, 약 10.5 내지 약 20.0) 그레인(예를 들어, 혼합된 Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 칼슘당 약 15 그레인)이다. 북아메리카의 물의 경도는 전형적으로 일본의 물의 경도보다 높지만 유럽의 물의 경도보다는 낮다. 예를 들어, 북아메리카의 물의 경도는 약 3 내지 약 10 그레인, 약 3 내지 약 8 그레인 또는 약 6 그레인일 수 있다. 일본의 물의 경도는 전형적으로 북아메리카의 물의 경도보다 낮는데, 보통 혼합된 Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 칼슘당 약 4 미만, 예를 들어, 약 3 그레인이다.

[0259] 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명은 적어도 한 세트의 세척 조건(예를 들어, 수온, 물의 경도, 및/또는 세제 농도)에서 놀라운 세척 성능을 나타내는 변이 지방분해 효소를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소는 세척 성능에 있어서 다른 리파제 지방분해 효소에 필적한다. 일부 실시 형태에서, 본 발

명의 변이 지방분해 효소는 현재 구매가능한 리파제 지방분해 효소와 비교시 향상된 세척 성능을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 명세서에서 제공된 변이 지방분해 효소는 향상된 산화 안정성, 향상된 열안정성, 다양한 조건 하에서의 향상된 세척 능력, 및/또는 향상된 킬레이트제 안정성을 나타낸다. 또한, 본 발명의 변이 지방분해 효소는, 세제를 포함하지 않는 세정 조성물에, 게다가 단독으로 또는 증강제 및 안정제와 조합하여 사용된다.

[0260] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 조성물의 약 0.00001 중량% 내지 약 10 중량% 수준으로의 적어도 하나의 본 발명의 변이 지방분해 효소, 및 세정 부가 물질을 포함하는 잔부(예를 들어, 조성물의 약 99.999 중량% 내지 약 90.0 중량%)를 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 2 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량% 수준으로의 적어도 하나의 변이 지방분해 효소, 및 세정 부가 물질을 포함하는 세정 조성물의 잔부(예를 들어, 약 99.9999 중량% 내지 약 90.0 중량%, 약 99.999 중량% 내지 약 98 중량%, 약 99.995 중량% 내지 약 99.5 중량%)를 포함한다.

[0261] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 세정 성능 및/또는 패브릭 케어 및/또는 식기세척 이점들을 제공하는 하나 이상의 추가 세제 효소를 포함한다. 적합한 효소의 예는 헤미셀룰라제, 셀룰라제, 퍼옥시다제, 지방분해 효소, 자일라나제, 리파제, 포스포리파제, 에스테라제, 큐티나제, 펙티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 케라티나제, 리덕타제, 옥시다제, 페놀옥시다제, 리폭시게나제, 리그니나제, 폴루라나제, 탄나제, 펜토사나제, 말라나제, β-글루카나제, 아라비노시다제, 하이알루로니다제, 콘드로이티나제, 락카제, 및 아밀라제, 또는 이들의 조합 또는 혼합물을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 아밀라제와 함께 지방분해 효소, 리파제, 큐티나제 및/또는 셀룰라제와 같은 종래의 적용가능한 효소를 포함하여 효소들의 조합(즉, "카테일")이 사용된다.

[0262] 예를 들어, 본 발명의 지방분해 효소 변이체는 프로테아제와 조합될 수 있다. 적합한 단백질분해 효소는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 미생물 단백질분해 효소가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 단백질분해 효소는 바람직하게는 알칼리 미생물 단백질분해 효소 또는 트립신-유사 단백질분해 효소이다. 알칼리 지방분해 효소의 예는, 리파제, 특히 *바실러스*에서 유래한 것들(예를 들어, *렌투스*, *아밀로 리쿠에파시엔스*, 칼스버그(Carlsberg), 309, 147 및 168)을 포함한다. 부가적인 예는, 모두가 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 RE 34,606호, 제5,955,340호, 제5,700,676호, 제6,312,936호, 및 제6,482,628호에 기재된 돌연변이 단백질분해 효소를 포함한다. 추가 프로테아제의 예는 (예를 들어, 돼지 또는 소 기원의) 트립신, 및 WO 89/06270호에 기재된 푸사리움(*Fusarium*) 프로테아제 효소를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 구매가능한 프로테아제 효소는 맥사타제(MAXATASE)®, 맥사칼(MAXACAL)™, 맥사팜(MAXAPEM)™, 옵티클린(OPTICLEAN)®, 옵티마제(OPTIMASE)®, 프로퍼라제(PROPERASE)®, 퓨라펙트(PURAFECT)®, 퓨라펙트® OXP, 퓨라맥스(PURAMAX)™, 엑셀라제(EXCELLASE)™, 및 퓨라팩스트(PURAFAST)™(제넨코르(Genencor)); 알칼라제®, 사비나제®, 프리마제(PRIMASE)®, 듀라짐(DURAZYM)™, 폴라자임(POLARZYME)®, 오보자임(OVOZYME)®, 칸나제(KANNAZE)®, 리쿠아나제(LIQUANASE)®, 뉴트라제(NEUTRAZE)®, 릴라제(RELEASE)® 및 에스퍼라제(ESPERASE)®(노보자임스(Novozymes)); 비랩(BLAP)™ 및 비랩™ 변이체(독일 뒤셀도르프 소재의 헨켈 콤만디트게젤샤프트 아우프 악티엔(Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien)), 및 갑(KAP)(B. 알칼로필루스 리파제; 일본 도쿄 소재의 카오 코퍼레이션(Kao Corp.))을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 다양한 단백질분해 효소들이 WO 95/23221호, WO 92/21760호, 미국 특허 출원 공개 제 2008/0090747호, 및 미국 특허 제5,801,039호, 제5,340,735호, 제5,500,364호, 제5,855,625호, RE 34,606호, 제 5,955,340호, 제5,700,676호, 제6,312,936호, 및 제6,482,628호, 및 다양한 기타 특허에 기재되어있다. 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 메탈로프로테아제(metalloprotease) 효소는 WO 07/044993호에 기재된 중성 메탈로프로테아제 효소를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0263] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 임의의 적합한 아밀라제가 본 발명에서 사용된다. 일부 실시 형태에서, 알칼리성 용액에 사용되기에 적합한 임의의 아밀라제(예를 들어, 알파 및/또는 베타 아밀라제)가 또한 사용된다. 적합한 아밀라제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 본 발명에서 사용되는 아밀라제는 *B. 리체니포르미스*로부터 얻은 α-아밀라제(예를 들어, GB 1,296,839호 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 본 발명에서 사용가능한 구매가능한 아밀라제는 듀라밀(DURAMYL)®, 터마밀(TERMAMYL)®, 펀자밀(FUNGAMYL)®, 스테인자임®, 스테인자임 플러스(PLUS)®, 스테인자임 울트라(ULTRA)®, 및 밴(BAN)™(노보자임스)뿐만 아니라, 파워라제(POWERASE)™, 래피다제(RAPIDASE)® 및 맥사밀(MAXAMYL)® P(제넨코르)를

포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0264] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 약 0.00001 중량% 내지 약 10 중량%의 추가 아밀라제 수준으로의 아밀라제, 및 세정 부가 물질의 잔부(조성물의 중량 기준)를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 2 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량%의 아밀라제 수준으로의 아밀라제를 포함한다.

[0265] 일부 추가 실시 형태에서, 임의의 적합한 셀룰라제가 본 발명의 세정 조성물에 사용된다. 적합한 셀룰라제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이가 포함된다. 적합한 셀룰라제는 후미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) 셀룰라제(예를 들어, 미국 특허 제4,435,307호 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 특히 적합한 셀룰라제는 색상 케어 이점을 가진 셀룰라제이다(예를 들어, EP 0 495 257호 참조). 본 발명에서 사용되는 구배가 가능한 셀룰라제는 셀루자임(CELLUZYME)®, 케어자임(CAREZYME)®(노보자임스), 및 KAC-500(B)TM(카오 코포레이션) 퓨라다스(PURADAX) HA 1200E (다니스코(Danisco)), 퓨라다스 EG 7000L(다니스코)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 셀룰라제는 성숙한 야생형 또는 변이 셀룰라제의 일부 또는 절편으로 포함되는데, 이때 N-말단의 일부가 결실된다(예를 들어, 미국 특허 제5,874,276호 참조). 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 약 0.00001 중량% 내지 약 10 중량%의 추가 셀룰라제의 수준으로의 셀룰라제, 및 세정 부가 물질의 잔부(조성물의 중량 기준)를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 2 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량%의 셀룰라제 수준으로의 셀룰라제를 포함한다.

[0266] 세제 조성물에 사용되기에 적합한 임의의 만나나제가 또한 본 발명에서 사용된다. 적합한 만나나제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 본 발명에서 사용되는 다양한 만나나제들이 공지되어 있다(예를 들어, 모두가 본 명세서에 참조로서 포함된 미국 특허 제6,566,114호, 미국 특허 제6,602,842호, 및 미국 특허 제6,440,991호 참조). 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 약 0.00001 중량% 내지 약 10 중량%의 추가 만나나제의 수준으로의 만나나제, 및 세정 부가 물질의 잔부(조성물의 중량 기준)를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 2 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량%의 만나나제의 수준으로의 만나나제를 포함한다.

[0267] 일부 실시 형태에서, 퍼옥시다제는 본 발명의 조성물에서 과산화수소 또는 이의 공급원(예를 들어, 과탄산염, 과붕산염 또는 과황산염)과의 조합으로 사용된다. 일부 대안적인 실시 형태에서, 옥시다제는 산소와의 조합으로 사용된다. 두 유형의 효소들 모두는 "용액 표백"을 위해 (즉, 페브릭들이 세척액 중에서 함께 세척되는 경우 염색된 페브릭으로부터 다른 페브릭으로 직물 염료(textile dye)가 이동하는 것을 방지하기 위하여), 바람직 하게는 향상제(enhancing agent)(예를 들어, WO 94/12621호 및 WO 95/01426호 참조)와 함께 사용된다. 적합한 퍼옥시다제/옥시다제는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 약 0.00001 중량% 내지 약 10 중량%의 추가 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제의 수준으로의 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제 효소, 및 세정 부가 물질의 잔부(조성물의 중량 기준)를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 2 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량%의 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제 효소의 수준으로의 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제 효소를 포함한다.

[0268] 일부 실시 형태에서, 추가 효소가 사용되는데, 이는 퍼하이드롤라제(예를 들어, WO 05/056782호 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 또한, 일부 실시 형태에서, 상기 언급된 효소들의 혼합물, 특히 하나 이상의 추가 지방분해 효소, 아밀라제, 프로테아제, 만나나제, 및/또는 적어도 하나의 셀룰라제가 본 명세서에 포함된다. 사실, 이러한 효소들의 다양한 혼합물이 본 발명에서 사용될 것으로 고려된다. 또한 다양한 수준의 변이 지방분해 효소(들) 및 하나 이상의 추가 효소들 양자 모두가 독립적으로 약 10%까지의 범위에 있고, 세정 조성물의 나머지는 세정 부가 물질일 수 있음이 고려된다. 세정 부가 물질에 대한 구체적인 선택은 세정될 표면, 물품 또는 페브릭, 및 사용 (예를 들어, 세척 세제 사용) 동안의 세정 조건들에 바람직한 조성물의 형태를 고려

하여 용이하게 이루어진다.

- [0269] 적합한 세정 부가 물질의 예는 계면활성제, 증강제, 표백제, 표백 활성화제, 표백 촉매, 기타 효소들, 효소 안정화 시스템, 킬레이트제, 광학 증백제, 방오 중합체, 이염제, 이염 억제제, 촉매성 물질, 과산화수소, 과산화수소 공급원, 미리형성된 과산, 중합체 분산제, 점토 오염 제거제, 구조 탄성화제, 분산제, 거품 억제제, 염료, 향료, 착색제, 충전제 염, 하이드로트롭, 광활성제, 형광제, 페브릭 컨디셔너, 페브릭 유연제, 담체, 하이드로트롭, 가공 보조제, 용매, 안료, 가수분해성 계면활성제, 방부제, 산화방지제, 수축방지제, 주름방지제, 살균제, 살진균제, 색조 얼룩, 실버케어, 변색방지제 및/또는 부식방지제, 알칼리성 공급원, 가용화제, 담체, 가공 보조제, 안료, 및 pH 조절제(예를 들어, 모두가 본 명세서에 참조로서 포함된 미국 특허 제6,610,642호, 제6,605,458호, 제5,705,464호, 제5,710,115호, 제5,698,504호, 제5,695,679호, 제5,686,014호 및 제5,646,101호 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 특정 세정 조성 물질의 실시 형태가 아래에서 상세히 예시된다. 세정 부가 물질이 세정 조성물에서 본 발명의 변이 지방분해 효소와 상용성이지 않는 실시 형태에서는, 이어서 세정 부가 물질 및 지방분해 효소(들)를 두 성분의 조합이 적절할 때까지 분리된 채로 (즉, 서로 접촉되지 않는 채로) 유지하는 적합한 방법이 사용된다. 그러한 분리 방법은 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법(예를 들어, 켈캡, 캡슐화, 정제, 물리적 분리 등)을 포함한다.
- [0270] 일부 실시 형태에서, 지방 얼룩 제거의 필요시 다양한 표면을 세정하는데 유용한 조성물에는 본 명세서에서 제공된 하나 이상의 변이 지방분해 효소(들)의 유효량이 포함된다. 그러한 세정 조성물은 경질 표면, 페브릭, 및 식기를 세정하는 그러한 응용을 위한 세정 조성물을 포함한다. 사실, 일부 실시 형태에서, 본 발명은 페브릭 세정 조성물을 제공하는 한편, 다른 실시 형태에서, 본 발명은 비-페브릭 세정 조성물을 제공한다. 본 발명이 임의의 형태(즉, 액체, 과립, 바, 반-고체, 겔, 에멀전, 정제, 캡슐 등)의 세제 조성물을 포함하도록 의도된다.
- [0271] 일례로서, 본 발명의 변이 지방분해 효소가 사용되는 여러 세정 조성물이 하기에 보다 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 세정 조성물이 세탁기 세척 방법(들)에 사용하기 적합한 조성물로서 제형화된 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 적어도 하나의 계면활성제 및 적어도 하나의 증강제 화합물, 및 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 표백제, 추가 효소, 거품 억제제, 분산제, 석회-비누(lime-soap) 분산제, 오염물 현탁제 및 재침착방지제, 및 부식 억제제로부터 선택되는 하나 이상의 세정 부가 물질을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 세탁 조성물은 또한 (즉, 추가 세정 부가 물질로서) 유연제를 함유한다. 본 발명의 조성물은 또한 고체 또는 액체 형태의 세제 첨가제 제품에 사용된다. 그러한 첨가제 제품은 종래의 세제 조성물의 성능을 보충 및/또는 증가시키기 위한 것이며, 세정 프로세스 중 임의의 스테이지에 첨가될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 세탁 세제 조성물의 밀도는 본 명세서에서 20°C에서 측정된 조성물 중 약 400 내지 약 1200 g/리터의 범위인 한편, 다른 실시 형태에서는 약 500 내지 약 950 g/리터의 범위이다.
- [0272] 수동 식기세척 방법에 사용되기 위한 조성물로서 제형화되는 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 적어도 하나의 계면활성제 및 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 거품 향상제, II족 금속 이온, 용매, 하이드로트롭 및 추가 효소로부터 선택되는 적어도 하나의 추가 세정 부가 물질을 함유한다.
- [0273] 일부 실시 형태에서, 미국 특허 제6,605,458호에 제시된 것과 같은 다양한 세정 조성물이 본 발명의 변이 지방분해 효소와 함께 사용된다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하는 조성물이 콤팩트 과립 페브릭 세정 조성물인 한편, 다른 실시 형태에서, 조성물은 색상 페브릭의 세탁에 유용한 과립 페브릭 세정 조성물이고, 추가 실시 형태에서, 조성물은 세척 능력을 통해 유연화를 제공하는 과립 페브릭 세정 조성물이고, 추가 실시 형태에서, 조성물은 강력 액체 페브릭 세정 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이 지방분해 효소를 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,610,642호 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 페브릭 세정 조성물이다. 또한, 본 발명의 변이 지방분해 효소는 유럽 또는 일본의 세척 조건 하에서 특히 유용한 과립 세탁 세제 조성물에 사용된다(예를 들어, 미국 특허 제6,610,642호 참조).
- [0274] 일부 대안적인 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에서 제공된 적어도 하나의 변이 지방분해 효소를 포함하는 경질 표면 세정 조성물을 제공한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이 지방분해 효소를 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,610,642호, 제6,376,450호, 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 경질 표면 세정 조성물이다.
- [0275] 더 추가 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에서 제공된 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하는 식기세척 조성물을 제공한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,610,642호 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 경질 표면 세정 조성물이다. 일부 더

추가 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에서 제공된 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하는 식기세척 조성물을 제공한다. 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명의 변이 지방분해 효소를 적어도 하나 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,376,450호 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 구강 케어 조성물을 포함한다. 상기한 미국 특허 제6,376,450호, 제6,605,458호, 제6,605,458호, 및 제6,610,642호에 포함된 화합물 및 세정 부가 물질의 제형 및 설명은 본 명세서에서 제공된 변이 지방분해 효소와 함께 사용된다.

[0276] 본 발명의 세정 조성물은 임의의 적합한 형태로 제형화되고 조제자에 의해 선택되는 임의의 프로세스로 제조되는데, 이에 대한 비제한적인 예들이 미국 특허 제5,879,584호, 제5,691,297호, 제5,574,005호, 제5,569,645호, 제5,565,422호, 제5,516,448호, 제5,489,392호, 및 제5,486,303호에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본 명세서에 참조로서 포함된다. 낮은 pH 세정 조성물이 요구되는 경우, 그러한 조성물의 pH는 모노에탄올아민 또는 산성 물질, 예컨대 HCl과 같은 물질의 첨가를 통해 조절된다.

[0277] 본 발명의 목적을 위해 필수적인 것은 아니나, 이후 설명되는 부가물들의 비제한적인 목록은 본 세정 조성물에서 사용하기에 적합하다. 일부 실시 형태에서, 이러한 부가물들은, 예를 들어, 세정 성능의 보조 또는 향상을 위해, 세정될 기질의 처리를 위해, 또는 향료, 착색제, 염료 등을 갖는 경우인 것과 같이 세정 조성물의 미감을 변형하기 위해 포함된다. 이러한 부가물들이 본 발명의 변이 지방분해 효소 외의 것임은 이해된다. 이러한 추가 성분들의 명확한 성질, 및 이들의 포함 수준은 조성물의 물리적 형태 및 사용될 세정 작업의 본질에 의존할 것이다. 적합한 부가 물질은 계면활성제, 증강제, 킬레이트화제, 이염 억제제, 침착 보조제, 분산제, 추가 효소, 및 효소 안정제, 촉매성 물질, 표백 활성제, 표백 부스터, 과산화수소, 과산화수소 공급원, 미리형성된 과산, 중합체 분산제, 점도 오염 제거/재침착방지제, 증백제, 거품 억제제, 염료, 향료, 구조 탄성화제, 페브릭 유연제, 담체, 하이드로트롭, 가공 보조제 및/또는 안료를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 하기 기재에 더하여, 그러한 다른 부가물 및 사용 수준에 대한 적합한 예는 미국 특허 제5,576,282호, 제6,306,812호, 및 제6,326,348호에서 확인되며, 이들은 참조로서 포함된다. 상기한 부가 성분은 본 발명의 세정 조성물의 나머지를 구성할 수 있다.

[0278] 일부 실시 형태에서, 본 발명에 따른 세정 조성물은 적어도 하나의 계면활성제 및/또는 계면활성제 시스템을 포함하며, 여기서 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제, 썬비터이온성 계면활성제, 반-극성 비이온성 계면활성제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 낮은 pH 세정 조성물의 실시 형태(예를 들어, 순 pH가 약 3 내지 약 5인 조성물)에서, 조성물은 전형적으로 알킬 에톡실화 설페이트를 포함하지 않는데, 이는 그러한 계면활성제가 그러한 조성물의 산성 함유물에 의해 가수분해될 수 있는 것으로 여겨지기 때문이다. 일부 실시 형태에서, 계면활성제는 세정 조성물의 약 0.1 중량% 내지 약 60 중량%의 수준으로 존재하는 한편, 대안적인 실시 형태에서, 그 수준은 약 1 중량% 내지 약 50 중량%, 더 추가의 실시 형태에서, 그 수준은 약 5 중량% 내지 약 40 중량%이다.

[0279] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 세제 증강제 또는 증강제 시스템을 포함한다. 적어도 하나의 증강제를 포함하는 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세정 조성물의 약 1 중량% 이상, 약 3 중량% 내지 약 60 중량% 또는 심지어 약 5 중량% 내지 약 40 중량%의 증강제를 포함한다. 증강제는 폴리포스포네이트의 알칼리 금속, 암모늄 및 알칸올암모늄 염, 알칼리 금속 규산염, 알칼리 토금속 및 알칼리 금속 탄산염, 알루미늄규산염, 폴리카르복실레이트 화합물, 에테르 하이드록시폴리카르복실레이트, 말레산 무수물과 에틸렌 또는 비닐 메틸 에테르의 공중합체, 1, 3, 5-트라이하이드록시 벤젠-2, 4, 6-트라이선포산, 및 카르복시메틸옥시석신산, 폴리아세트산의 다양한 알칼리 금속, 암모늄 및 치환된 암모늄 염, 예컨대 에틸렌다이아민 테트라아세트산 및 니트릴로트리아세트산, 및 폴리카르복실레이트, 예컨대 멜리트산, 석신산, 시트르산, 옥시다이석신산, 폴리말레산, 벤젠 1,3,5-트리카르복실산, 카르복시메틸옥시석신산, 그리고 이들의 가용성 염을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 사실, 임의의 적합한 증강제가 본 발명의 다양한 실시 형태에서 사용될 것으로 고려된다.

[0280] 일부 실시 형태에서, 증강제는 시트레이트 및 폴리포스페이트(예를 들어, 트라이폴리인산나트륨 및 트라이폴리인산나트륨 옥수화물, 트라이폴리인산칼륨, 및 혼합된 트라이폴리인산나트륨 및 트라이폴리인산칼륨 등)와 같은 수용성 경화 이온 착물(예를 들어, 금속이온봉쇄(sequestering) 증강제)을 형성한다. 본 기술 분야에 공지된 것들(예를 들어, EP 2 100 949호 참조)을 포함하여, 임의의 적합한 증강제가 본 발명에서 사용될 것으로 고려된다.

[0281] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 적어도 하나의 킬레이트화제를 함유한다. 적합한 킬레이트화제는 구리, 철 및/또는 망간 킬레이트화제 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 적어도 하

나의 킬레이트화제가 사용되는 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 대상 세정 조성물의 약 0.1 중량% 내지 약 15 중량% 또는 심지어 약 3.0 중량% 내지 약 10 중량%의 킬레이트화제를 포함한다.

[0282] 일부 더 추가의 실시 형태에서, 본 명세서에서 제공된 세정 조성물은 적어도 하나의 침착 보조제를 함유한다. 적합한 침착 보조제는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리카르복실레이트, 방오 중합체, 예컨대 폴리테레프탈산, 점토, 예컨대 카올리나이트, 몬트모릴로나이트, 아타풀자이트, 일라이트, 벤토나이트, 할로이사이트, 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0283] 본 명세서에서 나타낸 바와 같이, 일부 실시 형태에서, 재침착방지제가 본 발명의 일부 실시 형태에서 사용된다. 일부 실시 형태에서, 비이온성 계면활성제가 사용된다. 예를 들어, 자동 식기세척 실시 형태에서, 비이온성 계면활성제가, 특히 시팅(sheeting)을 위해, 표면 변형의 목적으로 사용되어, 막 형성, 및 얼룩 형성을 방지하고 광채를 향상시킨다. 이러한 비이온성 계면활성제는 또한 오염의 재침착 방지에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 재침착방지제는 본 기술 분야에 공지된 비이온성 계면활성제(예를 들어, EP 2 100 949호 참조)이다.

[0284] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 이염 억제제를 포함한다. 적합한 중합체 이염 억제제는 폴리비닐피롤리돈 중합체, 폴리아민 N-옥사이드 중합체, N-비닐피롤리돈 및 N-비닐이미다졸의 공중합체, 폴리비닐옥사졸리돈 및 폴리비닐이미다졸 또는 이들의 혼합물을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 적어도 하나의 이염 억제제가 사용되는 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 세정 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 약 0.01 중량% 내지 약 5 중량%, 또는 심지어 약 0.1 중량% 내지 약 3 중량%를 포함한다.

[0285] 일부 실시 형태에서, 실리케이트가 본 발명의 조성물에 포함된다. 일부 그러한 실시 형태에서, 규산나트륨(예를 들어, 이규산나트륨, 메타규산나트륨, 및 결정성 필로실리케이트)이 사용된다. 일부 실시 형태에서, 실리케이트는 약 1% 내지 약 20%의 수준으로 존재한다. 일부 실시 형태에서, 실리케이트는 조성물의 약 5 중량% 내지 약 15 중량%의 수준으로 존재한다.

[0286] 일부 또 다른 추가 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 분산제를 함유한다. 적합한 수용성 유기 물질은 폴리카르복실산이 2개 이하의 탄소 원자에 의해 서로 분리되는 적어도 2개의 카르복실 라디칼을 포함하는, 단일중합체 또는 공중합체 산 또는 이의 염을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0287] 일부 추가 실시 형태에서, 세정 조성물에 사용되는 효소는 임의의 적합한 기술에 의해 안정화된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용된 효소는 칼슘 및/또는 마그네슘 이온을 효소에 제공하는 최종 조성물 내의 이러한 이온의 수용성 공급원의 존재에 의해 안정화된다. 일부 실시 형태에서, 효소 안정제는 올리고당, 다당, 및 칼슘 염과 같은 알칼리 토금속 염을 포함하는 무기 2가 금속 염을 포함한다. 효소 안정화를 위한 다양한 기술이 본 발명에서 사용될 것으로 고려된다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용된 효소는 아연 (II), 칼슘 (II) 및/또는 마그네슘 (II) 이온뿐만 아니라 기타 금속 이온(예를 들어, 바륨 (II), 스칸듐 (II), 철 (II), 망간 (II), 알루미늄 (III), 주석 (II), 코발트 (II), 구리 (II), 니켈 (II), 및 옥소바나듐 (IV))을 효소에 제공하는 최종 조성물 내의 이러한 이온의 수용성 공급원의 존재에 의해 안정화된다. 염화물 및 황산염이 또한 본 발명의 일부 실시 형태에서 사용된다. 적합한 올리고당 및 다당(예를 들어, 텍스트린)의 예는 본 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, WO 07/145964호 참조). 일부 실시 형태에서, 가역적인 효소 억제제, 예를 들어 붕소-함유 화합물(예를 들어, 보레이트, 4-포르밀 페닐 보론산)이 또한 사용될 수 있고/있거나 필요한 경우, 안정성을 추가로 개선하기 위해 트라이펩티드 알데하이드가 사용된다.

[0288] 일부 실시 형태에서, 표백제, 표백 활성화제 및/또는 표백 촉매가 본 발명의 조성물에 존재한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 무기 및/또는 유기 표백 화합물(들)을 포함한다. 무기 표백제는 과산화물염(예를 들어, 과붕산염, 과탄산염, 과인산염, 과황산염, 및 과규산염)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 무기 과산화물염은 알칼리 금속 염이다. 일부 실시 형태에서, 무기 과산화물염이 추가 보조 없이 결정성 고체로서 포함되지만, 일부 다른 실시 형태에서 염은 코팅된다. 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 염이 본 발명에서 사용된다(예를 들어, EP 2 100 949호 참조).

[0289] 일부 실시 형태에서, 표백 활성화제가 본 발명의 조성물에 사용된다. 표백 활성화제는 전형적으로 60°C 이하의 온도에서 세정 과정에서 표백 작용을 증강시키는 유기 과산 전구체이다. 본 명세서에서 사용되기에 적합한 표백 활성화제는, 과가수분해(perhydrolysis) 조건 하에서 바람직하게는 약 1 내지 약 10 개의 탄소 원자, 특히 약 2 내지 약 4 개의 탄소 원자를 갖고/갖거나 과벤조산으로 선택적으로 치환된 지방족 퍼옥시카르복실산을 제공하는 화합물을 포함한다. 추가 표백 활성화제가 본 기술 분야에 공지되어 있고 본 발명에서 사용된다(예를 들어, EP 2

100 949호 참조).

- [0290] 또한, 일부 실시 형태에서 그리고 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 본 발명의 세정 조성물은 적어도 하나의 표백 촉매를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 코발트, 구리, 망간, 및 철 착물뿐만 아니라, 망간 트리아자사이클로노난 및 관련 착물이 사용된다. 추가 표백 촉매가 본 발명에서 사용된다(예를 들어, 미국 특허 제4,246,612호, 제5,227,084호 및 제4,810410호, WO 99/06521호, 및 EP 2 100 949호 참조).
- [0291] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 촉매 금속 착물을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 금속-함유 표백 촉매가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 금속 표백 촉매는 정의된 표백 촉매 활성의 전이 금속 양이온(예를 들어, 구리, 철, 티타늄, 루테튬, 텅스텐, 몰리브덴, 또는 망간 양이온), 표백 촉매 활성이 거의 없거나 전혀 없는 보조 금속 양이온(예를 들어, 아연 또는 알루미늄 양이온), 및 촉매 및 보조 금속 양이온에 대해 정의된 안정성 상수를 갖는 금속이온봉쇄제를 포함하는 촉매 시스템을 포함하며, 특히 에틸렌디아민테트라아세트산, 에틸렌디아민테트라(메틸렌포스포산) 및 이들의 수용성 염이 사용된다(예를 들어, 미국 특허 제 4,430,243호 참조). 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 망간 화합물에 의해 촉매된다. 그러한 화합물 및 사용 수준은 본 기술 분야에 잘 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,576,282호 참조). 추가 실시 형태에서, 코발트 표백 촉매가 본 발명의 세정 조성물에 사용된다. 다양한 코발트 표백 촉매가 본 기술 분야에 공지되어 있고(예를 들어, 미국 특허 제5,597,936호 및 제5,595,967호 참조) 공지된 과정에 의해 용이하게 제조된다.
- [0292] 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 거대 다환 강성 리간드(macropolycyclic rigid ligand (MRL))의 전이 금속 착물을 포함한다. 실제적인 문제로서, 그리고 제한적이지 않은 것으로서, 일부 실시 형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 조성물 및 세정 프로세스는 수성 세척 매질 중에 적어도 1 ppm(part per hundred million, 1억당 부) 정도의 활성 MRL 종을 제공하도록 조절되고, 일부 실시 형태에서, 세척액 중에 약 0.005 ppm 내지 약 25 ppm, 더욱 바람직하게는 약 0.05 ppm 내지 약 10 ppm, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 ppm 내지 약 5 ppm의 MRL을 제공하도록 조절된다.
- [0293] 일부 실시 형태에서, 이러한 전이-금속 표백 촉매 중의 전이-금속은 망간, 철 및 크롬을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. MRL은 또한 가교된 특정 초-강성 리간드(예를 들어, 5,12-다이에틸-1,5,8,12-테트라아자바이사이클로[6.6.2]헥사데칸)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 적합한 전이 금속 MRL은 공지된 과정에 의해 용이하게 제조된다(예를 들어, WO 2000/32601호, 및 미국 특허 제6,225,464호 참조).
- [0294] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 금속 보호제(metal care agent)를 포함한다. 금속 보호제는 알루미늄, 스테인레스 스틸, 및 비철 금속(예를 들어, 은 및 구리)을 포함하는 금속들의 변색, 부식 및/또는 산화를 방지 및/또는 감소시키는데 사용된다. 적합한 금속 보호제는 EP 2 100 949호, WO 9426860호 및 WO 94/26859호에 기재된 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 금속 보호제는 아연 염이다. 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량%의 하나 이상의 금속 보호제를 포함한다.
- [0295] 앞서 나타난 바와 같이, 본 발명의 세정 조성물은 임의의 적합한 형태로 제형화되고 조제자에 의해 선택되는 임의의 프로세스로 제조되는데, 이에 대한 비제한적인 예들이 미국 특허 제5,879,584호, 제5,691,297호, 제 5,574,005호, 제5,569,645호, 제5,516,448호, 제5,489,392호, 및 제5,486,303호에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본 명세서에 참조로서 포함된다. 낮은 pH 세정 조성물이 바람직한 일부 실시 형태에서, 그러한 조성물의 pH는 HCl과 같은 산성 물질의 첨가를 통해 조절된다.
- [0296] 본 명세서에 개시된 세정 조성물은 일정 부위(예를 들어, 표면, 물품, 식기류 또는 패브릭)를 세정하는 데 사용된다. 전형적으로, 부위 중 적어도 일부는 순수한 형태의 또는 세척액에 희석된 본 발명의 세정 조성물의 실시 형태와 접촉되고, 이어서 상기 부위는 선택적으로 세척 및/또는 행귀진다. 본 발명의 목적상, "세척"은 스크러빙(scrubbing), 및 기계적 교반을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 전형적으로 용액 중 약 300 ppm 내지 약 15,000 ppm의 농도로 이용된다. 세척 용매가 물인 경우, 수온은 전형적으로 약 5°C 내지 약 90°C 범위이고, 부위가 패브릭을 포함하는 경우, 물 대 패브릭의 질량비는 전형적으로 약 1:1 내지 약 30:1이다.
- [0297] 세정 조성물을 제조하고 사용하는 프로세스
- [0298] 본 발명의 세정 조성물은 임의의 적합한 형태로 제형화되고 조제자에 의해 선택되는 임의의 적합한 프로세스로 제조된다(예를 들어, 미국 특허 제5,879,584호, 제5,691,297호, 제5,574,005호, 제5,569,645호, 제5,565,422호, 제5,516,448호, 제5,489,392호, 제5,486,303호, 제4,515,705호, 제4,537,706호,

제4,515,707호, 제4,550,862호, 제4,561,998호, 제4,597,898호, 제4,968,451호, 제5,565,145호, 제5,929,022호, 제6,294,514호 및 제6,376,445호 참조).

[0299] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 정제, 캡슐, 사체(sachet), 파우치, 및 다중-구획 파우치를 포함하는 단위 투여 형태로 제공된다. 일부 실시 형태에서, 단위 투여 포맷은 다중-구획 파우치 (또는 기타 단위 투여 포맷) 내 성분들의 제어된 방출을 제공하도록 설계다. 적합한 단위 투여 및 제어된 방출 포맷은 본 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, EP 2 100 949호, WO 02/102955호, 미국 특허 제4,765,916호 및 제4,972,017호, 및 단위 투여 및 제어된 방출 포맷으로 사용하기에 적합한 물질에 대해서는 WO 04/111178호 참조). 일부 실시 형태에서, 단위 투여 형태는 수용성 필름 또는 수용성 파우치로 싸인 정제로 제공된다. 단위 투여를 위한 다양한 포맷이 EP 2 100 947호에서 제공되고, 본 기술 분야에 공지되어 있다.

[0300] 사용 방법

[0301] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 표면(예를 들어, 식기류), 세탁물, 경질 표면, 콘택트 렌즈 등을 세정하는데 사용된다. 일부 실시 형태에서, 표면 중 적어도 일부는, 순수한 형태의 또는 세척액에 희석된 본 발명의 세정 조성물의 적어도 하나의 실시 형태와 접촉되고, 그 후 표면이 선택적으로 세척 및/또는 행거진다. 본 발명의 목적상, "세척"은 스크리빙, 및 기계적 세척을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 용액 중에 약 500 ppm 내지 약 15,000 ppm의 농도로 사용된다. 세척 용매가 물인 일부 실시 형태에서, 수온은 전형적으로 약 5°C 내지 약 90°C 범위이다.

[0302] 본 발명은 세정을 필요로 하는 물품 또는 표면(예를 들어, 경질 표면)을 세정 또는 세척하기 위한 방법을 제공하는데, 이는 식기류 물품, 식탁용 식기류 물품, 패브릭 물품, 세탁 물품, 개인 케어 용품 등을 세정 또는 세척하는 방법, 및 경질 또는 연질 표면(예를 들어, 물품의 경질 표면)을 세정 또는 세척하는 방법을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0303] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 세정을 필요로 하는 물품, 대상물, 또는 표면을 세정하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 물품, 대상물 또는 표면을 원하는 정도로 세정하기에 충분한 시간 동안 그리고/또는 적합하고/하거나 효과적인 조건 하에서 물품 또는 표면(또는 세정하고자 하는 물품 또는 표면 중 일부)을 적어도 하나의 본 발명의 변이 리파제 지방분해 효소 또는 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 그러한 방법은 물품, 대상물, 또는 표면을 물로 행구는 단계를 추가로 포함한다. 일부 그러한 방법에 대해, 세정 조성물은 식기 세척 세제 조성물이고, 세정될 물품 또는 대상물은 식기류 물품 또는 식탁용 식기류 물품이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "식기류 물품"은 음식을 서빙하거나 먹는데 일반적으로 사용되는 물품이다. 식기류 물품은, 예를 들어, 접시, 쟁반, 컵, 보울 등일 수 있으나, 이로 제한되지는 않는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "식탁용 식기류"는 예를 들어, 접시, 날붙이류(cutlery), 나이프, 포크, 스푼, 젓가락, 유리제품, 피치(pitcher), 소스 그릇(sauce boat), 음료 그릇, 서빙 물품 등을 포함하지만, 이로 제한되지는 않은 광범위한 용어이다. "식탁용 식기류 물품"은 음식을 서빙하거나 먹기 위한 이러한 또는 유사한 물품들 중 임의의 것을 포함한다. 일부 그러한 방법에 대해, 세정 조성물은 자동 식기세척 세제 조성물 또는 손 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품 또는 대상물은 식기류 또는 식탁용 식기류 물품이다. 일부 그러한 방법에 대해, 세정 조성물은 세탁 세제 조성물(예를 들어, 분말 세탁 세제 조성물 또는 액체 세탁 세제 조성물)이고, 세정될 물품은 패브릭 물품이다. 일부 다른 실시 형태에서, 세정 조성물은 세탁 전처리 조성물이다.

[0304] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 각각 세정 또는 세척을 필요로 하는 패브릭 물품을 선택적으로 세정 또는 세척하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 패브릭 또는 세탁 세정 조성물을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 변이 지방분해 효소를 포함하는 조성물 및 세정을 필요로 하는 패브릭 물품 또는 세탁 물품을 제공하는 단계, 및 패브릭 또는 세탁 물품을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분하거나 효과적인 조건 하에서 패브릭 물품 또는 세탁 물품 (또는 세정하고자 하는 물품 중 일부)을 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0305] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 세정을 필요로 하는 물품 또는 표면(예를 들어, 경질 표면)을 선택적으로 세정 또는 세척하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 세정 또는 세척될 물품 또는 표면을 제공하는 단계, 및 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분한 시간 동안 그리고/또는 충분하거나 효과적인 조건 하에서 물품 또는 표면(또는 세정 또는 세척하고자 하는 물품 또는 표면 중 일부)을 적어도 하나의 본 발명의 리파제 변이체 또는 적어도 하나의 그러한 리파제 변이체를 포함하는 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 그러한 조성물은, 예를 들어, 본 발명의 세정 조성물 또는 세제 조성물(예를 들어, 손 식기세척 세제 조성물, 손 식기세척 세정 조성물, 세탁 세제 또는 패브릭 세제 또는 세탁물 또는 패브릭 세정 조성물, 액체 세탁 세제, 액체 세탁 세정 조성물, 분말 세탁 세제 조성물, 분말 세탁 세정 조성물, 자동 식기세척 세제 조성물, 세탁 부

스터 세정 또는 세제 조성물, 세탁 세정 첨가제, 및 세탁 예비-얼룩빼기 조성물 등)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은, 특히 추가 세정 또는 세척이 요구되는 경우, 1회 이상 반복된다. 예를 들어, 일부 경우에, 본 방법은 선택적으로 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분하거나 효과적인 시간 동안 물품 또는 표면을 적어도 하나의 변이 지방분해 효소 또는 조성물과 접촉한 채로 두는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 물품 또는 표면을 물 및/또는 다른 액체로 행구는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 물품 또는 표면을 적어도 하나의 본 발명의 변이 지방분해 효소 또는 본 발명의 조성물과 다시 접촉시키는 단계와 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분한 시간 동안 물품 또는 표면을 적어도 하나의 변이 지방분해 효소 또는 조성물과 접촉한 채로 두는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품은 식기류 또는 식탁용 식기류 물품이다. 본 방법의 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 자동 식기세척 세제 조성물 또는 손 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품은 식기류 또는 식탁용 식기류 물품이다. 본 방법의 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세탁 세제 조성물이고, 세정될 물품은 패브릭 물품이다.

[0306] 본 발명은 또한 자동 식기세척기에서 식탁용 식기류 또는 식기류 물품을 세정하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 자동 식기세척기를 제공하는 단계, 적어도 하나의 본 발명의 리파제 변이체를 포함하는 자동 식기세척 조성물 또는 본 발명의 조성물을 식탁용 식기류 또는 식기류 물품을 세정하기에 충분한 양으로 식기세척기 내에 (예를 들어, 조성물을 식기세척기의 적합한 또는 제공되는 세제 칸 또는 디스펜서 내에 넣음으로써) 넣는 단계, 식기류 또는 식탁용 식기류 물품을 식기세척기 내에 두는 단계, 및 (예를 들어, 제조사의 사용 설명에 따라) 식기세척기를 작동시켜 식탁용 식기류 또는 식기류 물품을 세정하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 본 명세서에서 제공된 적어도 하나의 리파제 변이체를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는, 본 명세서에 기재된 임의의 자동 식기세척 조성물을 포함한다. 사용될 자동 식기세척 조성물의 양은 제조사의 사용 설명 또는 제안에 따라 용이하게 결정될 수 있고, 본 명세서에 기재된 임의의 것을 포함하는 적어도 하나의 본 발명의 변이 지방분해 효소를 포함하는 자동 식기세척 조성물의 임의의 형태(예를 들어, 액체, 분말, 고체, 겔, 정제 등)가 사용될 수 있다.

[0307] 본 발명은 또한 세정을 필요로 하는 표면, 물품 또는 대상물을 선택적으로 세정하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분한 시간 동안 그리고/또는 충분하거나 효과적인 조건 하에서 물품 또는 표면(또는 세정하고자 하는 물품 또는 표면 중 일부)을 순수한 형태의 또는 세척액에 희석된 적어도 하나의 본 발명의 변이 리파제 또는 본 발명의 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 이어서, 원한다면, 표면, 물품, 또는 대상물은 (선택적으로) 세척되고/되거나 행구질 수 있다. 본 발명의 목적상, "세척"은, 예를 들어, 스크러빙 및 기계적 교반을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 용액 (예를 들어, 수용액) 중 약 500 ppm 내지 약 15,000 ppm의 농도로 사용된다. 세척 용매가 물인 경우, 수온은 전형적으로 약 5°C 내지 약 90°C 범위이고, 표면, 물품 또는 대상물이 패브릭을 포함하는 경우, 물 대 패브릭의 질량비는 전형적으로 약 1:1 내지 약 30:1이다.

[0308] 본 발명은 또한 세탁기에서 세탁물 또는 패브릭 물품을 세정하는 방법을 제공하는 데, 본 방법은 세탁기를 제공하는 단계, 적어도 하나의 본 발명의 변이 리파제를 포함하는 세탁 세제 조성물을 세탁물 또는 패브릭 물품을 세정하기에 충분한 양으로 세탁기 내에 (예를 들어, 조성물을 세탁기의 적합한 또는 제공되는 세제 칸 또는 디스펜서 내에 넣음으로써) 넣는 단계, 세탁물 또는 패브릭 물품을 세탁기 내에 넣는 단계, 및 (예를 들어, 제조사의 사용 설명에 따라) 세탁기를 작동시켜 세탁물 또는 패브릭 물품을 세정하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 본 명세서에서 제공된 적어도 하나의 임의의 변이 리파제를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는, 본 명세서에 기재된 임의의 세탁 세척 세제 조성물을 포함한다. 사용될 세탁 세제 조성물의 양은 제조사의 사용 설명 또는 제안에 따라 용이하게 결정될 수 있고, 본 명세서에 기재된 임의의 것을 포함하는 적어도 하나의 본 발명의 변이 지방분해 효소를 포함하는 세탁 세제 조성물의 임의의 형태(예를 들어, 고체, 분말, 액체, 정제, 겔 등)가 사용될 수 있다.

[0309] 본 발명은 또한 에스테라제 활성을 갖는, TLL 변이체와 같은 변이체를 제공한다. 에스테라제 활성은 에스테르, 예를 들어, 트라이글리세라이드의 단량체성, 가용성 형태에서의 절단을 포함한다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이체는 비이온성 또는 쯔비터이온성 보조제, 예를 들어, n-도데실-베타-D-말토피라노시드(D310), 라이소포스 콜린(LysoFos Choline) 14(L214), 안저젠트(Anzergent) 3-12(AZ312) 및 챔소(C317)를 포함하는 보조제의 존재 하에서 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이체는 1X, 0.5X, 및 0.25X의 임계 미셀 농도(CMC)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는 보조제 수준의 상이한 농도로 사용될 수 있다.

- [0310] 본 발명은 또한 섬유에서 유기 오염물을 제어하는 것을 포함하는 펄프 및 종이 가공에 유용한, TLL 변이체와 같은 변이체를 제공한다. 섬유는 셀룰로오스 섬유일 수 있고, 일부 경우에, 이는 오래된 주름진 용기(OCC), 오래된 신문용지(ONP), 혼합된 사무실 폐기물(MOW), 또는 이들의 조합과 같은 다양한 종이 제품 또는 섬유 함유 제품으로부터 재활용된 섬유이다. 이러한 유형의 종이 함유 제품은 전형적으로 종이 제품에 존재하는 다량의 유기 오염물을 함유한다. 이러한 유형의 종이 제품이 재활용되는 경우, 이러한 유기 오염물은 종이 제조 프로세스의 펄프화 스테이지 동안 형성된 섬유와 함께 존재한다. 실질적으로 제거되지 않는다면, 이러한 유기 오염물은 형성된 종이의 생성된 시트의 품질에 영향을 줌으로써 그리고/또는 종이를 형성하는데 사용된 기계에 영향을 줌으로써 종이 제조 프로세스에서 후속 스테이지를 심각하게 방해할 수 있다. 따라서, 그러한 유기 오염물이 섬유에 존재할 때 그러한 유기 오염물의 제거는 종이 제조 프로세스에 중요하다.
- [0311] 본 발명의 목적상, 유기 오염물의 예는 본 산업에서 "점착물(sticky)"로 알려진 것을 포함하고, 이는 점착제 등으로부터 생성된 합성 중합체, 아교, 핫 멜트(hot melt), 코팅, 코팅 결합제, 잉크 잔류물, 탈잉크 화학물질, 목재 수지, 로진(rosin), 및 펄프화되지 않은 습강도 수지를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 이러한 유형의 물질은 전형적으로 종이 함유 제품, 예를 들어, 신문용지, 주름진 용기, 및/또는 혼합 사무실 폐기물에서 발견된다. 이러한 유기 오염물에는 전형적으로 스티렌 부타다이엔 고무, 비닐 아크릴레이트, 폴리아이소프렌, 폴리부타디엔, 천연 고무, 에틸 비닐 아세테이트, 폴리비닐 아세테이트, 에틸비닐 알코올, 폴리비닐 알코올, 스티렌 아크릴레이트, 및 기타 합성 유형 중합체와 같은 중합체가 존재할 것이다.
- [0312] 본 발명의 프로세스에서, 이러한 유기 오염물은 섬유에 존재하는 유기 오염물을 제어하기에 충분한 시간 동안 그리고 충분한 양으로 유기 오염물을 포함하는 섬유를 적어도 하나의 본 발명의 변이체를 함유하는 조성물과 접촉시킴으로써 제어된다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 유기 오염물을 분산시키거나 종이 제조 프로세스에 영향을 주지 않는 유기 화학종으로 변환시킨다. 예를 들어, 폴리비닐 아세테이트는 바람직하게는 분산되고/되거나 종이 제조 프로세스에 영향을 주지 않는 폴리비닐 알코올로 변환된다. 조성물이 유기 오염물의 제어를 달성하는 이러한 바람직한 방식은 부유에 의해 오염물을 수집하는 것과는 매우 상이하다.
- [0313] 본 발명의 목적상, 유기 오염물을 갖는 섬유에 존재하는 유기 오염물을 제어하는 것은 하기들 중 하나 이상으로 이해된다: 오염물 입자의 크기를 줄이는 것, 존재하는 측정가능한 입자의 수 또는 양을 줄이는 것, 및/또는 유기 오염물의 점착성을 줄이는 것. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 방법을 사용하여 유기 오염물을 제어하는 경우, 이들 감소들 모두가 일어난다. 일부 실시 형태에서, 오염물 입자 크기는 본 발명의 변이체가 존재하지 않는 경우와 비교할 때 약 5% 이상, 또는 약 10% 내지 약 75%만큼 감소한다. 유사하게, 섬유에 존재하는 유기 오염물의 수 또는 양의 감소는 본 발명의 변이체로 처리되지 않은 섬유와 비교할 때, 약 5% 이상, 또는 약 10% 내지 약 75%만큼 감소된다. 또한, 유기 오염물의 점착성의 감소는 본 발명의 변이체로 처리되지 않은 섬유와 비교할 때, 약 5% 이상, 또는 약 10% 내지 약 75%만큼 감소될 수 있다.
- [0314] 본 발명의 적어도 하나의 변이체를 함유하는 조성물은 또한 선택적인 기타 종래 종이 처리 화학물질 또는 성분, 예를 들어, 계면활성제, 용매, 현탁 보조제, 충전제, 킬레이트제, 방부제, 완충제, 물, 안정제 등을 그에 제한 없이 함유할 수 있다. 이러한 추가 성분은 종래의 양으로 존재할 수 있다.
- [0315] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 깨끗하고 오염되지 않은 폴리에스테르를 포함하는 폴리에스테르를 처리하기 위한 방법이 제공되는데, 본 방법은 폴리에스테르의 특성이 변형되는 시간 동안 그리고 조건 하에서 상기 폴리에스테르 직물을 본 발명의 변이체를 갖는 효소 용액과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 폴리에스테르는 섬유, 양(yarn), 패브릭 또는 그러한 섬유, 양 또는 패브릭을 포함하는 완성된 직물 제품이다. 더욱 바람직하게는, 변형되는 특성은 그러한 섬유, 양 또는 용품으로 제조된 직물의 향상된 촉감 및/또는 중량과 같은 것들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 직물을 포함하는 폴리에스테르의 직물 특성을 변형시키기 위한 메커니즘을 제공하기 위한 것이다. 따라서, 본 발명의 이러한 실시 형태에서, 오염되지 않은, 즉, 전형적으로 상업적 세탁 세제로 처리되는 얼룩을 포함하지 않는 직물 제품에 폴리에스테라제를 적용하는 것이 종종 유리하다. 다른 실시 형태에서, 본 발명은 폴리에스테르 패브릭으로부터 얼룩을 세탁하는 방법을 제공하기 위한 것이다.
- [0316] 본 발명의 다른 실시 형태에서, 폴리에스테르 섬유, 양 또는 패브릭을, 이것이 직물 제품으로 포함되거나 직물 마무리의 적용 전에, 폴리에스테르의 특성이 변형되도록 하는 시간 동안 그리고 조건 하에서 본 발명의 효소 변이체에 의해 처리하기 위한 방법이 제공된다. 따라서, 직물 성분이 별도로 처리되는 실시 형태에서, 처리된 폴리에스테르 성분(즉, 섬유, 양, 패브릭)은 폴리에스테르 직물을 생산하기 위한 표준 방법, 예를 들어, 직조, 재봉 및 절단 및 케뎀과 같은 프로세스를 통해 직물 제품으로 포함됨으로써 완성된 직물 제품에 변형을 부여할 수

있다.

[0317] 본 발명의 또 다른 방법 실시 형태에서, 폴리에스테르의 특성이 변형되도록 하는 시간 동안 그리고 조건 하에서 폴리에스테르 수지 또는 필름을 본 발명의 효소 변이체로 처리하기 위한 방법이 제공된다. 처리된 폴리에스테르는 완성된 수지 또는 필름 제품일 수 있거나, 예를 들어, 기계적 구성을 통해 제품으로 포함될 수 있으므로, 완성된 식물 제품에 변형을 부여할 수 있다.

[0318] 본 발명의 또 다른 방법 실시 형태에서, 폴리에스테르 폐기물 제품은 본 발명의 효소 변이체로 처리되어 폴리에스테르 폐기물 제품을 분해하여 용이하게 폐기하거나 재활용 화합물로 된다. 이러한 실시 형태는 폐기물의 처분 및 폐기에 점점 더 문제가 되고 있는 폴리에스테르계 플라스틱의 분해에 특히 유용하다. 이러한 실시 형태의 대안은 본 발명이 폐기물 제품에서 미생물적으로 분해될 수 있는 물질의 양을 증가시켜 그러한 폐기물의 완전한 분해 또는 퇴비화를 용이하게 하는 데 사용될 수 있다는 것이다.

[0319] 본 발명에 따른 방법에서, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 본 발명의 효소 변이체를 함유하는 용액은 효소가 폴리에스테르 변형을 나타내기에 적합한 조건 하에서 그러한 섬유, 얇 또는 페브릭을 포함하는 폴리에스테르 섬유, 얇, 페브릭 또는 식물과 접촉된다. 본 발명은 바람직하게는 식물 제품의 제조에 있어서 폴리에스테라제의 사용에 관한 것이고, 착용하는 동안 발생하는 얼룩의 제거를 목적으로 하는 세제와 조합하여서 반드시 그런 것은 아니다. 따라서, 이 실시 형태에서, 본 발명의 효소 변이체의 폴리에스테르 용품으로의 적용은 섬유의 얇으로 방사 전에, 얇의 페브릭으로의 혼입 전에, 그리고/또는 폴리에스테르를 포함하는 식물 제품의 구성 전에 일어난다. 그러나, 완전한 식물 제품을 본 명세서에서 확인된 본 발명의 효소 변이체로 처리하는 것은 또한 본 발명 내에 있고, 또한 본 명세서 상의 바람직한 실시 형태이다.

[0320] **실험**

[0321] 본 발명은 하기 실시예들에서 더욱 상세히 설명되는데, 이들이 청구된 본 발명의 범주를 어떤 식으로든 제한하려는 것은 아니다.

[0322] 하기의 개시된 실험의 설명에서는, 하기 약어들이 적용된다: PI (성능 지수), ppm (백만분율); 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 (분); h 및 hr (시간); $^{\circ}$ C (섭씨 도); QS (적당량); ND (실시하지 않음); rpm (분당 회전수); GH (독일식 경도); H₂O (물); dH₂O (탈이온수); HCl (염산); aa (아미노산); bp (염기쌍); kb (킬로염기쌍); kD (킬로달톤); cDNA (사본 또는 상보성 DNA); DNA (데옥시리보핵산); ssDNA (단일 가닥 DNA); dsDNA (이중 가닥 DNA); dNTP (데옥시리보뉴클레오타이드 트라이포스페이트); RNA (리보핵산); MgCl₂ (염화 마그네슘); NaCl (염화나트륨); w/v (중량 대 부피); v/v (부피 대 부피); w/w (중량 대 중량); g (중력가속도); OD (광학 밀도); ppm (백만분율); 둘베코 인산염 완충 용액 (DPBS); SOC (2% 박토-트립톤, 0.5% 박토 효모 추출물, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl); 테리픽 브로스 (TB; 12 g/l 박토-트립톤, 24 g/l 글리세롤, 2.31 g/l KH₂PO₄, 및 12.54 g/l K₂HPO₄); OD₂₈₀ (280 nm에서의 광학 밀도); OD₆₀₀ (600 nm에서의 광학 밀도); A₄₀₅ (405 nm에서의 흡광도); V_{max} (효소 촉매 반응의 최대 초기 속도); PAGE (폴리아크릴아미드 겔 전기영동); PBS (인산염 완충 식염수 [150 mM NaCl, 10 mM 인산나트륨 완충액, pH 7.2]); PBST (PBS+0.25% TWEEN®-20); PEG (폴리에틸렌 글리콜); PCR (중합효소 연쇄 반응); RT-PCR (역전사 PCR); SDS (소듐 도데실 설페이트); Tris (트리스(하이드록시메틸)아미노메탄); HEPES (N-[2-하이드록시에틸]피페라진-N-[2-에탄설포산]); HBS (HEPES 완충 식염수); Tris-HCl (트리스[하이드록시메틸]아미노메탄-하이드로클로라이드); Tricine (N-[트리스-(하이드록시메틸)-메틸]-글리신); CHES (2-(N-사이클로-헥실아미노) 에탄-설포산); TAPS (3-([트리스-(하이드록시메틸)-메틸]-아미노)-프로판설포산); CAPS (3-(사이클로-헥실아미노)-프로판-설포산); DMSO (다이메틸 설펝사이드); DTT (1,4-다이티오-DL-트레이톨); SA (시나핀산 (s,5-다이메톡시-4-하이드록시 신남산)); TCA (트라이클로로아세트산); Glut 및 GSH (환원된 글루타티온); GSSG (산화된 글루타티온); TCEP (트리스[2-카르복시에틸] 포스핀); Ci (큐리); mCi (밀리큐리); μ Ci (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 중합효소); Klenow (DNA 중합효소 I 대형 (Klenow) 절편); EGTA (에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르) N, N, N', N'-테트라아세트산); EDTA (에틸렌다이아민테트라아세트산); bla

(β -락타마제 또는 암피실린-내성 유전자); HDL (고밀도 액체); HDD (강력 분말 세제); HSG (고 거품 과립 세제); CEE (중유럽 및 동유럽); WE (서유럽); 세제에 관하여 사용될 때 NA (북아메리카); 세제에 관하여 사용될 때 Japan 및 JPN (일본); 엠제이 리서치(MJ Research) (미국 네바다주 르노 소재의 엠제이 리서치(MJ Research)); 베이스클리어(Baseclear) (네덜란드 라이덴 소재의 베이스클리어 비브이, 인크.(Baseclear BV, Inc.)); 퍼셉티브(PerSeptive) (미국 매사추세츠주 프래밍햄 소재의 퍼셉티브 바이오시스템즈(PerSeptive Biosystems)); 써모피니간(ThermoFinnigan) (미국 캘리포니아주 산호세 소재의 써모피니간(ThermoFinnigan)); 아르코(Argo) (미국 뉴저지주 모리스 플레인즈 소재의 아르코 바이오애널리티카(Argo BioAnalytica)); 사이츠에 카스(Seitz EKS) (독일 바드 크로이쯔나흐 소재의 사이츠셴크 필터시스템즈 게엠베하(SeitzSchenk Filtersystems GmbH)); 팔(Pall) (미국 뉴욕주 이스트 힐즈 및 독일 바드 크로이쯔나흐 소재의 팔 코포레이션(Pall Corp.)); 스펙트럼(Spectrum) (미국 캘리포니아주 도밍구에즈 란초 소재의 스펙트럼 레보러토리즈(Spectrum Laboratories)); 몰클라 스트럭처(Molecular Structure) (미국 텍사스주 우드랜즈 소재의 몰클라 스트럭처 코포레이션(Molecular Structure Corp.)); 악셀리즈(Accelrys) (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 악셀리즈 인크.(Accelrys, Inc.)); 케미칼 컴퓨팅(Chemical Computing) (캐나다 몬트리올 소재의 케미칼 컴퓨팅 코포레이션(Chemical Computing Corp.)); 뉴 브런스윅(New Brunswick) (미국 뉴저지주 에디슨 소재의 뉴 브런스윅 사이언티픽 컴퍼니(New Brunswick Scientific, Co.)); 씨에프티(CFT) (네덜란드 블라르딩겐 소재의 센터 포 테스트 머티리얼스(Center for Test Materials)); 피앤지(P&G) 및 프록터 앤 갬블(Procter & Gamble) (미국 오하이오주 신시네티 소재의 프록터 앤 갬블 인크.(Procter & Gamble, Inc.)); 지이 헬스케어(GE Healthcare) (영국 세인트 자일스 샬폰트 소재의 지이 헬스케어(GE Healthcare)); 디엔에이2.0(DNA2.0) (미국 캘리포니아주 멘로 파크 소재의 디엔에이2.0(DNA2.0)); 옥소이드(OXOID) (영국 햄프셔주 배싱스토크 소재의 옥소이드(OXOID)); 메가자임(Megazyme) (아일랜드 위크로우, 브레이, 코., 브레이 비즈니스 파크 소재의 메가자임 인터내셔널 아일랜드 리미티드(Megazyme International Ireland Ltd.)); 핀자임스(Finnzymes) (핀란드, 에스푸 소재의 핀자임스 오이(Finnzymes Oy)); 켈코(Kelco) (미국 델라웨어주 월밍턴 소재의 씨피 켈코(CP Kelco)); 코닝(Corning) (미국 뉴욕주 코닝 소재의 코닝 라이프 사이언시즈(Corning Life Sciences)); 넨(NEN) (미국 매사추세츠주 보스턴 소재의 넨 라이프 사이언스 프로덕츠(NEN Life Science Products)); 파마 에이에스(Pharma AS) (노르웨이 오슬로 소재의 파마 에이에스(Pharma AS)); 다이날(Dynal) (노르웨이 오슬로 소재의 다이날(Dynal)); 바이오-신테시스(Bio-Synthesis) (미국 텍사스주 루이스빌 소재의 바이오-신테시스(Bio-Synthesis)); 에이티씨(ATCC) (미국 매릴랜드주 록빌 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)); 깁코/비알엘(Gibco/BRL) (미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 깁코/비알엘(Gibco/BRL)); 시그마(Sigma) (미국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마 케미칼 컴퍼니(Sigma Chemical Co.)); 파마시아(Pharmacia) (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech)); 엔씨비아이(NCBI) (미국 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)); 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)); 비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences) 및/또는 Clontech (미국 캘리포니아주 팔로알토 소재의 비디 바이오사이언시즈 클론테크 레보러토리즈(BD Biosciences CLONTECH Laboratories)); 오페론 테크놀로지즈(Operon Technologies) (미국 캘리포니아주 알라메다 소재의 오페론 테크놀로지즈 인크.(Operon Technologies, Inc.)); 엠더블류지 바이오테크(MWG Biotech) (미국 노스캐롤라이나주 하이 포인트 소재의 엠더블류지 바이오테크(MWG Biotech)); 올리고스 이터씨(Oligos Etc) (미국 오리건주 윌슨빌 소재의 올리고스 이터씨 인크.(Oligos Etc. Inc.)); 바켄(Bachem) (미국 펜실베이니아주 킹 오브 프리시아 소재의 바켄 바이오사이언스 인크.(Bachem Bioscience, Inc.)); 디프코(Difco) (미국 미시간주 디트로이트 소재의 디프코 레보러토리즈(Difco Laboratories)); 메디아테크(Mediatech) (미국 버지니아주 헨든 소재의 메디아테크(Mediatech)); 산타 크루즈(Santa Cruz) (미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재의 산타 크루즈 바이오테크놀로지 인크.(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)); 옥소이드(Oxoid) (미국 뉴욕주 오그덴스버그 소재의 옥소이드 인크.(Oxoid Inc.)); 워싱턴(Worthington) (미국 뉴저지주 프리홀드 소재의 워싱턴 바이오케미칼 코포레이션(Worthington Biochemical Corp.)); 깁코 비알엘(GIBCO BRL 또는 Gibco BRL) (미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재의 라이프 테크놀로지즈, 인크.(Life Technologies, Inc.)); 밀리포어(Millipore) (미국 매사추세츠주 빌러리카 소재의 밀리포어); 바이오-라드(Bio-Rad) (미국 캘리포니아주 허클레스 소재의 바이오-라드); 인비트로젠(Invitrogen) (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corp.)); 엔이비(NEB) (미국 매사추세츠주 비버리 소재의 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)); 시그마 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 케미칼 컴퍼니(Sigma Chemical Co.)); 피어스(Pierce) (미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스 바이오테크놀로지(Pierce Biotechnology)); 타카라(Takara) (일본 오투 소재의 타카라 바이오 인크.(Takara Bio Inc.)); 로쉐(Roche) (스위스 바젤 소재의 호프만-라 로쉐(Hoffmann-La Roche)); 이엠 사이언스(EM Science) (미국 뉴저지

주 김스타운 소재의 이엠 사이언스); 퀴아젠(Qiagen) (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 퀴아젠 인크.(Qiagen, Inc.)); 바이오디자인(Biodesign) (미국 메인주 사코 소재의 바이오디자인 인터내셔널(Biodesign Intl.)); 압타젠(Aptagen) (미국 버지니아주 헨든 소재의 압타젠 인크.(Aptagen, Inc.)); 소르발(Sorvall) (미국 노스캐롤라이나주 애쉬빌 소재의 켄드로 래버러토리 프로덕츠(Kendro Laboratory Products)로부터의 소르발 브랜드); 몰쿨라 디바이시스(Molecular Devices) (미국 캘리포니아주 쉰니베일 소재의 몰쿨라 디바이시스 코포레이션(Molecular Devices, Corp.)); 알앤디 시스템즈(R&D Systems) (미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈); 지그프리트 핸델(Siegfried Handel) (스위스 조핑엔 소재의 지그프리트 핸델 아게(Siegfried Handel AG)); 스트라타진(Stratagene) (미국 캘리포니아주 라 졸라 소재의 스트라타진 클로닝 시스템즈(Stratagene Cloning Systems)); 마쉬(Marsh) (미국 뉴욕주 로체스터 소재의 마쉬 바이오사이언시즈(Marsh Biosciences)); 제네아트(Geneart) (독일 레겐스부르크 소재의 제네아트 게엠베하(Geneart GmbH)); 바이오-테크(Bio-Tek) (미국 버몬트주 위누스키 소재의 바이오-테크 인스트루먼트즈(Bio-Tek Instruments)); 바이아코어(Biacore) (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 바이아코어 인크.(Biacore, Inc.)); 페프로테크(PeproTech) (미국 뉴저지주 록키 힐 소재의 페프로테크); 신펙(SynPep) (미국 캘리포니아주 더블린 소재의 신펙); 뉴 오브젝티브(New Objective) (뉴 오브젝티브 브랜드; 미국 뉴저지주 링고즈 소재의 사이언티픽 인스트루먼트 서비스즈 인크.(Scientific Instrument Services, Inc.)); 워터스(Waters) (미국 매사추세츠주 밀포드 소재의 워터스 인크.(Waters, Inc.)); 매트릭스 사이언스(Matrix Science) (미국 매사추세츠주 보스턴 소재의 매트릭스 사이언스); 디오넥스(Dionex) (미국 캘리포니아주 쉰니베일 소재의 디오넥스 코포레이션(Dionex, Corp.)); 몬산토(Monsanto) (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 몬산토 컴퍼니(Monsanto Co.)); 윈터샬(Wintershall) (독일 카젤 소재의 윈터샬 아게(Wintershall AG)); 바스프 (미국 뉴저지주 플로햄 파크 소재의 바스프 컴퍼니(BASF Co.)); 헌츠맨(Huntsman) (미국 유타주 솔트 레이크 시티 소재의 헌츠맨 페트로케미칼 코포레이션(Huntsman Petrochemical Corp.)); 셸 케미칼스(Shell Chemicals) (영국 런던 소재의 셸 케미칼스 인크.(Shell Chemicals, Inc.)); 스테판(Stepan) (미국 일리노이주 노스필드 소재의 스테판); 클라리언트 (독일 솔츠바흐 소재의 클라리언트);인더스트리얼 제올라이트(Industrial Zeolite) (영국 에섹스, 그레이스 소재의 인더스트리얼 제올라이트 리미티드(Industrial Zeolite Ltd.)); 융분츠라우어(Jungbunzlauer) (스위스 바젤 소재의 융분츠라우어); 솔베이(Solvay) (벨기에 브뤼셀 소재의 솔베이); 쓰리브이 시그마(3V Sigma) (이탈리아 베르가모 소재의 쓰리브이 시그마); 이노스펙(Innospec) (영국 엘즈미어 포트 소재의 이노스펙); 썸포스(Thermphos) (네덜란드 블리시겐-오스트 소재의 썸포스); 시바 스페셜티(Ciba Specialty) (스위스 바젤 소재의 시바 스페셜티 케미칼스(Ciba Specialty Chemicals)); 다우 코닝(Dow Corning) (영국 배리 소재의 다우 코닝); 에니켵(Enichem) (스페인 바르셀로나 소재의 에니켵 이베리카(Enichem Iberica)); 플루카 케미 아게(Fluka Chemie AG) (스위스 부크스 소재의 플루카 케미 아게); 지스트-브로케이즈(Gist-Brocades) (네덜란드 델프트 소재의 지스트-브로케이즈 엔브이(Gist-Brocades, NV)); 다우 코닝 (미국 미시간주 미드랜드 소재의 다우 코닝 코포레이션(Dow Corning Corp.)); 메틀러-톨레도(Mettler-Toledo) (미국 오하이오주 콜럼버스 소재의 메틀러-톨레도 인크.(Mettler-Toledo Inc.)); 알비(RB) (영국 슬라우 소재의 레킷-벤키저(Reckitt-Benckiser)); 및 마이크로소프트(Microsoft) (미국 워싱턴주 레드몬드 소재의 마이크로소프트 인크.(Microsoft, Inc.)).

[0323] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 일부 목록에서, 맨 앞의 "0"은 각 부위에 대한 세자리수 명칭을 제공하기 위해 표시된다(예를 들어, "001"은 "1"과 같으므로, "A001C"는 "A1C"와 같다). 일부 목록에서, 맨 앞의 "0"은 포함되지 않는다. 또한, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "X"는 임의의 아미노산을 말한다.

[0324] 본 명세서에서 제공되는 예시적인 세제 조성물에서, 효소 수준은 총 조성물의 중량을 기준으로 순수한 효소로 표시되고, 달리 특정화되지 않는다면, 세제 성분은 총 조성물의 중량을 기준으로 표시된다. 본 명세서에서 약자로 된 성분 식별자는 하기의 의미를 갖는다:

약자	성분
LAS	: 소듐 선행 C ₁₄₋₁₅ 알킬 설페이트.
NaCl6-17HSAS	: 소듐 C ₁₆₋₁₇ 고 가용성 알킬 설페이트
TAS	: 소듐 텔로(tallow) 알킬 설페이트.
CxyAS	: 소듐 C ₁₂ - C ₁₉ 알킬 설페이트.
CxyEz	: 평균 x 붐의 에틸렌 옥사이드와 축합된 C ₁₂ - C ₁₉ 의 주로 선행인 일차 알코올.
CxyAEzS	: 평균 x 붐의 에틸렌 옥사이드와 축합된 C ₁₂ - C ₁₉ 소듐 알킬 설페이트. 실시예에서 추가된 분자 이름.
비이온성	: 혼합된 에톡실화/프로폭실화 지방 알코올, 예를 들어, 플루라팍(Plurafac) LF404는 3.8의 평균 에톡실화도 및 4.5의 평균 프로폭실화도를 갖는 알코올임.
QAS	: R ₃ N+(CH ₃) ₃ (C ₈ H ₁₇ OH), 여기서 R ₃ = C ₁₂ -C ₁₄
규산염	: 무정형 규산나트륨 (SiO ₂ :Na ₂ O 비 = 1.6-3.2:1).
메타규산염	: 메타규산나트륨 (SiO ₂ :Na ₂ O 비 = 1.0).
제올라이트 A	: 화학식 Na ₄₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ · 27H ₂ O의 수화된 알루미늄-규산염
SKS-6	: 화학식 δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ 의 결정질 중성 규산염.
황산염	: 무수 황산나트륨.
STPP	: 트라이폴리인산나트륨.
MA/AA	: 4:1 아크릴레이트/말레이드의 랜덤 공중합체, 평균 분자량이 약 70,000 내지 80,000.
AA	: 평균 분자량 4,500의 소듐 폴리아크릴레이트 중합체.
폴리카르복실레이트	: 아크릴레이트, 말레이드 및 테타아크릴레이트와 같은 카르복실화 단량체의 혼합물을 포함하는, MW이 2,000 내지 80,000 범위인 공중합체, 예컨대 아크릴산의 공중합체로서, MW이 4,500인 바스프로부터 구매가능한 소플란.
BB1	: 3-(3,4-다이하이드로아이스퀴놀리늄)프로판 설페이트
BB2	: 1-(3,4-다이하이드로아이스퀴놀리늄)-테트라-2-설페이트
PB1	: 과황산나트륨 일수화물.
PB4	: 공성 화학식 NaBO ₃ ·4H ₂ O의 과황산나트륨 사수화물.
과탄산염	: 공성 화학식 2Na ₂ CO ₃ ·3H ₂ O ₂ 의 과탄산나트륨.
TAED	: 테트라아세틸 에틸렌 다이아민.
NOBS	: 나트륨 염 형태의 노나노일옥시벤젠 설페이트.
DTPA	: 다이에틸렌 트리아민 펜타아세트산.
HEDP	: 1,1-하이드록시에탄 다이포스폰산.
DETPMP	: 상용형 디렉트(Dequest) 2060으로 몬산토에 의해 판매되는 다이에틸트리아민 펜타 (에틸렌) 포스폰레이트.
EDDS	: 나트륨 염 형태의 에틸렌다이아민-N,N'-다이설파산, (S,S) 이성체
다이아민	: 다이에틸 아미노프로판 아민, 1,6-헥산 다이아민, 1,3-프로판 다이아민, 2-메틸-1,5-펜탄 다이아민, 1,3-펜탄다이아민, 1-메틸-다이아미노프로판.
DETBCHD	: 5, 12-다이에틸-1,5,8,12-테트라아자바사이클로 [6,6,2] 헥사헵탄, 다이클로라이드, Mn(II) 염
PAAC	: 펜타아민 아세테이트 코발트(III) 염.
과라민	: 상용명 윈노그(Winog) 70으로 민타칼에 의해 판매되는 과라민 오일.
과라민 설페이트	: 수소 원자 중 일부가 설페이트 기로 치환된 과라민 오일 또는 왁스.
알도스 옥시다제(Aldose oxidase)	: 상용명 알도스 옥시다제로 노보자임스 에이/에스에 의해 판매되는 옥시다제 효소
갈락토스 옥시다제	: 시그마로부터의 갈락토스 옥시다제
nprE	: <i>바실러스 서브틸리스</i> 에서 발견되는 중성 금속지방분해 효소의 제조형 형태(예를 들어, WO 07/044993 호 참조)
PMN	: 바실러스 아밀로리케파시엔츠(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)로부터의 정제된 중성 금속지방분해 효소
아밀라제	: 적합한 녹말분해 효소, 예를 들어, WO 94/18314 호, WO96/05295 호에 기재되고, 제넨코르에 의해 상표명 퓨라펙트® Ox; 및 모두가 노보자임스 에이/에스로부터 입수가능한 나탈라제(NATALASE)®, 터미널®, 핀자일® 및 듀라일™으로 판매되는 것들.
리파제	: 적합한 지방분해 효소, 예를 들어, 노보자임스 에이/에스에 의해 상표명 리펙스(LIPEX)®, 리포라제(LIPOPASE)®, 리포라제® 울트라 및 지스트-브로케이즈에 의해 리포렉스™으로 판매되는 것들.
셀룰라제	: 적합한 셀룰로오스분해 효소, 예를 들어, 본 출원인 것들을 추가하여, 노보자임스 에이/에스에 의해 상표명 케어자임®, 셀루자임®, 및/또는 엔돌라제(ENDOLASE)®로 판매되는 것들.
펙틴 라아제	: 적합한 펙틴 라아제, 예를 들어, 노보자임스 에이/에스로부터 입수가능한 상표명 펙타웨이(PECTAWAY)® 및 펙타워시(PECTAWASH)®로 판매되는 것들.
PVP	: 평균 분자량이 60,000인 폴리비닐피롤리돈
PVNO	: 평균 분자량이 30,000인 폴리비닐피롤리돈-N-옥사이드.
PVPVI	: 평균 분자량이 20,000인, 비닐이미다졸과 비닐피롤리돈의 공중합체.
중백제 1	: 다이소플 4,4'-비스(2-설포스티릴)바이페닐.
실리콘 폼 방지제	: 분산제로서 실록산-옥시알킬렌 공중합체를 갖는 폴리다이메틸실록산 폼 제어제, 여기서 상기 거품 제어제 대상기 분산제의 비가 10:1 내지 100:1임.
거품 억제제	: 12% 실리카/실리카, 18% 스테아릴 알코올, 70% 과일형 전분.
SRP 1	: 음이온성으로 탈안이 접착된 폴리 에스테르.
PEG X	: 분자량이 x인 폴리에틸렌 글리콜.
PVP K60 ®	: 비닐피롤리돈 단일공중합체 (평균 MW 160,000)
제라민(Jeffamine) ® ED-2001	: 헥트엔으로부터의 접착된 폴리에틸렌 글리콜
아이사켄(Isachem) ® AS	: 에너제로부터의 분지형 알코올 알킬 설페이트
MME PEG (2000)	: 플루카 케미 아게로부터의 모노메틸 에테르 폴리에틸렌 글리콜 (MW 2000).
DC3225C	: 실리온 거품 억제제, 다우 코닝으로부터의 실리온 오일과 실리카의 혼합물.
TEPAE	: 테트라에틸렌디아민 에톡실레이트.
BTA	: 벤조트리아아졸.
메타인	: (CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ COO ⁻
당	: 산업 등급 D-글루코스 또는 식품 등급 당
CFAA	: C ₁₂ -C ₁₄ 알킬 N-메틸 글루카미드.
TPKFA	: C ₁₂ -C ₁₄ 상층 전체 정단된 (topped whole cut) 지방산
결토	: 일만식 Al ₂ O ₃ ·SiO ₂ ·xH ₂ O의 수화 규산알루미늄. 유형: 카올리나이트, 몬트모릴로나이트, 아타카사이트, 일라이트, 벤토나이트, 할로사이트.
pH	: 20 °C에서 증류수 내의 1% 용액으로 측정됨.

[0325]

[0326]

북아메리카(NA) 및 서유럽(WE)의 강력 액체 세탁(HDL) 세제의 경우, 구매가능한 세제에 존재하는 효소의 열 불활성화는 미리 칭량된 (유리병 내의) 액체 세제를 수조 내에 95°C에서 2시간 동안 놓아둠으로써 수행된다. NA 및 WE의 자동 식기 세척(ADW) 세제의 열 불활성화를 위한 인큐베이션 시간은 8시간이다. 비활성화된 백분율을 정확하게 결정하기 위해, 비가열된 세제 및 가열된 세제 둘 모두가 세제 용해 후 5분 이내에 검정된다. 효소 활성은 AAPF 검정법으로 시험된다.

[0327]

열 비활성화된 세제에서 효소 활성을 테스트하기 위해, 세제의 작업 용액을 열 비활성화된 스톡(stock)으로부터 제조한다. 적합한 양의 물 경도(예를 들어, 6 gpg 또는 12 gpg) 및 완충제를 세제 용액에 첨가하여 원하는 조건에 매칭시킨다. 병을 와동(vortex)시키거나 역전시켜서 용액들을 혼합한다. 하기 표는 구매가능한 세제 및 본 발명에서 사용된 테스트 조건의 일부에 관한 정보를 제공한다. 일부 실험에서, 추가적인 그리고/또는 기타 구매가능한 세제가 하기 실시예에서 사용된다.

[0328]

[표 a]

세탁물 및 식기 세척 조건

지역	형태	투여량	세제*	완충제	Gpg	pH	T (°C)
세탁 (강력 액체 및 과립)							
NA	HDL	0.78 g/l	피앤지 타이드(TIDE)® 2X	5 mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0 g/L	헨켈 퍼실(Henkel PERSIL)™	5 mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0 g/L	피앤지 아리엘(ARIEL)®	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7 g/L	피앤지 타이드®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
NA	HDG	1.0 g/L	피앤지 타이드®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
자동 식기 세척							
WE	ADW	3.0 g/L	RB 칼고니트(CALGONIT)™	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3.0 g/L	피앤지 캐스캐이드(CASCADE)®	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

[0329]

[0330]

일부 추가 실시예에서, 하기 용액들이 사용된다:

[0331]

[표 b]

작업 세척 용액

세제	온도 (C)	세제 g/L	pH	완충제	Gpg
타이드® 2X 폴드	16	0.98	8	5mM HEPES	6
타이드® 2X 폴드	32	0.98	8	5mM HEPES	6
타이드® 2X 폴드	16	0.98	7	5mM MOPS	6

[0332]

[0333]

표 C는 페브릭을 세탁하는 데 적합한 본 발명에 따라 생산된 과립 세탁 세제 조성물을 제공한다.

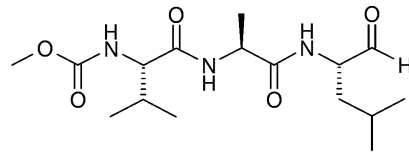
[0334]

[표 c]

과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분

성분	세제 조성물					
	1	2	3	4	5	6
지방족 탄소 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 선형 알킬벤젠설포네이트 15	12	20	10	12	13	
기타 계면활성제	1.6	1.2	1.9	3.2	0.5	1.2
포스페이트 증강제(들)	2	3	4			
제올라이트		1		1	4	1
실리카이트	4	5	2	3	3	5
탄산나트륨	2	5	5	4	0	3
폴리아크릴레이트 (MW 4500)	1	0.6	1	1	1.5	1
카르복시메틸 셀룰로오스 (씨피켈코(CPKelco)로부터의 핀픽스(Finnfix) BDA)	1	-	0.3	-	1.1	-
셀룰린(Celluclean)® (15.6mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
리파제 (20mg/g)	0.2		0.1		0.3	
스테인자임 플러스® (14mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
만나웨이(Mannaway) 4.0T (4mg/g)	0.1			0.1		0.1
형광 증백제(들)	0.16	0.06	0.16	0.18	0.16	0.16
다이에틸렌트리아민 펜타아세트산 또는 에틸렌 다이아민 테트라아세트산	0.6		0.6	0.25	0.6	0.6
MgSO ₄	1	1	1	0.5	1	1
표백제(들) 및 표백 활성제(들)	6.88		6.12	2.09	1.17	4.66
에톡실화 티오펜 색조화 염료 ⁵	0.002	0.001	0.003	0.003	-	-
시바 스펙셜티 케미칼스로부터의 다이렉트 바이올렛(Direct Violet) 9				0.0006	0.0004	0.0006
설페이트/시트르산/중탄산나트륨/수분/향료	100%로 맞춤					

- ¹ 랜덤 그래프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트 측쇄를 갖는, 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000 이고, 폴리에틸렌 옥사이드 데 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 내지 60 이고, 50 개의 에틸렌 옥사이드 단위 당 그래프팅 점(grafting point)은 1 개 이하이다.
- ² -NH 당 20 개의 에톡실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600).
- ³ 양친매성 알록실화 그리스(grease) 세정 중합체는 -NH 당 24 개의 에톡실레이트 기를 및 -NH 당 16 개의 프로톡실레이트 기들을 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600)이다.
- ⁴ 구조의 가역적 지방분해 효소 억제제:



[0335]

⁵ 에톡실화 티오펜 색조화 염료는 미국 특허 제 7,208,459 B2 호에 기재되어 있다.

[0336]

표 C에서, 제품에 추가된 활성 단백질의 %로 표시된 (본 발명의) 지방분해 효소를 제외하고, 모든 효소 수준을 %효소 원료로 나타내었다.

[0337]

표 D는 상부에서 로딩하는 방식의 자동 세탁기(세제 조성물 7 내지 9) 및 전방에서 로딩하는 방식의 세탁기(세제 조성물 10 및 11)에 적합한 과립 세탁 세제 조성물을 제공한다. 본 발명의 지방분해 효소 및/또는 테스트된 지방분해 효소 변이체는 세정 액체에서의 최종 농도가 0.01ppm 내지 10ppm이 되도록 개별적으로 이들 제형에 첨가된다.

[0338] [표 d]

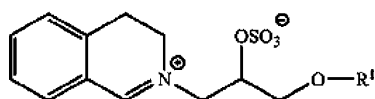
과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분

성분	세제 조성물				
	7	8	9	10	11
계면활성제					
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬 설페이트	3.55	15.8			
C ₁₂₋₁₄ 알킬 설페이트			1.5		
지방족 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 소듐 선형 알킬벤젠설포네이트	9.6		10.6	7.5	9
소듐 C _{14/15} 알코올 에톡시-3- 설페이트	1.15			2.88	
소듐 C _{14/15} 알킬 설페이트	2.37				
평균 7 볼의 에톡실화를 갖는 C _{14/15} 알코올 에톡실레이트				1.17	1
모노-C ₈₋₁₀ 알킬 모노-하이드록시에틸 다이-메틸 4 차 암모늄 클로라이드					0.45
다이 메틸 하이드록실 에틸 라우릴 암모늄 클로라이드			0.18		
제올라이트 A	13.9	4.7	0.01	2.9	1.8
규산나트륨 1.6.비	4	0.2		4	4
규산나트륨 2.35.비			8		
시트르산				2.5	1.4
트라이폴리인산나트륨			5		
탄산나트륨	24.1	30	16.9	24.4	21
노노알옥시벤젠설포네이트	5.78	2.81	0.96		
옥사지리디늄계 표백 부스터				0.03	0.017
테트라소듐 S,S-에틸렌다이아민다이석시네이트				0.2	
다이에틸렌트리아민 펜타 (메틸렌 포스폰산), 칠나트륨 염	0.61				0.33
하이드록시에탄 다이메틸렌 포스폰산				0.29	0.45
에틸렌 다이아민 테트라아세테이트			0.27		
MgSO ₄			0.47	0.5994	0.782
과탄산나트륨	7	4.4		15.9	19.1
테트라 아세틸 에틸렌 다이아민				3.3	4.6
과탄산나트륨 일수화물			1.2		
카르복시메틸 셀룰로오스 (예를 들어, 씨피켈코로부터의 퀴넥스 BDA)	0.1		0.17	1.69	0.23
소듐 아크릴산/말레인 공중합체 (70/30)	0.0236	3.8		2	2.5
소듐 폴리아크릴레이트 (소칼란 PA30 CL)	4		0.84		
테레프탈레이트 중합체				0.23	
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 랜덤 그래프트 공중합체			0.89	0.89	0.91
광표백제-아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트			0.005	0.001	0.002
C.I.형광 증백제 260	0.11	0.15	0.04	0.23	0.15
C.I.형광 증백제 351 (티노팔(Tinopal)® CBS)			0.1		
거품 억제제 과립		0.25		0.07	0.04
소수성으로 개질된 카르복시 메틸 셀룰로오스(퀴넥스® SH-1)			0.019	0.028	
벤토나이트			8.35		
기타(염료, 향료, 가공 보조제, 수분 및 황산나트륨)	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지

[0339]

[0340]

표 D에서, 계면활성제 성분은 임의의 적합한 공급자로부터 얻을 수 있으며, 이는 바스프(예를 들어, 루텐솔®), 쉘 케미칼스, 스테판, 헨츠만, 및 클라리언트(예를 들어, 프레이파젠(PRAEPAGEN)®)를 포함하지만, 이로 제한되는 않는다. 제올라이트는 인더스트리얼 제올라이트(Industrial Zeolite)와 같은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 시트르산 및 소듐 시트레이트는 융브르라우어와 같은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 과탄산나트륨, 탄산나트륨, 중탄산나트륨 및 세스퀴탄산나트륨은 솔베이와 같은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 아크릴레이트/말레에이트 공중합체는 바스프와 같은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 카르복시메틸셀룰로오스 및 소수성으로 개질된 카르복시메틸 셀룰로오스는 씨피켈코와 같은 공급원으로부터 얻을 수 있다. C.I.형광 증백제 260은 쓰리브 이 시그마로부터 얻을 수 있다(예를 들어, 옵티블랑(OPTIBLANC)®, 옵티블랑® 2M/G, 옵티블랑® 2MG/LT 엑스트라(Extra), 또는 옵티블랑® 에코브라이트(Ecobright)). 테트라소듐 S,S-에틸렌다이아민 다이석시네이트는 이노스펙과 같은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 테레프탈레이트 공중합체는 클라리언트로부터 얻을 수 있다(예를 들어, 레펠로텍(REPELOTEX) SF 2). 또한, 1-하이드록시에탄 -1,1-다이포스폰산은 썸포스로부터 얻을 수 있다. 옥사지리디늄계 표백 부스터는 하기의 구조를 가지며, 여기서 R1 = 2-부틸옥틸이고, 미국 특허 출원 공개 제2006/0089284A1호에 따라 제조하였다.



[0341]

[0342]

효소 나탈라제®, 터마밀®, 스테인자임 플러스®, 셀룰클린® 및 만나웨이®는 노보자임스로부터 얻을 수 있다. 아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트는 시바 스펙셜티 케미칼스로부터 얻을 수 있다(예를 들어, 티놀럭스(TINOLUX)® BMC). 거품 억제제 과립은 다우 코닝으로부터 얻을 수 있다. 이들 세제 조성물에서, 랜덤 그래

프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트 측쇄를 갖는 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000이고, 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 내지 60이고, 50개의 에틸렌 옥사이드 단위 당 그래프팅 점은 1개 이하이다.

[0343] 표 E 내지 G는 세탁기에 적합한 추가 과립 세제 조성물(세제 36a 내지 36n)을 제공한다. 본 발명의 냉수 지방 분해 효소 또는 테스트된 GG36 지방분해 효소 변이체는 개별적으로 이들 제형에 첨가된다.

[0344] [표 e]

추가 과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분

성분	세제 조성물				
	36a	36b	36c	36d	36e
계면활성제					
C ₁₀ 비이온성				0.1843	
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬 설페이트	3.53	3.53	3.53		
C ₁₂₋₁₄ 알킬 설페이트					
지방족 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 소듐 선형 알킬벤젠설포네이트	8.98	8.98	8.98	13.58	14.75
소듐 C _{14/15} 알코올 에톡시-3-설페이트	1.28	1.28	1.28		
소듐 C _{14/15} 알킬 설페이트	2.36	2.36	2.36		
평균 7몰의 에톡실화를 갖는 C _{14/15} 알코올 에톡실레이트					
모노-C ₈₋₁₀ 알킬 모노-하이드록시에틸 다이-메틸 4 차 암모늄 클로라이드					
다이 메틸 하이드록실 에틸 라우릴암모늄 클로라이드				0.1803	
제올라이트 A	15.31	15.31	15.31		4.47
벤토나이트				8.35	
규산나트륨 1.6.비					0.16
규산나트륨 2.0.비	3.72	3.72	3.72	8.41	
규산나트륨 2.35.비					
시트르산				0.0066	
트라이폴리인산나트륨				5.06	
탄산나트륨	26.1	26.18	26.1	15.9	29.0
노나노일옥시벤젠설포네이트	5.78	5.78	5.78	1.17	1.86
옥사지리디늄계 표백 부스터	0.037	0.037	0.037		
테트라소듐 S,S'-에틸렌다이아민다이석시네이트					
다이에틸렌트라이아민 펜타 (메틸렌 포스폰산), 질나트륨 염	0.62	0.62	0.62		
하이드록시에틸 다이티렌 포스폰산					
에틸렌 다이아민 테트라아세테이트				0.2701	
MgSO ₄	0.056	0.056	0.056	0.47	
과탄산나트륨		7.06	7.06		3.64
테트라 아세틸 에틸렌 다이아민					
과붕산나트륨 일수화물				1.47	
카르복시메틸 셀룰로오스 (예를 들어, 씨피켈코로부터의 핀픽스 BDA)	0.38	0.38	0.38	0.173	
소듐 아크릴산/말레산 공중합체 (70/30)	3.79	3.78	3.79		3.64
소듐 폴리아크릴레이트 (소칼란 PA30 CL)	3.78	3.78	3.78	0.842	
테레프탈레이트 중합체					
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 랜덤 그래프트 공중합체				0.89	
광표백제-아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트					
C.I.형광 증백제 260	0.1125	0.1125	0.1125	0.043	0.15
C.I.형광 증백제 351 (티노팔® CBS)				0.0952	
거품 억제제 과립	0.015	0.015	0.015		0.031
소수성으로 개질된 카르복시 메틸 셀룰로오스(핀픽스® SH-1)					
벤토나이트					
기타 (염료, 향료, 가공 보조제, 수분 및 황산나트륨)	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지

[0345]

[0346]

[표 f]

추가 과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분

성분	세제 조성물				
	36f	36g	36h	36i	36j
계면활성제					
C ₁₀ 비이온성	0.1142	0.2894	0.1885	0.1846	0.1885
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬 설페이트					
C ₁₂₋₁₄ 알킬 설페이트					
지방족 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 소듐 선형 알킬벤젠설포네이트	12.94	15.69	9.01	8.42	9.51
소듐 C _{14/15} 알코올 에톡시-3-설페이트					
소듐 C _{14/15} 알킬 설페이트					
평균 7몰의 에톡실화를 갖는 C _{12/14} 알코올 에톡실레이트	2.9				
평균 3몰의 에톡실화를 갖는 C _{12/14} 알코올 에톡실레이트				2.44	
평균 7몰의 에톡실화를 갖는 C _{14/15} 알코올 에톡실레이트			0.97	1.17	0.97
모노-C ₈₋₁₀ 알킬 모노-하이드록시에틸 다이-메틸 4 차 암모늄 클로라이드			0.45		
다이 메틸 하이드록실 에틸 라우릴암모늄 클로라이드		0.195			0.45
제올라이트 A	2.01	0.39	1.83	2.58	0.59
규산나트륨 1.6.비			4.53	5.62	4.53
규산나트륨 2.0.비		10.1			
규산나트륨 2.35.비	7.05				
시트르산			1.4	1.84	1.0
트라이폴리인산나트륨		5.73			
탄산나트륨	12.65	15.93	21.0	27.31	20.2
노나노일옥시벤젠설포네이트		1.73			
옥사지리디닐계 표백 부스터			0.0168	0.0333	0.024
테트라소듐 S,S'-에틸렌다이아민다이석시네이트					
다이에틸렌트라이아민 펜타 (메틸렌 포스폰산), 질나트륨 염			0.327		0.3272
하이드록시에탄 다이메틸렌 포스폰산			0.45	0.2911	0.45
에틸렌 다이아민 테트라아세테이트		0.28		0.1957	
MgSO ₄		0.54	0.79	0.6494	0.793
과탄산나트륨			19.1	15.85	22.5
테트라 아세틸 에틸렌 다이아민			4.554	3.71	5.24
과붕산나트륨 일수화물		5.55			
카르복시메틸 셀룰로오스 (예를 들어, 씨피켈코로부터의 핀팩스 BDA)	0.62	0.21	0.23	1.07	0.2622
소듐 아크릴산/말레산 공중합체 (70/30)	0.40	2.61	2.5	2.00	1.75
소듐 폴리아크릴레이트 (소칼란 PA30 CL)			0.0055	0.011	0.008
테레프탈레이트 중합체				0.231	
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 랜덤 그래프트 공중합체	0.55	1.40	0.911	0.8924	0.911
광표백제-아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트					
C.I.형광 증백제 260	0.1174	0.048	0.1455	0.2252	0.1455
C.I.형광 증백제 351 (티노팔 @ CBS)		0.1049			
거품 억제제 과립			0.04	0.0658	0.04
소수성으로 개질된 카르복시 메틸 셀룰로오스(핀팩스 @ SH-1)					
벤토나이트					
기타 (염료, 향료, 가공 보조제, 수분 및 황산나트륨)	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지

[0347]

[0348]

[표 g]

추가 과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분

성분	세제 조성물				
	36k	36l	36m	36n	
계면활성제					
C ₁₀ 비이온성	0.1979	0.1979	0.1979	0.1979	
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬 설페이트					
C ₁₂₋₁₄ 알킬 설페이트					
지방족 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 소듐 선형 알킬벤젠설포네이트	8.92	8.92	11.5	11.5	
소듐 C _{14/15} 알코올 에톡시-3-설페이트	1.62	1.62	1.125	1.125	
소듐 C _{14/15} 알킬 설페이트					
평균 7몰의 에톡실화물 갖는 C _{14/15} 알코올 에톡실레이트	1.0	1.0	1.5	1.5	
모노-C ₈₋₁₀ 알킬 모노-하이드록시에틸 다이-메틸 4 차 암모늄 클로라이드					
다이 메틸 하이드록실 에틸 라우릴암모늄 클로라이드					
제올라이트 A	1.63	1.63	2.0	2.0	
규산나트륨 1.6.비	4.75	4.75	4.75	4.75	
규산나트륨 2.0.비			0.06	0.06	
규산나트륨 2.35.비					
시트르산	1.10	1.10	1.1	1.1	
트라이폴리인산나트륨					
탄산나트륨	23.3	23.3	23.3	23.3	
노나노일옥시벤젠설포네이트					
옥사자리다늄계 표백 부스터	0.021	0.021	0.015	0.015	
테트라소듐 S,S-에틸렌다이아민다이석시네이트	0.26	0.26	0.26	0.26	
다이에틸렌트라이아민 펜타 (메틸렌 포스폰산), 칠나트륨 염					
하이드록시에틸 다이메틸렌 포스폰산	0.47	0.47	0.47	0.47	
에틸렌 다이아민 테트라아세테이트					
MgSO ₄	0.83	0.83	0.82	0.82	
과탄산나트륨	19.35	19.35	19.35	19.35	
테트라 아세틸 에틸렌 다이아민	4.51	4.51	4.51	4.51	
과붕산나트륨 일수화물					
카르복시메틸 셀룰로오스 (예를 들어, 씨피켈코로부터의 원픽스 BDA)	1.01	1.01	1.01	1.01	
소듐 아크릴산/말레산 공중합체 (70/30)	1.84	1.84	1.84	1.84	
소듐 폴리아크릴레이트 (소칼란 PA30 CL)	0.007	0.007	0.005	0.005	
테레프탈레이트 중합체	0.179	0.179	0.179	0.179	
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 랜덤 그래프트 공중합체	0.96	0.96	0.96	0.96	
광표백제-아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트					
C.I.형광 증백제 260	0.153	0.153	0.171	0.171	
C.I.형광 증백제 351 (티노팔 © CBS)					
거품 억제제 과립	0.042	0.042	0.042	0.042	
소수성으로 개질된 카르복시 메틸 셀룰로오스(원픽스 © SH-1)					
벤토나이트					
기타 (염료, 향료, 가공 보조제, 수분 및 황산나트륨)	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지

[0349]

[0350]

표 E, F, G에서 세제 조성물 36 a 내지 36n에 대한 주:

[0351]

계면활성제 성분은 독일 루드빅스하펜 소재의 바스프(루텐솔®); 영국 런던 소재의 쉘 케미칼스; 미국 일리노이스주, 노스필드 소재의 스테판; 미국 유타주 솔트 레이크 시티 소재의 헌즈맨; 독일 쉘츠바흐 소재의 클라리언트(프레어파젠®)로부터 얻을 수 있다.

[0352]

제올라이트는 영국 에섹스, 그레이스 소재의 인더스트리얼 제올라이트(영국) 리미티드로부터 얻을 수 있다.

[0353]

시트르산 및 소듐 시트레이트는 스위스 바젤 소재의 용분츠라우어로부터 얻을 수 있다.

[0354]

과탄산나트륨, 탄산나트륨, 중탄산나트륨 및 세스퀴탄산나트륨은 벨기에 브뤼셀 소재의 솔베이로부터 얻을 수 있다.

[0355]

아크릴레이트/말레이트 공중합체는 독일 루드빅스하펜 소재의 바스프로부터 얻을 수 있다.

[0356]

카르복시메틸셀룰로오스 및 소수성으로 개질된 카르복시메틸 셀룰로오스는 네덜란드 아른헴 소재의 씨피켈코로부터 얻을 수 있다.

[0357]

C.I.형광 증백제 260은 이탈리아 베르가모 소재의 쓰리브이 시그마로부터 유틸블랑®, 유틸블랑® 2M/G, 유틸블랑® 2MG/LT 엑스트라, 또는 유틸블랑® 에코브라이트로서 얻을 수 있다.

[0358]

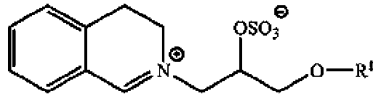
테트라소듐 S,S-에틸렌다이아민 다이석시네이트는 영국 엘즈미어 포트 소재의 이노스펙으로부터 얻을 수 있다.

[0359]

테레프탈레이트 공중합체는 클라리언트로부터 상품명 레펠로텍스 SF 2로 얻을 수 있다.

[0360] 1-하이드록시에탄 -1,1-다이포스포산은 네덜란드 블리싱겐-오우스트 소재의 썸포스로부터 얻을 수 있다.

[0361] 옥사지리디늄계 표백 부스터는 하기의 구조를 가지며, 여기서 R1 = 2-부틸옥틸이고, 미국 특허 출원 공개 제 2006/0089284A1호에 따라 제조하였다.



[0362] 효소 나탈라제®, 터마밀®, 스테인자임 플러스®, 셀룰클린® 및 만나웨이®는 덴마크 백스베어드 소재의 노보자임스로부터 얻을 수 있다.

[0364] 아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트는 스위스 바젤 소재의 시바 스페셜티 케미칼스로부터 티노릭스® BMC로서 얻을 수 있다.

[0365] 거품 억제제 과립은 영국 배리 소재의 다우 코닝으로부터 얻을 수 있다.

[0366] 랜덤 그래프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트 측쇄를 갖는 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000이고, 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 내지 60이고, 50개의 에틸렌 옥사이드 단위 당 그래프팅 점은 1개 이하이다.

[0367] **실시예 1**

[0368] **방법**

[0369] 하기 검정법이 아래에 기재되는 실시예에서 사용되는 표준 검정법이다. 종종, 특정 프로토콜은 이들 표준 검정법으로부터 변형을 필요로 한다. 이들 경우에, 아래의 이러한 표준 검정 프로토콜로부터의 변형이 실시예에서 확인된다.

[0370] **A. 성능 지수**

[0371] 효소의 성능 지수(PI)는 동일 단백질 농도에서 변이체의 성능(측정된 값)과 표준 효소의 성능(이론적 값 또는 측정된 값)을 비교한다. 또한, 이론적 값은 표준 효소의 랭뮤어(Langmuir) 방정식의 파라미터를 사용하여 계산될 수 있다.

[0372] 1 초과인 성능 지수(PI)(PI>1)는 표준(예를 들어, TLL, 서열 번호 2)과 비교할 때 변이체에 의해 향상된 성능을 나타내는 한편, 1의 PI(PI=1)는 표준과 동일한 성능을 갖는 변이체를 나타내고, 1 미만의 PI(PI<1)는 표준보다 나쁜 성능을 갖는 변이체를 나타낸다.

[0373] **B. p-니트로페닐 에스테르 가수분해 검정법**

[0374] TLL 변이체의 사슬 길이 선호도를 측정하기 위해, 다양한 알킬 사슬 길이를 갖는 세 개의 상이한 파라-니트로페닐(pNP) 에스테르 기질들 상에서의 리파제 활성에 대해 TLL 변이체를 검정한다. 표 1-1은 pNP 에스테르 기질의 상세 사항을 제공한다.

[0375] [표 1-1]

pNP 에스테르 기질			
기질	약어	사슬 길이	공급원
p-니트로페닐 부티레이트	pNPB	C4	시그마 (CAS 2635-84-9)
p-니트로페닐 카프릴레이트 (옥타노에이트)	pNPO	C8	플루카 (CAS 1956-10-1)
p-니트로페닐 팔미테이트	pNPP	C16	시그마 (CAS 1492-30-4)

[0376] pH 8.2로 조절된 0.05 M HEPES 또는 pH 6.0으로 조절된 0.05 M MES 중에서 에탄올 중에 (5%) 예비-현탁된 0.8 mM pNP 에스테르를 사용하여 pNP 에스테르 기질을 갖는 반응 에멀전을 제조한다.

[0378] pNP-에스테르/완충제 현탁액을 혼합하고 총 부피 200 µL의 효소 샘플을 함유하는 96-웰(well) 미세적정 플레이트(MTP)로 전달한다. 선형 범위 내에서 반응을 유지하기 위해, 효소 샘플의 희석 및 그의 전달 부피를 조절한다.

다. OD₄₀₅ nm에서 3분에 걸쳐 유리된(liberated) pNP의 생성을 모니터링하고 블랭크 값(blank value)(효소 없음)을 사용하여 이를 보정한다. 초 당 생성된 pNP 생산물을 pNP 표준 곡선을 사용하여 계산한 후, 웰 내의 첨가된 효소 샘플에 대해 정규화한다(첨가된 mg 효소 당 $\mu\text{mol pNP/s}$). pH 6.0에서 *p*-니트로페닐 카르틸레이트를 사용하는 경우, pNP-에스테르/완충제 현탁액을 혼합하고 총 부피 150 μL 의 효소 샘플을 함유하는 96-웰 미세적정 플레이트(MTP)로 전달한다. 플레이트를 밀봉하고, 25°C에서 iEMS 진탕기(써모 사이언티픽(Thermo scientific))에서 900 rpm으로 10분 동안 진탕한다. 인큐베이션 후, 0.5% 트라이톤 X-100을 포함하는 50 μl 의 0.2 M HEPES, pH 8.2를 첨가한다. 유리된 pNP의 생성을 OD₄₀₅ nm에서 관독하고 블랭크 값(효소 없음)을 사용하여 보정한다.

[0379] 특정 pNP 에스테르 기질 상에서의 변이 효소의 가수분해를 TLL 효소(서열 번호 2)의 가수분해와 비교함으로써 가수분해에 대한 성능 지수를 결정한다.

[0380] **C. 세제 안정성 검정법**

[0381] 승온에서 타이드 냉수용 액체(미국, 피엔지; 열처리됨)로서 상업적으로 공지된 강력 액체(HDL) 세제의 10% (v/v) 용액에서 변이체에 스트레스를 가함으로써 TLL 변이체의 가속된 세제 안정성을 모니터링한다.

[0382] 리파제의 생 발효물을 96-웰 PCR 플레이트에서 타이드 냉수용 액체의 10% (v/v) 용액으로 50배 희석한다. 혼합 후, 7.5 μL 를 192.5 μL 의 pNP 옥타노에이트 기질을 함유하는 96 웰 플레이트의 웰로 전달하고, B에 기재된 바와 같이 활성을 측정하여 스트레스를 가하지 않은 값을 생성한다.

[0383] PCR 플레이트를 밀봉하고 PCR 기계에서 41°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션을 완료한 후, 활성을 다시 측정하기 전에 플레이트를 4°C에서 3분 동안 냉각한다. 15 μl 의 인큐베이션된 혼합물을 185 μl 의 pNP 옥타노에이트/완충제 현탁액을 함유하는 96 웰 플레이트로 전달함으로써 변이 효소의 활성을 결정하고, 섹션 B에 기재된 바와 같이 활성을 측정하여 스트레스를 가한 값을 생성한다.

[0384] 세제 안정성에 대한 성능 지수를, 변이 효소에 스트레스를 가한 경우 대 스트레스를 가하지 않은 경우의 활성 비를 TLL 효소(서열 번호 2)의 것과 비교함으로써 결정한다.

[0385] **D. 열안정성 검정법**

[0386] 승온에서 1 ppm의 서브틸리신 BPN'-Y217L 프로테아제를 함유하는 50 mM HEPES, pH 8.2에서 변이체에 스트레스를 가함으로써 TLL 변이체의 가속된 열안정성을 모니터링한다. 프로테아제를 함유하는 80 μL 의 50 mM HEPES, pH 8.2를 20 μL 의 효소 샘플을 함유하는 96-웰 PCR 플레이트 웰로 전달한다. 혼합 후, 2 μl 의 완충제/리파제 혼합물을 198 μl 의 pNP 옥타노에이트/완충제 현탁액을 함유하는 96 웰 플레이트로 전달함으로써 변이 효소의 활성을 결정하고, 섹션 B에 기재된 바와 같이 활성을 측정한다.

[0387] PCR 플레이트를 밀봉하고 PCR 기계에서 64°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 활성을 측정하기 전에 플레이트를 4°C에서 3분 동안 냉각한다. 4 μl 의 인큐베이션된 혼합물을 196 μl 의 pNP 옥타노에이트/완충제 현탁액을 함유하는 96 웰 플레이트로 전달함으로써 변이 효소의 활성을 결정하고, 섹션 B에 기재된 바와 같이 활성을 측정한다.

[0388] 가열 후 효소 활성을 가열 전 효소 활성으로 나눈 값을 기초로 열안정성 활성 비를 계산하고 잔여 활성 백분율로 나타낸다. 가속된 열안정성에 대한 성능 지수를, 변이 효소의 활성 비를 유사하게 처리된 TLL 효소(서열 번호 2)의 것과 비교함으로써 결정한다.

[0389] **D. LAS-안정성 검정법**

[0390] TLL 변이체의 가속된 LAS (선형 알킬벤젠 설포네이트, 특히 소듐 도데실 벤젠 설포네이트, 시그마 카탈로그 번호 289957) 안정성을 HEPES 완충제, pH 8에 희석된 0.1% LAS에서 변이체에 스트레스를 가함으로써 모니터링한다.

[0391] pH 8.2의 80 μL 의 0.1% LAS (w/v)를 20 μL 의 효소 샘플을 함유하는 96-웰 PCR 플레이트 웰로 전달한다. 혼합 후, 2 μl 의 완충제/리파제 혼합물을 198 μl 의 pNP 옥타노에이트/완충제 현탁액을 함유하는 96 웰 플레이트로 전달함으로써 변이 효소의 활성을 결정하고, 섹션 B에 기재된 바와 같이 활성을 측정한다.

[0392] PCR 플레이트를 밀봉하고 PCR 기계에서 25°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 활성을 측정하기 전에 플레이트를 4°C에서 3분 동안 냉각한다. 4 μl 의 인큐베이션된 혼합물을 196 μl 의 pNP 옥타노에이트/완충

제 현탁액을 함유하는 96 웰 플레이트로 전달함으로써 변이 효소의 활성을 결정하고, 섹션 B에 기재된 바와 같이 활성을 측정한다.

[0393] LAS에서의 인큐베이션 후의 효소 활성을 LAS 부재 하에서의 효소 활성으로 나눈 값을 기초로 하여 LAS-안정성 활성 비를 계산하고, 잔여 활성 백분율로 나타낸다. LAS-안정성에 대한 성능 지수를, 변이 효소의 활성 비를 유사하게 처리된 TLL 효소(서열 번호 2)의 것과 비교함으로써 결정한다.

[0394] **E. CS-61 마이크로스와치 검정법**

[0395] 리파제 변이체의 세정 성능을 마이크로스와치 검정법으로 테스트한다. 쇠고기 지방 및 적색 염료로 염색된, 예비-염색된 코튼 스와치(cotton swatch)인, CS-61 스와치(네덜란드 소재의 센터 포 테스트머티리얼(Center for Testmaterial), CFT)를 96-웰 플레이트 포맷에서 사용한다. 스와치를 5 mm 직경의 조각으로 자르고 MTP의 각각의 웰 내에 놓는다. 리파제 변이체의 성능을 하기의 3가지 세제 배경에서 테스트한다: 전 투여량 타이드 냉수용 액체(95°C에서 3시간 동안 열처리됨, 최종 투여량: 0.92 g/l), 반 투여량 타이드 냉수용 액체(95°C에서 3시간 동안 열처리됨, 최종 투여량: 0.46 g/l) 및 보조제(n-도데실-β-D-말토피라노시드)가 더해진 반 투여량 타이드 냉수용 액체(95°C에서 3시간 동안 열처리됨)(최종 투여량, 세제: 0.46 g/L, 보조제: 0.272 μM).

[0396] 테스트되는 리파제 변이체의 샘플을 밀리포어 여과된, MTP 플레이트에서 성장된 배양물의 배양 브로쓰로부터 얻는다. 사용된 완충액은 20 mM HEPES (최종 농도) pH 8.2이고 물 경도는 6 gpg 2:1 Ca:Mg로 조절된다.

[0397] (위에 기재된) HDL 세제 용액의 247.5 μl 부피를 96-웰 플레이트의 각각의 스와치-함유 웰에 첨가한다. 반응을 개시하기 위해, 효소 샘플을 각각의 웰 내에 3.5 μL의 부피로 첨가한다. 플레이트를 밀봉하고, 30°C에서 iEMS 진탕기(써모 사이언티픽)에서 900 rpm으로 30분 동안 진탕한다. 인큐베이션 후, 패브릭을 하이드로스피드 플레이트 세척기(Hydrospeed plate washer)(오스트리아 소재의 테칸(Tecan))를 사용하여 탈이온수로 3회 행구고 50°C에서 밤새 건조한다. 스캐너(마이크로텍 스캔 메이커(MiCrotek Scan Maker) 900)로 받아들인, 행귀지고 건조된 패브릭의 RGB 측정치를 사용하여 얼룩 제거를 정량화한다. 포토샵(Photoshop) CSII로 이미지를 불러오며, 여기서 레인디어 그래픽스(Reindeer Graphics)로부터의 IPTK 5.0을 사용하여 스와치 포함 영역으로부터 RGB 값을 추출한다. 하기 식을 사용하여, 세척된 패브릭의 %오염 제거(SRI) 값을 세척되지 않은 패브릭에 대해 계산한다:

[0398] $\%오염\ 제거(SRI) = (\Delta E / \Delta E_{initial}) * 100$

[0399] 여기서,
$$\Delta E = \sqrt{(R_{after} - R_{before})^2 + (G_{after} - G_{before})^2 + (B_{after} - B_{before})^2}$$

[0400] 여기서,
$$\Delta E_{initial} = \sqrt{(R_{white} - R_{before})^2 + (G_{white} - G_{before})^2 + (B_{white} - B_{before})^2}$$

[0401] 변이 효소의 SRI를 변이체와 동일한 효소 투여량에서의 TLL 표준 효소(서열 번호 2)의 SRI와 비교함으로써 세정 성능에 대한 성능 지수를 계산한다. 변이체와 동일한 효소 투여량에서 TLL에 대한 SRI가 얼마인지를 계산하기 위해 랭뮤어 핏(Langmuir fit)을 사용한다.

[0402] **F. 세제**

[0403] 구매가능한 세제를 사용한다:

[0404] 타이드 냉수용 액체(피엔지). 2010년 8월에 상업적으로 구매되고 제품 제형에서 효소를 비활성화하기 위해 (95°C에서 3시간) 열처리됨.

[0405] **G. 단백질 결정 검정법**

[0406] 형광 여기 전이 면역분석법(fluorescent excitation transfer immunoassay)을 사용하여 MTP 플레이트에서 성장된 배양물의 여과된 발효물 브로쓰에 대한 TLL 변이체의 단백질 농도를 결정한다. 플루오레세인 방출이 소멸(quench)되는 항원-항체 비로, 플루오레세인-표지된 TLL 항원을 로다민-표지된 항-TLL 토끼 항체와 혼합한다. TLL 변이체 단백질은, 혼합물에 첨가되는 경우, 표지된 항-TLL 항체로의 결합에 대해 경쟁할 것이고 이는 플루오레세인 방출의 증가를 초래한다. 플루오레세인 방출의 증가는 TLL 변이체 단백질 농도에 정비례한다.

[0407] 20 μl의 여과된 TLL 변이체 발효물 브로쓰를 140 μl의 인산염 완충 식염수를 함유하는 흑색의 편평바닥의 96-

웰 플레이트로 전달하고 혼합한다. 이후, 각각 20 μ l의 플루오레세인-표지된 TLL 및 로다민-표지된 항-TLL 토끼 항체를 플레이트로 전달하고 혼합한다. 실온의 암소(dark)에서 30분 인큐베이션 후, 각 웰의 형광을 495 nm의 여기 파장(excitation wavelength) 및 520 nm의 방출 파장을 사용하여 측정한다. TLL 효소 표준(서열 번호 2)에 대한 플루오레세인 방출의 선형 핏(linear fit)을 사용하여 각각의 TLL 변이체에 대한 단백질 농도를 결정하였다.

[0408] 실시예 2

[0409] *써모마이세스 라누기노수스* 유래 리파제-3의 클로닝 및 *바실러스 서브틸리스*에서의 발현

[0410] *써모마이세스 라누기노수스* 리파제-3(TLL)은 PDB:1DT3으로서 제시된 성숙 리파제의 아미노산 서열을 갖는 리조무코르 미하이 리파제 유사체(리파제 엔지니어링 데이터베이스, www.led.uni-stuttgart.de)인 패밀리 abH23.01에 해당한다.

[0411] TLL 합성 유전자(서열 번호 1)를 TLL의 아미노산 서열을 기초로 하여 *B. 서브틸리스*에서 발현되도록 설계하였다. TLL 유전자를 *aprE* 프로모터, *aprE* 신호 서열 및 BPN' 서브틸리신 유전자(*B. 아밀로리쿠에파시엔스*) 종결자를 포함하는 BmtI-HindIII 단편으로서 증식성 pBN계 *바실러스* 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다(문헌 [Babé et al. (1998), Biotechnol. Appl. Biochem. 27: 117-124]). 합성 유전자와 이러한 벡터의 연결(ligation)로 TLL 폴리펩티드의 N-말단이 발현 벡터에 의해 암호화된 *B. 서브틸리스* AprE 프로-펩티드의 세 번째 아미노산에 융합되었다(pBN계 벡터에서, 신호 펩티드의 -2 아미노산은 BmtI 부위를 도입하도록 미리 돌연변이되었음). 숙주에서 천연 신호 펩티다제를 절단한 후, 이러한 방식으로 생산된 재조합 TLL 단백질은 그의 아미노-말단에 세 개의 추가적인 아미노산들(Ala-Gly-Lys)을 갖는다. 예측된 신호 절단 부위는 시그널 P(SignalP)-NN 시스템에 설정된 시그널 P 3.0 프로그램(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)에 의해 결정되었다(문헌[Emanuelsson et al., (2007), Nature Protocols, 2: 953-971]).

[0412] *B. 서브틸리스*에서의 TLL 유전자의 발현을 위해, pHY300PLK계 벡터(타카라)를, 올리고뉴클레오티드 카세트 (5'-AATTCATCGATGCATAAAAAACGCCGGCGGCAACCGAGCGTTTTTATTAGAAATCCCTTTGAGAATGTTTATATACATTC AAG (서열 번호 6)와 어닐링된 5'-GTTACCTGAATGTATATAAACATTCTCAAAGGGATTCTAATAAAAAACGCTCGGTTGCCCGGGCGTTTTTATGCATCGATGG (서열 번호 5))를 pHY300PLK계 벡터의 BstEII 및 EcoRI 부위로 연결하여 테트라사이클린 유전자의 뒤에 도입된 전사 종결자와 함께 사용하였다.

[0413] 이후, pBN계 벡터로부터의 전체 TLL 발현 카세트를, BamHI-HindIII 링커(5'-AGCTCAGGCAGTCAG(서열 번호 8)와 어닐링된 5'-GATCTGACTGCCTG(서열 번호 7))를 사용하여, EcoRI-BamHI 단편으로서 이 pHY300PLK계 벡터의 EcoRI 및 HindIII 부위로 클로닝하였으며, 이는 클로닝 후에 pHY300PLK계 벡터 내의 원래의 HindIII 부위를 제거한다. 생성된 벡터를 pHYT-TLLwt로 명명하였다(도 2-1).

[0414] 서열 번호 1은 합성 TLL 유전자의 뉴클레오티드 서열을 제시한다:

```
GCTAGCGCAGCTGGCAAAGAAGTTAGCCAAGATCTGTTCAACCAATTC AACCTTTTCGCTCA
ATACTCTGCAGCTGCTTACTGCGGAAAGAACAACGATGCACCTGCTGGTACTAACATCACTT
GCACAGGTAACGCATGTCCTGAAGTAGAAAAAGCTGATGCTACATTTCTTTACTCTTTTGAA
GATAGCGGCGTCGGCGATGTTACCGGTTTCTTAGCTCTGGATAACACAAAACAACTTATCGT
CCTTAGCTTCAGAGGCTCTCGCTCAATCGAAAACGGATCGGTAACCTTAATTTTACTTGA
AAGAAATCAACGATATCTGCTCTGGTTGCCGTGGCCATGACGGATTACATCATCTTGGAGA
AGCGTCGCAGACAGCTTCGCCAAAAAGTAGAAGATGCCGTACGCGAACACCCAGATTACA
GAGTAGTTTTTACAGGTCACTCTCTTGGCGGAGCTTTAGCAACAGTAGCAGGCGCTGATCTC
CGCGGTAACGGATACGACATTGATGTCTTCTTACGCGCTCCGCGGTCGGTAACAGAGC
GTTTGCTGAATTTTAACTGTACAAAACAGGCGGAACCTTTATCGCATCACTCACACAAACG
ATATTGTCCCGCTTACCTCCGAGAGAATTTGGTTACTCACACAGCTCTCCTGAATACTGG
ATCAAAAAGCGGTACATTGGTACCTGTTACTCGAAACGATATCGTCAAAAATTGAAGGAATTG
ACGCCACCGGCGCAACAACCAACGAACATCCCTGACATCCCGGCACACCTTTGGTACTTC
GGCTTAATCGGAACATGCCTTTAAAAGCTT
```

[0415] 서열 번호 2는 발현 플라스미드 pHYT-TLLwt로부터 생산된 TLL의 아미노산 서열(시그널 P에 의해 예측된 절단 부

위인 AprE 신호 서열에 밑줄을 칩)을 제시한다:

MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSASAAGKEVSQDLFNQFNLFQAQYSAAYCGKNNNDAPAG
 TNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLNF
 LKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADL
 RGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQTGGTLYRITHNTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWIKS
 GTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNIPDIPAHLWYFGLIGTCL

[0417]

[0418] 서열 번호 3은 세 개의 아미노산 아미노-말단 연장을 갖는 발현 플라스미드 pHYT-TLLwt로부터 생산된 TLL 성숙 단백질의 아미노산 서열을 제시한다:

AGKEVSQDLFNQFNLFQAQYSAAYCGKNNNDAPAGTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGV
 GDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLNFDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLR
 QKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTV
 QTGGTLYRITHNTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWIKSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNIPD
 IPAHLWYFGLIGTCL

[0419]

[0420]

서열 번호 4는 자연적으로 발생된 유전자 서열을 기초로 하는 TLL 성숙 단백질의 아미노산 서열을 제시한다:

EVSQDLFNQFNLFQAQYSAAYCGKNNNDAPAGTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFEDSGVGDV
 TGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLNFDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLRQKV
 EDAVREHPDYRVVFTGHSLGGALATVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLTVQTGG
 TLYRITHNTNDIVPRLPPREFGYSHSSPEYWIKSGTLVPVTRNDIVKIEGIDATGGNNQPNIPDIPAH
 LWYFGLIGTCL

[0421]

[0422]

실시예 3

[0423]

TLL 부위 평가 라이브러리(site evaluation library)의 생성

[0424]

독점적인 프로세스(WO 2004/059556A3호)를 이용하여 진아트(GENEART)가 부위 평가 라이브러리(SEL)를 생성하였으며, DNA 분자의 제조는 진아트가 소유하거나 라이선스를 가진 기술(유럽 특허 제0 200 362호 및 제0 201 184호; 및 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제6,472,184호)을 이용하였다. 이 실시예에 기재된 TLL SEL의 구축은 진아트가 독점적인 진아트 노-하우 및/또는 지적 재산 하에서 라이브러리 생성을 위한 그의 기술 기반을 이용하여 수행하였다. SEL을 생성하기 위한 진아트의 순차적인 순열 접근(sequential permutation approach)이 이 회사의 웹사이트 상에 전반적으로 기재되어 있다.

[0425]

pHYT-TLLwt 플라스미드 DNA는 본래의 TLL 성숙 영역(서열 번호 4)에서의 모든 부위에서 SEL을 생성하기 위한 주형으로서의 역할을 하였다. 제조할 TLL 단백질(서열 번호 3)에서의 AprE 프로-영역으로부터의 처음 3개의 아미노산(Ala-Gly-Lys)은 돌연변이되지 않았다. 진아트에게는 그의 표준 프로토콜을 사용하여 모든 고유의 TLL 위치들에서 SEL을 생성하도록 의뢰하였다(번호 매김은 본래의 TLL 성숙 단백질의 첫 번째 아미노산으로부터 시작함). 진아트에 의해 구축된 269개의 잔기들 각각에 대한 위치적 라이브러리는 부위 당 대략 16개의 아미노산 치환을 포함하였다. 라이브러리는 기재된 269개의 위치에서 TLL 변이체 서열을 암호화하는 발현 플라스미드를 함유하는 형질전환된 *B. 서브틸리스* 세포로 구성되었다. 진아트는 웰 당 1개의 변이체가 있는 96 웰 플레이트로서 라이브러리를 제공하였으며, 이때 배양물은 글리세롤 중에 냉동된 상태였다.

[0426]

TLL 치환 변이체를 함유하는 *B. 서브틸리스* 형질전환체를 10 mg/L의 테트라사이클린을 함유하는 트립틱 소이 브로쓰(TSB) 중에서 96 웰 플레이트에서 16시간 동안 배양하였고, 이 예비-배양물 10 µl를 25 mg/L의 테트라사이클린이 보충된 MBD 배지(아래 기재됨) 190 µl로 채워진 코닝 3599 MTP에 첨가하였다. 플레이트를 60 내지 65 시간 동안 37°C, 80% 습도에서 300 rpm으로 일정하게 회전 혼합하면서 인큐베이션하였다. 세포를 2500 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 수거하였으며, 밀리포어 진공 시스템을 사용하여 밀리포어 멀티스크린(Multiscreen) 필터플레이트를 통해 여과하였다. 배양물의 상층액을 검정에 사용하였다. 배양 배지(MBD 배지)는 MOPs 완충제를 기반으로 하고 주요 질소 공급원으로서의 우레아, 주요 탄소 공급원으로서의 글루코스를 포함하고 활발한 세포 성장을 위하여 1% 소이톤이 보충된 농축된 반한정 배지였다.

- [0427] **실시예 4**
- [0428] **생산 위치 및 조합가능 돌연변이**
- [0429] 생산 위치는 향상된 특성을 나타내는 조합 변이체를 제조하는 데 가장 유용한 분자 내의 그의 위치로서 설명되고, 그 위치 자체는 적어도 하나의 조합가능 돌연변이를 허용한다. 조합가능 돌연변이는 조합 변이체를 제조하는데 사용될 수 있는 분자 내의 그의 치환으로서 설명될 수 있다. 조합가능 돌연변이는 분자의 적어도 하나의 원하는 물성을 향상시키지만, 발현, 활성 또는 안정성을 유의하게 감소시키지는 않는 것이다.
- [0430] 조합가능 돌연변이는 분자의 적어도 하나의 원하는 물성을 향상시키지만, 발현, 활성 또는 안정성을 유의하게 감소시키지는 않는 것이다. TLL 폴리펩티드 내의 조합가능 돌연변이는 실시예 1의 CS-61 마이크로-스왑치 검정법, p-니트로페닐 에스테르 가수분해, 세제 중의 안정성, LAS 중의 안정성, 및 열안정성에 기재된 검정법으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 결정하였다.
- [0431] 조합가능 돌연변이는 하기 기준들에 따라 그룹화하였다:
- [0432] 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 변이체(그룹 A).
- [0433] 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 변이체(그룹 B).
- [0434] 발현, pH 8.2에서의 CS-61 마이크로-스왑치 활성, pH 6 또는 pH 8.2에서의 p-니트로페닐 에스테르 기질 상에서의 활성, 및 세제 안정성, LAS 안정성 또는 열안정성에 대해 TLL 부모에 대한 최소 성능 지수(PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 변이체(그룹 C).
- [0435] 그룹 A, B, 및 C는 다수 치환에 대한 상이한 정도의 허용오차를 갖는 아미노산 위치를 추가로 함유한다. 생산 위치를 확인하기 위해, 각각의 위치에서 허용되는 치환도를 측정하고, 각각의 위치에 대한 생산성 점수를 할당한다. 아래에서 제시된 기준들을 사용하여, 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 각각의 위치 내에 있는 치환의 백분율에 따라 생산성 점수를 할당하였다.
- [0436] 생산 위치는 다수 치환에 대한 소정의 허용오차 정도를 나타낸 위치로서 정의되는 한편, 동시에 아래에서 제시된 결합성에 대한 한 세트의 기준들을 만족한다.
- [0437] 생산 위치에 대한 생산성 점수를 결정하기 위한 기준들은 다음과 같다:
- [0438] 주어진 위치에서의 치환들 중 50% 이상이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 점수 "4"를 부여한다. 이러한 위치는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252, 및 264를 포함한다.
- [0439] 주어진 위치에서의 치환들 중 50% 미만 그러나 30% 이상이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 점수 "3"을 부여한다. 이러한 위치는 18, 19, 20, 30, 31, 32, 47, 48, 49, 50, 53, 56, 60, 73, 74, 85, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 115, 125, 127, 128, 132, 133, 151, 159, 164, 179, 183, 187, 188, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 251, 254, 263, 267, 및 269를 포함한다.
- [0440] 주어진 위치에서의 치환들 중 30% 미만 그러나 15% 이상이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 점수 "2"를 부여한다. 이러한 위치는 7, 11, 12, 15, 22, 35, 40, 42, 43, 44, 45, 61, 63, 65, 67, 76, 77, 84, 87, 114, 117, 119, 121, 134, 135, 136, 143, 154, 155, 156, 158, 165, 166, 168, 176, 180, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 217, 221, 224, 225, 228, 229, 231, 233, 248, 249, 253, 255, 256, 265, 및 268을 포함한다.
- [0441] 주어진 위치에서의 치환들 중 15% 미만이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 점수 "1"을 부여한다. 이러한 위치는 14, 16, 17, 34, 41, 55, 57, 59, 62, 70, 79, 92, 100, 102, 103, 106, 109, 110, 112, 118, 126, 138, 139, 142, 149, 152, 153, 167, 169, 170, 181, 184, 192, 193, 196, 198, 205, 206, 208, 210, 212, 213, 218, 226, 227, 230, 236, 238, 239, 242, 243, 246, 257, 259, 260, 262, 및 266을 포함한다.

- [0442] 앞서 설명된 생산성 점수 "1, 2, 3, 및 4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치가 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.
- [0443] 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 176, 179, 180, 181, 183, 184, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 196, 198, 199, 200, 202, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 236, 237, 238, 239, 242, 243, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 259, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 및 269.
- [0444] 앞서 설명된 생산성 점수 "2, 3, 및 4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치가 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.
- [0445] 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 84, 85, 86, 87, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 111, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 140, 143, 151, 154, 155, 156, 158, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 168, 176, 179, 180, 183, 187, 188, 189, 190, 191, 199, 200, 202, 209, 211, 214, 216, 217, 221, 223, 224, 225, 228, 229, 231, 232, 233, 237, 244, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 263, 264, 265, 267, 268, 및 269.
- [0446] 앞서 설명된 생산성 점수 "3 및 4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치가 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.
- [0447] 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 60, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 85, 86, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 101, 105, 108, 111, 115, 120, 122, 123, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 137, 140, 151, 159, 162, 163, 164, 179, 183, 187, 188, 189, 190, 216, 223, 232, 237, 244, 250, 251, 252, 254, 263, 264, 267, 및 269.
- [0448] 앞서 설명된 생산성 점수 "4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치가 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.
- [0449] 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 37, 38, 39, 46, 51, 52, 54, 58, 64, 66, 68, 69, 71, 72, 75, 90, 93, 94, 111, 120, 122, 123, 130, 131, 137, 140, 162, 163, 189, 250, 252, 및 264.
- [0450] 앞서 설명된 생산성 점수 "1, 2, 3, 및 4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치 및 그 위치 내의 조합가능한 치환이 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.
- [0451] 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 14(A,S,V); 15(Q,G,H,M,S); 16(Y,H,W); 17(S,E); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W);
 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T); 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W);
 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y); 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y);
 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y); 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y);
 30(A,D,H,L,N,R,V,W); 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 34(I,P);
 35(T,E,K,R); 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 41(C,V); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);

54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 55(F,G,W); 56(E,H,K,R,T,V); 57(D,S); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 59(G,D);
 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R); 62(D,N); 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y);
 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W);
 70(D,S); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S);
 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 79(S,A,M);
 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T); 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y);
 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 92(N,A,T); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V);
 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W);
 100(I,M); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 102(D,H); 103(I,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 106(G,H); 108(R,E,F,K,M,Q,Y);
 109(G,T); 110(H,N,S); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 112(G,F,Q); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V);
 117(W,H,K,Q,V); 118(R,P); 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q);
 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y); 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 126(Q,I,M);
 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y);
 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W); 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T);
 136(P,D,Q,R); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 138(Y,F); 139(RLT);
 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 142(F,H,Y); 143(T,A,G,N,S); 149(G,A); 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 152(A,I,V);
 153(T,S); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);
 166(I,D,G,W); 167(D,N); 168(V,G,L,Q); 169(F,S,Y); 170(S,G); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V);
 180(A,D,K,Q,T); 181(F,L); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 184(F,W,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);
 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 192(T,N,P); 193(L,T);
 196(I,V); 198(H,G,S); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 205(R,D); 206(L,N); 208(P,E,N);
 209(R,H,S,T); 210(E,S); 211(F,I,R,T,W); 212(G,Q); 213(Y,S); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 217(S,H,K,V); 218(P,T); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R);
 226(T,D,N); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 230(V,W); 231(T,G,H,K,L,M);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 236(V,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 238(I,V); 239(E,K); 242(D,T);
 243(A,S); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 246(G,I); 248(N,D,L,Y); 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T);
 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T);
 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 257(A,W,Y); 259(L,W,Y); 260(W,P); 262(F,D,K); 263(G,C,H,I,K,M,V);
 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 266(G,E); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및
 269(L,D,F,M,Q,V,W).

[0452]

앞서 설명된 생산성 점수 "2, 3, 및 4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치 및 그 위치 내의 조합가능한 치환이 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0453]

1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y); 7(F,H,M,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 11(N,H,K,V,Y); 12(L,F,H,V,W);
 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y); 15(Q,G,H,M,S); 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 22(C,H,L,M); 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S); 35(T,E,K,R);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 40(A,F,M,S,W); 42(P,C,G,I,V,W); 43(E,D,I,M,R,T); 44(V,H,I,T);
 45(E,F,Q,V); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q); 49(A,G,H,K,L,V,W);
 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 53(Y,E,G,H,K,L,S,W);
 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W); 60(V,G,K,L,Y); 61(G,A,D,L,R);
 63(V,K,Q,T); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 65(G,L,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y);
 67(L,H,I,Q,V); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y); 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y);
 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y); 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S);
 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 76(I,H,S,V); 77(V,A,I,L,N,T); 84(R,H,Q,W); 85(S,F,H,I,N,Q,T);

86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 87(E,A,D,G,P,V); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R);
 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W); 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V);
 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q); 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W);
 108(R,E,F,K,M,Q,Y); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 114(T,F,I,M,V); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 117(W,H,K,Q,V);
 119(S,D,I,Q,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 121(A,K,Q); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 134(E,L,P,V); 135(H,F,K,T); 136(P,D,Q,R);
 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T); 143(T,A,G,N,S);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 154(V,F,I,L,M,Y); 155(A,G,S,T); 156(G,F,M,T,W); 158(D,E,F,Y); 159(L,E,M,Q,R,W);
 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 164(Y,D,N,R,S,V); 165(D,I,P,Y);
 166(I,D,G,W); 168(V,G,L,Q); 176(V,F,I,L,N,W); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 180(A,D,K,Q,T);
 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W); 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V);
 190(G,D,H,R,S,Y); 191(G,F,L,V); 199(T,G,N,V); 200(N,A,P,S); 202(I,L,M,P,V); 209(R,H,S,T);
 211(F,I,R,T,W); 214(S,A,D,M); 216(S,D,G,N,Q,V,W); 217(S,H,K,V); 221(W,F,G,Y); 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V);
 224(S,A,F,P); 225(G,C,E,K,R); 227(L,C,H,M); 228(V,A,E,R); 229(P,I,K,M,S); 231(T,G,H,K,L,M);
 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 233(N,D,G,H,Q); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S); 248(N,D,L,Y);
 249(Q,E,G,T); 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);
 253(P,F,H,N,R); 254(D,A,H,K,N,P,T); 255(I,F,L,W); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V);
 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T); 265(I,L,M,Q,R,W); 267(T,G,I,L,M,P,W); 268(C,D,H,N); 및
 269(L,D,F,M,Q,V,W).

[0454] 앞서 설명된 생산성 점수 "3 및 4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치 및 그 위치 내의 조합가능한 치환이 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0455] 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
 4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y);
 8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y);
 18(A,C,H,K,M,N,Q,S,W); 19(A,C,G,I,L,T,V,W); 20(A,G,I,P,Q,S,T);
 23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
 25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
 28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 30(A,D,H,L,N,R,V,W);
 31(G,D,E,H,M,P,Q,S,V); 32(T,A,I,M,Q,R,S); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S);
 37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
 39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W); 47(A,D,E,F,H,M,T,W); 48(D,E,G,H,L,P,Q);
 49(A,G,H,K,L,V,W); 50(T,A,D,F,K,L,R,S,W); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y); 52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W);
 53(Y,E,G,H,K,L,S,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 56(E,H,K,R,T,V); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W);
 60(V,G,K,L,Y); 64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y);
 69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y);
 73(N,E,G,H,K,R,S); 74(K,A,D,E,G,H,N,Q,S); 75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 85(S,F,H,I,N,Q,T);
 86(I,L,M,P,Q,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 91(G,E,F,H,I,M,Q,R); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
 94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 95(F,G,H,K,L,Q,T,V,W); 96(D,A,K,P,R,V); 97(L,A,D,I,M,Q,T); 98(K,D,E,H,I,M,Q);
 99(E,D,K,P,Q,S,T,W); 101(N,C,D,E,H,M,Y); 105(S,A,D,E,F,K,P,W); 108(R,E,F,K,M,Q,Y);
 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 115(S,G,I,L,M,N,R,T,V); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
 123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 125(R,C,G,I,N,Q,T,Y); 127(K,D,E,F,G,R,T); 128(V,C,H,I,L,N,S,W,Y);
 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y); 132(V,C,D,H,I,K,Q,R,W);
 133(R,E,F,I,N,Q,V); 137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
 151(L,I,M,N,P,T,V,W); 159(L,E,M,Q,R,W); 162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y);
 164(Y,D,N,R,S,V); 179(R,E,H,I,K,L,Q,V); 183(E,H,M,Q,S,T,V,Y); 187(V,G,H,L,N,Q,S,T,W);
 188(Q,C,E,F,H,R,T); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V); 190(G,D,H,R,S,Y); 216(S,D,G,N,Q,V,W);
 223(K,A,H,L,M,Q,S,T,V); 232(R,C,D,I,L,M,P,T,W); 237(K,E,H,I,L,T,W,Y); 244(T,A,F,I,L,M,P,Q,S);
 250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 251(N,D,M,Q,S,T,W,Y); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W);

254(D,A,H,K,N,P,T); 256(P,A,D,S,T); 263(G,C,H,I,K,M,V); 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T);
267(T,G,I,L,M,P,W); 및 269(L,D,F,M,Q,V,W).

[0456] 앞서 설명된 생산성 점수 "4"에 해당하는 TLL에서의 생산 위치 및 그 위치 내의 조합가능한 치환이 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0457] 1(E,A,C,D,F,I,L,N,PQ,R,S,T,V,W,Y); 2(V,F,G,H,I,K,L,M,P,T); 3(S,A,D,E,G,H,K,Q,R,T,Y);
4(Q,A,D,F,G,I,K,L,M,N,P,R,S,W,Y); 5(D,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 6(L,A,E,H,I,K,M,Q,T,V,Y);
8(N,A,E,G,H,I,K,L,M,T,V,W,Y); 9(Q,A,D,E,G,H,I,K,N,R,W,Y); 13(F,A,H,K,M,N,Q,T,V,Y);
23(G,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 24(K,A,D,E,F,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y);
25(N,A,C,D,E,G,H,I,K,L,S,T,V,W,Y); 26(N,C,G,K,L,M,Q,S,T,V,W,Y); 27(D,A,E,F,G,H,I,N,Q,R,S,T,V,Y);
28(A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S); 29(P,C,E,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y); 33(N,D,E,F,K,L,M,Q,R,S);
37(T,A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,W,Y); 38(G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,NT,V,W,Y);
39(N,C,E,H,I,L,P,Q,S,T,V,W,Y); 46(K,D,E,F,G,L,M,V,W,Y); 51(F,A,D,E,G,I,L,M,N,P,R,S,T,Y);
52(L,A,E,G,I,M,R,T,V,W); 54(S,E,F,G,H,K,M,P,R,T,VW,Y); 58(S,D,G,H,I,K,M,Q,R,W);
64(T,C,D,E,G,I,K,L,N,R,V,Y); 66(F,A,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,VW,Y); 68(A,C,G,I,S,T,V,W,Y);
69(L,A,D,G,H,I,K,N,S,T,W); 71(N,D,E,H,K,Q,R,S,T,V,W,Y); 72(T,A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,V,Y);
75(L,A,D,E,G,H,I,M,N,Q,R,S,T,V,Y); 90(I,A,E,F,N,Q,T,V,Y); 93(L,D,H,I,K,N,P,Q,R,V,W);
94(N,D,G,K,M,P,R,S,T,V); 111(D,A,E,F,L,Q,T,V,W); 120(V,G,H,I,N,S,W,Y); 122(D,A,E,F,H,I,N,S,T,Y);
123(T,E,G,I,K,L,M,N,Q,W); 130(D,A,C,E,F,G,H,Q,R,T,V,W,Y); 131(A,C,H,I,K,N,Q,R,S,T,W,Y);
137(D,A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y); 140(V,C,E,F,I,L,M,N,Q,T);
162(N,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,Y); 163(G,A,F,L,M,N,P,R,S,W,Y); 189(T,D,E,G,K,M,N,Q,R,S,V);
250(P,D,E,G,K,Q,R,S,T); 252(I,A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,Q,R,S,T,W); 및 264(L,C,E,G,H,M,N,P,Q,R,S,T).

[0458] 차후의 연구에서, TLL에서 생산 위치의 추가적인 치환을 테스트하고 조합가능할 것으로 확인하였다. 조합가능한 그 위치 내의 추가적인 치환이 아래에 나열되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0459] 11(A,E,I), 23(A), 24(Q,S), 27(K,L), 29(N), 30(E,G,I,S,Y), 31(T), 33(C,I,P,T,V), 45(A,G,S,T),
48(N,R,T,V), 49(C,Y), 50(M), 51(H,V), 56(A,M,N,S), 58(A,F), 71(C,F,P), 73(Q,T), 74(I,M,T,W), 75(K),
91(K,N,Y), 94(A,H), 101(A), 108(A), 111(G,H,I,K,M,S,Y), 122(K,L,Q), 128(T,V), 130(K,M), 133(D,H,L,W),
135(A,D,M,N,Y), 140(Y), 159(G), 163(Q), 183(C), 187(C,I), 188(A,M,W), 190(W), 227(A,I,S), 233(F,I,V),
251(V), 252(M,V).

[0460] **실시에 5**

[0461] **조합가능 돌연변이 및 적합성 점수**

[0462] 실시예 3에 나타난 바와 같이, TLL에서의 조합가능 돌연변이를 실시예 1의 CS-61 마이크로-스왑치 검정법, p-니트로페닐 에스테르 가수분해, (활성), 세제 안정성, LAS 안정성, 및 열안정성 검정법들, 및 단백질 결정(발현)에 기재된 검정법으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 결정하였다. 조합가능 돌연변이를 실시예 3에서 제시된 기준들에 따라 그룹 A, B 또는 C로 할당하였다. 치환이 나타나고, 더 높은 적합성 점수가 조합 변이체를 제조하는 데 사용하기에 더 적합한 치환을 나타내는 그룹(들)(A, B, C)을 기초로 하여 이러한 치환에 적합성 점수를 추가로 할당한다. 적합성 점수가 표 5.1에 정의되어 있다. 상기 기준들에 맞는 TLL의 개별적인 치환에 대한 적합성 점수들이 표 5.2에 기록되어 있다.

[0463] 표 5.1은 조합가능 돌연변이 및 생산 위치의 그룹들에 관련된 것으로 각각의 적합성 점수를 정의한다.

[0464] [표 5.1]

적합성 점수

그룹(들)에서 발생한 치환	적합성 점수
A, B 및 C	+++++
A 및 B	++++
A 또는 (B 및 C)	+++
B	++
C	+

[0465]

[0466] 표 5.2는 TLL에서의 개별적인 치환의 적합성 점수를 나타낸다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0467] [표 5.2]

TLL에서의 개별 치환의 적합성 점수

위치	변이체 적합성 점수				
	(+)	(++)	(+++) WT AA IST	(++++)	(+++++)
1	CL		ERV	QT	ADFINPSWY
2		K	VHT	FGMP	IL
3	R	AH	SEQ	KT	DGY
4		P	QY	AGIKLMNRS	DFW
5			D	KW	HILSTVY
6	AH	KY	LQV	EM	IT
7	MV	H	F		Y
8	K		N	AE	GHILMTVWY
9	Y	DW	QAI	EGNR	HK
11			N	HKY	V
12		W	L	FHV	
13	KTV	AMY	F	Q	HN
14	V		A		S
15	GH	M	Q	S	
16		H	Y		W
17			S		E
18	MNW		ACHS	Q	K
19	ILVW		AT	C	G
20	I	Q	AP	GS	T
22	LM	H	C		
23		R	GP	CFLMSW	DEHIKNQTV
24	MR		KF	Y	ADEHILNPTVW
25	E	S	NADGVW	CHK	ILT
26			NLQ	C	GKMSTVWY
27			D	F	AEGHINQRSTVY
28			AFGL	HMPQR	DEINS
29		GS	PCI	QWY	EHKLMRTV
30		LN	AHRW	DV	
31	MPV		G	EQ	DHS
32			TQ	AIMRS	
33		M	NK		DEFLQRS
34			I		P
35			TER	K	
37	RY	H	TAFLM	C	DEGIKPQW
38	AE		GT	VW	DFHIKLMNY
39	CW	Q	N	PTY	EHILSV
40		F	A	W	MS
41	V		C		

[0468]

위치	변이체 적합성 점수				
	(+)	(++)	(+++) WT AA 1ST	(++++)	(+++++)
42	C		P	V	GIW
43			EI	DM	RT
44			VHT		I
45			E	Q	FV
46			KE	FGVW	DLM
47		W	ADEFM	T	H
48	L	G	D		EHPQ
49	GLW		AHK		V
50		FK	TDW	A	LRS
51		DPY	F	NRT	AEGILMS
52		M	LT	ERW	AGIV
53			YLW	EGHKS	
54	EHM	FGKW	S	RY	PTV
55		W	F	G	
56			E	V	HKRT
57	S		D		
58	DR	I	SGHKQW		M
59	D		G		
60	KY	L	V		G
61	ADR		GL		
62	N		D		
63	KQ		V		T
64		KRY	TDIL	CENV	G
65	Y	L	GV		
66	AST	GY	FILV	NQR	HMW
67		H	L	Q	IV
68		Y	ACW		GISTV
69		D	L	AGHNW	IKST
70			D		S
71			NE	VWY	DHKQRST
72			TK	P	ADEFHILNRSVY
73			N	EGK	HRS
74	E		KADG	NQ	HS
75		M	L	DNRY	AEGHIQSTV
76	S		IV	H	
77			VA	ILNT	
79	M		S		A
84	QW	H	R		
85	FI		SHNQ		T
86		Q	IVY	LM	PT
87	A		ED	PV	G

[0469]

위치	변이체 적합성 점수				
	(+)	(++)	(+++) WT AA 1ST	(++++)	(+++++)
90		Y	IV	QT	AEFN
91			G	F	EHIMQR
92		A	N		T
93	HNW	IPV	LDKQR		
94	KMP	S	NGTV	D	R
95		HT	FKL		GQVW
96	PR	V	D		AK
97	I		LAM	Q	DT
98		M	KH	DEI	Q
99	PQ		E	K	DSTW
100		M	I		
101	CEM		N		DHY
102	H		D		
103	Y		I		
105	F		SW	ADEP	K
106	H		G		
108			RF	EM	KQY
109	T		G		
110	N		HS		
111	FW		D		AELQTV
112	FQ		G		
114			T		FIMV
115	IL	N	SGMRV		T
117	K	Q	WHV		
118			R		P
119	QV		SDI		T
120	I		VGHNSW		Y
121	Q		A		K
122		STY	DAF	EN	HI
123	IK		T	ELQ	GMNW
125	C	I	RY	NT	GQ
126		M	Q	I	
127		D	K	EFR	GT
128	LNW	Y	VCI	HS	
130	E	CR	DVWY	FQ	AGHT
131	CN		AKST	RWY	HIQ
132	C	I	VQ	DKW	HR
133	FNV		RI	EQ	
134		P	E		LV
135			H	FT	K
136	R		P	DQ	

[0470]

위치	변이체 적합성 점수				
	(+)	(++)	(+++) WT AA 1ST	(++++)	(+++++)
137	AFLMNP		DIRW	SV	EGHKQTY
138	F		Y		
139			R	L	T
140	EILN	C	V	FMQT	
142			FHY		
143	N		T	AGS	
149			G	A	
151		P	LMW	N	ITV
152	I	V	A		
153			TS		
154	MY		V	F	IL
155	T		A		GS
156		T	GM	FW	
158			D	Y	EF
159	MW		LQR	E	
162	MPY		NDEFHIKQS		GR
163	AMR		GFL	SW	NPY
164		DR	Y	NS	V
165	P	Y	D	I	
166			I	DW	G
167			D	N	
168	Q		VG	L	
169	Y		FS		
170	G		S		
176	FNW		V		IL
179			RHK	EI	LQV
180	DQ		AT		K
181			F		L
183	HMQSTY		E	V	
184	W		FY		
187			V		GHLNQSTW
188	ER	F	Q	H	CT
189	EM		T	KV	DGNQRS
190	DHRYS		G		
191			G		FLV
192	NP		T		
193			LT		
196			I		V
198			HGS		
199	NV		T		G
200	P		NS	A	

[0471]

위치	변이체 적합성 점수				
	(+)	(++)	(+++) AA 1ST	WT (++++)	(+++++)
202	M		IL		PV
205			R	D	
206	N		L		
208		N	P		E
209			RH	ST	
210	S		E		
211			FRT		IW
212	Q		G		
213		S	Y		
214	M		SA	D	
216		D	SV	GQ	NW
217			SV	H	K
218			P	T	
221	FGY		W		
223	HL		KA	M	QSTV
224	AFP		S		
225	C		G		EKR
226	D		T	N	
227		C	LH		M
228	A		V	E	R
229	MS	I	P	K	
230			VW		
231	G		TH	KLM	
232	DW	CL	RP		IMT
233			N		DGHQ
236	W		V		
237		E	KHTW		ILY
238	V		I		
239	K		E		
242			D		T
243	S		A		
244	AFLMP		TQS		I
246	I		G		
248	DLY		N		
249	GT	E	Q		
250	DGKT	E	PS		QR
251	MQSTY		N		DW
252	W	F	ICE	KLN	ADGHQRST
253	FHN		PR		
254	NP	AK	DT	H	
255	W		I	F	L
256	D		P	T	AS
257		W	A		Y
259	WY		L		
260	P		W		
262	K		F		D
263	CHM		GK	IV	
264			LCG	HST	EMNPQR
265	LRW		I		MQ
266	E		G		
267		I	TGM	P	LW
268	DN		CH		
269			L	F	DMQVW

[0472]

실시예 6

[0473]

표면 변형

[0474]

TLL의 변경된 전하 또는 소수성과 같은 유리한 표면 변형에 기여하는 위치 및 치환이 표 5.1에 제시되어 있다. 모든 조합가능한 치환을 함유하는 생산 위치를 실시예 3에서 설명된 생산 위치에 대한 기준들을 사용하여 결정하였다. 데이터를 추가로 분석하여, 소수성 또는 전하를 바꾸고 모든 중요한 특성들을 유지하는 치환을 결정하였다. 각 치환의 소수성을 화이트(White) 및 윌리(Wimley)의 방법(문헌[White, S. H. and Wimley, W. C., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Strut. 28:319-65, (1999)])을 사용하여 결정하였다. TLL에서의 유리한 표면 변형을 나타내는 조합가능한 위치 및 치환의 서브그룹이 표 6.1에 나타나 있다.

[0475]

표 6.1은 유리한 표면 변형을 나타내는 치환을 제시한다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0476]

[0477] [표 6.1]

유리한 표면 변형에 조합가능한 위치 및 치환.

변이체	유형
A018K	소수성, 전하
D027N	소수성, 전하
D027S	소수성, 전하
D027T	소수성, 전하
D027V	소수성, 전하
P029E	소수성, 전하
N033D	소수성, 전하
N033E	소수성, 전하
N033R	소수성, 전하
F051T	소수성
S058M	소수성
T072R	소수성, 전하
L075Q	소수성
N101D	소수성, 전하
R108K	소수성
R108Q	소수성, 전하
R108Y	소수성, 전하
T114F	소수성
T114I	소수성
A121K	소수성, 전하
H135F	소수성
D137V	소수성, 전하
G156W	소수성
G163Y	소수성
V187N	소수성
V187W	소수성
P250E	소수성, 전하
I252A	소수성
I252T	소수성
L264P	소수성

[0478]

[0479] 실시예 7

[0480] 세제 성능에 기초한 조합가능 돌연변이

[0481] TLL에서의 추가적인 조합가능 돌연변이를 CS-61 마이크로-스왑치 검정법(반 투여량, 반투여량 + 보조제, 또는 전 투여량으로 수행됨), 세제 안정성, 및 단백질 결정(발현)으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 확인하였다. 표 7.1에는 TLL 부모에 대한 성능 지수(PI)가 발현에 대해 ≥ 0.8 , 세제 안정성에 대해 ≥ 0.8 및 반 투여량, 반 투여량 + 보조제, 또는 전 투여량에서의 세제 성능에 대해 ≥ 1.1 을 나타내는 조합가능한 위치 및 치환이 확인되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

그룹	성능 지수(PI) [세제 성능]				
	발현	세제 안정성	세제 성능		
			반 투여량	반 투여량 + 보조제	전 투여량
I	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 1.1		
II	≥ 0.8	≥ 0.8		≥ 1.1	
III	≥ 0.8	≥ 0.8			≥ 1.1

[0482]

[0483]

[표 7.1]

세계 성능

그룹 I		그룹 II		그룹 III	
위치	치환	위치	치환	위치	치환
1	S	1	S	1	S
5	H, I, S, T	3	T	5	H, I, T
8	H	4	F	23	E, Q
9	K, N	5	H, I, S, T	29	H, I, R, T
11	H, K	8	H, T, V	39	H, I
13	N	9	G, H, K	43	R, T
19	G	11	K	54	T
23	K, N, Q, R	12	V, W	58	Q
27	Q, R	18	K	115	T
29	K, R	19	G	130	A, R
32	A	23	K, Q, R	154	L
33	D	27	R, S	158	E
37	G, H, Q	32	I	180	K
38	F, L, M, W, Y	38	F, L, M, W, Y	187	T
39	I, L	39	I, P	228	R
42	W	43	I, R, T	269	W
43	D, I, R, T	45	F, Q		
45	F, Q, V	53	K		
51	M	54	P		
53	E	56	K, R		
54	P	58	H, Q		
56	H, K, R	75	G, Q, R		
58	H, K, Q, W	77	I		
69	R	90	T		
73	R	91	I, Q		
75	A, R	105	P		
75	T	123	N		
77	I, L, T	127	F		
90	F, T	130	A, F, H, Q, R		
91	I, Q	131	R		
94	R	136	Q		
105	P	137	R, S		
108	K	143	S		
122	F	156	T		
125	T	162	G		
130	A, R	163	S		
132	K, R	164	R, V		
134	L	166	G		
137	R	180	K		
151	T	187	G, H, N, Q, S, T, W		
155	S	188	F		
156	W	189	D, G		
163	F, P	199	G		
164	R	228	R		
180	K	252	N		
183	V	264	R		
184	Y	265	Q		
187	G, H, N, Q, S, T, W				
189	G, Q				
211	I				
214	A				
228	R				
232	P				
233	Q				
244	I				
252	N				
265	Q				

[0484]

[0485]

실시예 8

[0486]

안정성에 기초한 조합가능 돌연변이

[0487]

TLL에서의 추가적인 조합가능 돌연변이를 열안정성, 세제 안정성 또는 LAS 안정성 검정법, pH 8에서의 pNPO 기질 가수분해, 및 단백질 결정(발현)으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 확인하였다. 표 8.1에는 TLL 부모에 대한 성능 지수(PI)가 발현에 대해 ≥ 0.8 , pH 8에서의 pNPO 기질 가수분해에 대해 ≥ 0.8 , 및 열안정성, 세제 또는 LAS 안정성에 대해 ≥ 1.1 을 나타내는 조합가능한 위치 및 치환이 확인되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

[0488]

그룹	성능 지수(PI) [안정성]		안정성		
	발현	pNPO 가수분해 (pH 8)	열안정성	세제 안정성	LAS 안정성
IV	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 1.1		
V	≥ 0.8	≥ 0.8		≥ 1.1	
VI	≥ 0.8	≥ 0.8			≥ 1.1

[0489]

[표 8.1]

안정성

위치	그룹 IV		그룹 V		그룹 VI	
	위치	치환	위치	치환	위치	치환
2	I		12	F	1	F, R
11	K		13	Q	4	K, L, N, W
15	S		15	S	5	K
18	K		19	C, G	11	K
23	C, D, E, F, H, I, K, M, N, Q, S, T, V		20	P	23	K
24	H		23	D, E, F, I, V	27	A, H, N, R, S, T, V
26	T		24	W	37	P
27	A, G, H, N, Q, R, S, T, V		26	C, T, W, Y	38	H, K, L, W, Y
29	E		28	D, P	42	V
37	P		31	E	43	I, R
48	E, Q		34	P	45	F, Q, V
50	S		37	C, D	47	T
51	A, L, S, T		39	E, L, P	49	V
56	K, V		42	I, V	51	I, M, S
58	M		45	F, V	56	H, K, S, T
66	N, Q		46	F, G, L, W	58	M, Q
75	A, G, Q, R		47	F, M, T, W	73	S
77	L, T		49	H, V	75	D, E, G, Q, R
91	E, Q		51	A, G, I, L, M, S, T	91	Q
94	R		60	L	94	R
96	K		64	V	101	D
99	D, S		66	Q	108	K
101	D, H		68	S, T, V	111	A
108	K, M, Y		73	E, G, R, S	119	D, T
111	A, E, Q		75	E, G, Q, R	120	Y
114	F, I, V		77	A, L, N, T	154	I
117	Q		91	E, Q	179	L
120	N		94	D	187	T
121	K		108	E, F, M, Q, Y	189	D, Q
135	F		114	F, I, V	200	A
137	I, Q, R		127	T	209	S
154	F, I, L		128	H, S, Y	211	W
155	G, S		131	R, W, Y	226	N
156	W		132	D	250	E, Q
163	F		133	E, Q	251	W
169	S		136	D, Q	252	A
176	I		139	M	256	T
187	H, N, W		140	F, M, Q		
226	N		142	Y		
250	E		154	I		
252	A		155	S		
256	T		156	W		
264	C, H, M, P, Q, S		159	E, R		
265	M		163	F, L, P, Y		
269	Q		168	G, L		
			179	L		
			187	H, N, Q, T		
			188	F		
			189	D		
			205	D		
			208	E		
			209	S		
			214	D		
			223	T		
			225	E		
			228	E		
			237	L, Y		
			250	E		
			251	D		
			252	A		
			256	T		
			264	C, H, P, Q, S		
			265	M		

[0490]

[0491]

실시예 9

[0492]

에스테르 가수분해에 기초한 조합가능 돌연변이

[0493]

TLL에서의 추가적인 조합가능 돌연변이를 pH 8에서의 pNPB, pNPO 및 pNPP 기질의 가수분해, 열안정성, 및 단백질 결정(발현)으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 확인하였다. 표 9.1에는 TLL 부모에 대한 성능 지수(PI)가 발현에 대해 ≥ 0.8 , 열안정성에 대해 ≥ 0.8 , 및 pNPB 가수분해에 대해 ≥ 1.1 , 또는 pNPO 가수분해에 대해 ≥ 1.1 , 또는 pNPP 가수분해에 대해 ≥ 1.1 , 또는 pNPB 및 pNPO 가수분해에 대해 ≥ 1.1 , 또는 pNPO 및 pNPP 가수분해에 대해 ≥ 1.1 또는 pNPB, pNPO, 및 pNPP 가수분해에 대해 ≥ 1.1 을 나타내는 조합가능한 위치 및 치환이 확인되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

그룹	성능 지수(PI) [가수분해]				
	발현	열안정성	에스테르 가수분해		
			pNPB	pNPO	pNPP
VII	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 1.1		
VIII	≥ 0.8	≥ 0.8		≥ 1.1	
IX	≥ 0.8	≥ 0.8			≥ 1.1
X	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 1.1	≥ 1.1	
XI	≥ 0.8	≥ 0.8		≥ 1.1	≥ 1.1
XII	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 1.1	≥ 1.1	≥ 1.1

[0494]

[0495]

[표 9.1]

에스테르 가수분해

그룹 VII		그룹 VIII		그룹 IX		그룹 X		그룹 XI		그룹 XII	
위치	치환	위치	치환	위치	치환	위치	치환	위치	치환	위치	치환
2	I,L	1	D	1	Q,S	2	L	3	D,T	3	D
3	D	2	L	3	D,T	3	D	4	A,D,L,M	4	D,L
4	D,I,L,W	3	D,T	4	A,D,L,M	4	DL	5	H,Y	5	H
5	H,Y	4	A,D,L,M	5	H,S,Y	5	H,Y	23	F	5	Y
8	H,M	5	H,Y	9	M	8	M	27	E,N,Q,T	27	Q,T
9	K	8	A,E,M	11	K	18	K	29	R	29	R
11	H,K	9	R	12	F	24	A,T	33	D,Q	40	M
18	K	18	K	15	S	26	K	40	M	108	K
23	K	23	D,E,F,N,Q	23	F	27	A,I,Q,T	48	Q	111	L
24	A,T	24	A,D,E,H,N,T	27	E,N,Q,T	29	R	51	I,L,T	134	L
26	K,T	26	G,K	29	R	40	M	56	H,K,R,T	137	H,K,S,Y
27	A,I,Q,T	27	A,E,I,N,Q,T	32	A,Q,S	75	M	58	M,Q	162	G
29	H,I,K,R,T,V	29	E,Q,R	33	D,Q	108	K,Y	75	R	163	Y
30	R,V	33	D,E,F,M,Q,R,S	35	E,K,R	111	L,T	77	I,T	187	H,S,W
32	S	37	D,E,P,Q	40	M	122	Y	87	P	232	P
35	K	38	D,N	48	Q	123	Q	108	K		
37	G	40	M	51	I,L,M,T	125	Q	111	A,L		
40	M	48	E,Q	56	H,K,R,T	130	F,H	114	M		
54	V	49	V	58	M,Q	134	L	115	R		
69	A,K	50	E,F	71	E	137	H,K,S,T,W,Y	127	E,F		
71	R	51	I,L,T	75	R	155	G	130	A		
72	L	54	F,R	77	I,T	156	W	132	Q,R		
74	A	56	H,K,R,T	87	P	162	G	134	L		
75	M,S	58	M,Q	105	A	163	Y	137	E,G,H,I,K, Q,R,S,Y		
91	I	64	N	108	K	176	I	155	S		

[0496]

그룹 VII		그룹 VIII		그룹 IX		그룹 X		그룹 XI		그룹 XII	
위치	치환	위치	치환	위치	치환	위치	치환	위치	치환	위치	치환
94	R	66	Q	111	A,L	180	K	162	G		
101	Y	74	Q	114	M	187	H,S,T,W	163	F,P,S,W,Y		
108	K,Y	75	E,M,N,Q,R	115	R	232	P	187	H,N,Q,S,W		
111	L,T,V	77	A,I,L,T	127	E,F	233	D	189	R		
114	I	87	P	130	A	265	M	225	E		
122	T,Y	90	E,F,Q	132	Q,R,W	269	M	227	M		
123	Q	101	D	134	L			232	P		
125	Q	105	D,P	137	E,G,H,I,K,Q R,S,Y			233	Q		
130	F,H	108	K,Q,Y	143	A			264	R,T		
132	H,W	111	A,E,L,Q,T	155	S						
134	L,V	114	F,M	162	G						
137	H,K,S,T,W,Y	115	R	163	F,P,S,W,Y						
151	T,W	117	Q	164	D,R						
155	G	120	N	165	I,Y						
156	W	122	Y	187	H,N,Q,S,W						
162	G	123	E,L,M,N,Q	189	R						
163	Y	125	Q	225	E						
166	G	127	E,F,R	227	A,M						
176	I	130	A,F,H,Q	232	P						
180	K	132	K,Q,R	233	Q						
187	H,S,T,W	134	L	244	I						
189	K	137	E,G,H,I,K,Q,R,S, T,V,W,Y	252	A,K,L,R						
232	L,P	154	F,L	263	I,V						
233	D,H	155	G,S	264	H,R,T						
237	L,Y	156	F,W	269	V						
244	I	158	E,F,Y								
252	L,T	162	G,R								
255	L	163	F,P,S,W,Y								
263	I,V	169	S								
265	M	176	I								
269	M	180	K								
		187	H,N,Q,S,T,W								
		189	D,Q,R								
		225	E								
		227	M								
		228	E								
		232	P								
		233	D,G,Q								
		264	E,M,N,P,Q,R,S,T								
		265	M								
		269	M,Q								

[0497]

[0498]

[0499]

[0500]

실시예 10

C4:C16 기질의 가수분해의 변경 비에 기초한 조합가능 돌연변이

TLL에서의 추가적인 조합가능 돌연변이를 pH 8에서의 pNPB 및 pNPP 기질의 가수분해, 열안정성, 및 단백질 결정(발현)으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 확인하였다. 표 10.1에는 TLL 부모에 대한 성능 지수(PI)가 발현에 대해 ≥ 0.8 , 열안정성에 대해 ≥ 0.8 , 및 pNPB 가수분해에 대해 ≤ 0.8 및 pNPP 가수분해에 대해 ≥ 1 을 나타내는 조합가능한 위치 및 치환이 확인되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

그룹	성능 지수(PI)		에스테르 가수분해	
	발현	열안정성	pNPB	pNPP
XIII	≥ 0.8	≥ 0.8	≤ 0.8	≥ 1

[0501]

[0502]

[표 10.1]

C4:C16 기질의 가수분해의 변경 비에 기초한 조합가능 돌연변이

그룹 XIII	
위치	치환
1	Q
9	M
12	F
15	S
23	F
27	E
32	Q
35	E
48	Q
58	M, Q
71	E
75	R
115	R
130	A
132	Q, R
137	E, I, Q, R
143	A
155	S
163	F, P, S
164	D
165	I, Y
187	Q
225	E
227	A, M
233	Q
252	A, K, R
264	H, R, T
269	V

[0503]

[0504]

실시예 11

[0505]

낮은 pH에서의 가수분해에 기초한 조합가능 돌연변이

[0506]

TLL에서의 추가적인 조합가능 돌연변이를 pH 6에서의 pNPO 가수분해, 열안정성, 및 단백질 결정(발현)으로부터 얻은 성능 지수(PI) 값을 사용하여 확인하였다. 표 11.1에는 TLL 부모에 대한 성능 지수(PI)가 발현에 대해 ≥ 0.8 , 열안정성에 대해 ≥ 0.8 , 및 pH 6에서의 pNPO 가수분해에 대해 ≥ 1.1 을 나타내는 조합가능한 위치 및 치환이 확인되어 있다. 위치는 서열 번호 3에서 나열된 성숙 TLL을 기초로 하여 번호가 매겨짐.

그룹	성능 지수(PI) [낮은 pH 가수분해]		
	발현	열안정성	pH 6에서의 pNPO
XIV	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 1.1

[0507]

[0508]

[표 11.1]

낮은 pH에서의 가수분해

그룹 XIV	
위치	치환
1	Q, S
2	L
3	T
4	A, D, L, M
5	H, Y
9	K
11	K
12	F
15	S
24	A, D, E, H, N
27	A, E, Q, T
29	R
32	A
33	D, F, Q
38	D
40	M
48	Q
49	V
51	I, L, M, T
56	H, K, T
58	M, Q
69	A
75	R
77	T
91	Q
94	R
98	I
105	A
108	K, Y
111	A, L
114	I, M, V
121	K
123	E, L, M, N, Q
125	Q
127	E, F
130	A, H
132	R
134	L
137	E, G, H, I, K, Q, R, S, V, Y
143	A
151	P
154	F, I, L
155	S
156	W
158	Y
162	G
163	F, P, W, Y
164	D, R
165	I, Y
180	K
187	H, N, Q, S, T, W
189	R
227	M
228	R
232	P
252	L
263	I, V
265	M
269	M

[0509]

[0510]

실시예 12

[0511]

보조제의 상이한 수준에서의 리파제 활성 시험

[0512]

TLL 부모 효소의 에스테라제 활성을 상이한 수준의 4개의 보조제 화합물들의 존재 하에서 결정하였다(표 12.1). 각각의 보조제를, 6 gpg의 물 경도가 가해진 상태에서, pH 8.2의 0.05M HEPES 완충제 내에서 그의 임계 미셀 농도(CMC), 1/2 CMC, 또는 1/4 CMC에 해당하는 농도로 혼합하였다. pNP 옥타노에이트에 대한 가수분해 속도를 위의 실시예 1B에서 설명된 바와 같이 측정하였다. 4개의 모든 보조제 화합물들에 대하여, TLL 부모 효소의 에스테라제 활성은 전 CMC 또는 1/2 CMC 수준에 비해 1/4 CMC 수준에서 유의하게 더 높다(도 1).

[0513]

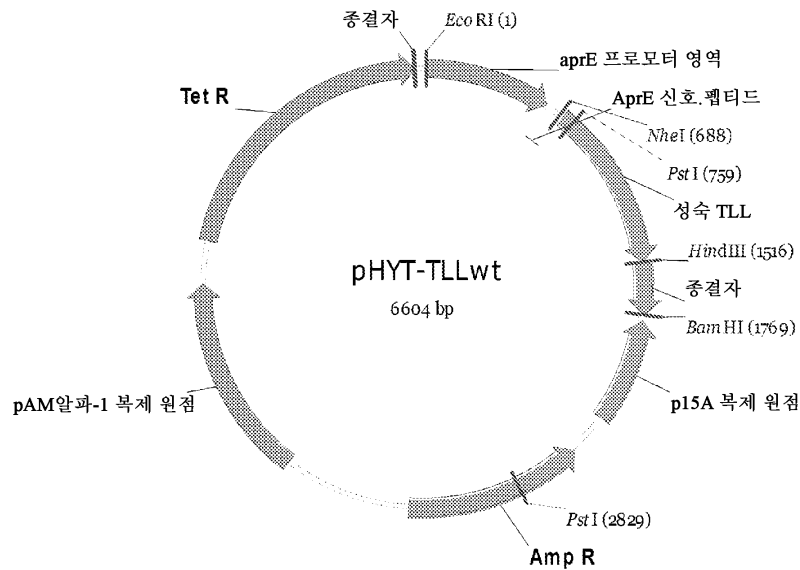
[표 12.1]

유형	실시예	CMC (mM)
비이온성	n-도데실-β-D-말토피라노시드 (D310)	0.17
쯔버티이온성	라이소포스 콜린 14 (L214)	0.036
	안저젬트 3-12 (AZ312)	2.8
	캡소 (C317)	8

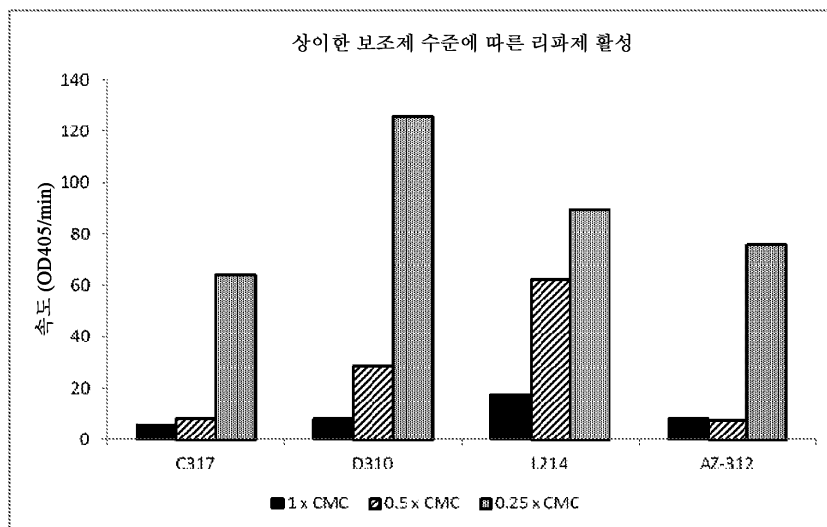
[0514]

도면

도면1



도면2



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> DANISCO US INC.
 GRAYCAR, Thomas P.
 PRICELIUS, Sina
 POULOSE, Ayrookaran J.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS COMPRISING A LIPOLYTIC ENZYME VARIANT

<130> 40152WO-2

<140> PCT/US2013/064672

<141> 2013-10-11

<150> US 61/713,436

<151> 2012-10-12

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of the synthetic TLL gene

<400

> 1

gctagcgtag ctggcaaaga agttagccaa gatctgttca accaattcaa ccttttcgct	60
caatactctg cagctgctta ctgaggaaag aacaacgatg cacctgctgg tactaacatc	120
acttgacag gtaacgatg tcttgaagta gaaaaagctg atgctacatt tctttactct	180
tttgaagata gcggcgtcgg cgatgttacc ggtttcttag ctctggataa cacaacaaa	240
cttctcgtcc tttagcttcag aggtctctgc tcaatcgaaa actggatcgg taaccttaat	300
tttgacttga aagaaatcaa cgatatctgc tctggttgcc gtggccatga cggattcaca	360
tcatcttggga gaagcgtcgc agacacgctt cgccaaaaag tagaagatgc cgtacgcgaa	420
caccagatt acagagtagt tttcacaggt cactctcttg gcgagcttt agcaacagta	480
gcaggcgtg atctccgcgg taacggatac gacattgatg tcttctctta cggcgtccg	540
cgcgtcggta acagagcgtt tgctgaattt ttaactgtac aaacaggcgg aactctttat	600
cgcatcactc acacaaaaga tattgtcccg cgcttacctc cgagagaatt tggttactca	660
cacagctctc ctgaatactg gatcaaaagc ggtacattgg tacctgttac tcgaaacgat	720
atcgtcaaaa ttgaaggaat tgacgccacc ggcggcaaca accaaccgaa catccctgac	780

atccccggcac acctttggta cttcggctta atcggaacat gcctttaaaa gctt 834

<210> 2

<211> 301

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence of TLL produced from expression
plasmid pHYT-TLLwt

<400> 2

Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu

1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Ser Ala Ala Gly Lys

20 25 30

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr

35 40 45

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr

50 55 60

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe

100 105 110

Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp

115 120 125

Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly

130 135 140

Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val

145 150 155 160

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly

165 170 175

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg

naturally occurring gene sequence

<400> 4

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45
 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr

 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val

 115 120 125
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr

 180 185 190
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro

245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu

260 265

<210> 5

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gttaccttga atgtatataa acattctcaa agggatttct aataaaaaac gctcgggtgc 60

cgccgggcgt ttttatgca tcgatgg 87

<210> 6

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 6

aattccatcg atgcataaaa aacgcccggc ggcaaccgag cgttttttat tagaaatccc 60

tttgagaatg tttatataca ttcaag 86

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

gatcctgact gcctg 15

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8

agctcaggca gtcag

15