



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년05월25일  
 (11) 등록번호 10-1739770  
 (24) 등록일자 2017년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 9/58* (2006.01) *A21D 8/04* (2017.01)  
*A23K 1/00* (2006.01) *C07K 14/37* (2006.01)  
*C11D 3/386* (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-7028611  
 (22) 출원일자(국제) 2010년04월30일  
 심사청구일자 2015년04월10일  
 (85) 번역문제출일자 2011년11월29일  
 (65) 공개번호 10-2012-0096872  
 (43) 공개일자 2012년08월31일  
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/055893  
 (87) 국제공개번호 WO 2010/125174  
 국제공개일자 2010년11월04일  
 (30) 우선권주장  
 20095497 2009년04월30일 핀란드(FI)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 WO2010039840 A1

(73) 특허권자  
**에이비 엔자임스 오와이**  
 핀란드, 라자매키 핀 05200, 티키멘티 15  
 (72) 발명자  
**윤투넨 카리**  
 핀란드 핀-02680 에스포 크레마퇴링쿠야 4 호  
**발타카리 리나**  
 핀란드 핀-05200 라야매키 푸이스토쿠야 10 베  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**장훈**

전체 청구항 수 : 총 35 항

심사관 : 퇴\_김남경

(54) 발명의 명칭 **신규 진균 프로테아제 및 이의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 성숙한 Fe\_RF6318 효소의 아미노산 서열을 포함하는 진균 세린 프로테아제 효소에 관한 것이다. 본 발명의 세린 프로테아제는 푸사리움 에퀴세티, 더욱 바람직하게는 기탁 균주 CBS119568로부터 획득할 수 있다. 또한, 서열번호 9의 뉴클레오타이드를 포함하고 이. 콜라이 RF7664에 내재되어 수탁번호 DSM 22171로 기탁된 플라스미드 pALK2521 및 서열번호 10의 전장 유전자를 포함하고 이. 콜라이 RF7800에 내재되어 수탁번호 DSM 22172로 기탁된 플라스미드 pALK2529와 같은 세린 프로테아제를 암호화한 핵산 서열이 기술된다. 본 발명의 세린 프로테아제는 세제 조성물에 사용가능한 효소 제제로서 유용하고, 섬유 처리, 울 처리, 모발 처리, 피혁 처리, 식품 또는 사료 처리 또는 단백질성 물질의 변형, 분해 또는 제거와 연관된 모든 응용에 유용하다.

(72) 발명자

**매किन 수잔나**

핀란드 핀-12600 레일리아이넨 배안틴매엔티에 10  
베 2

**칼리오 야르노**

핀란드 핀-04430 애르벤페 사한카리 4 아 3

**베흐만페레 야리**

핀란드 핀-01800 클라우칼라 렵새멘티에 359

**오야팔로 펜티**

핀란드 핀-04360 투술라 다알린티에 202

**팔로헤이모 마리아**

핀란드 핀-01450 반타 리에코폴쿠 5

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세린 프로테아제 활성을 나타내며, 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe\_RF6318 효소의 아미노산 서열로 이루어짐을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 푸사리움 에퀴세티로부터 수득될 수 있음을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 15분의 반응 시간과 기질로서 카세인을 사용하여 pH 9에서의 상기 효소의 최적 온도가 30℃ 내지 70℃임을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 15분의 반응 시간과 기질로서 카세인을 사용하여 적어도 pH 6 내지 pH 11의 pH 범위의 50℃에서의 최적 pH를 가짐을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 10℃ 내지 60℃ 사이에서 세제의 존재 하에 단백질성 얼룩을 분해 및 제거할 수 있음을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe\_RF6318 효소의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 15로 특성화된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 의해 암호화됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 분리된 핵산 분자에 의해 암호화됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

#### 청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 수탁번호 DSM 22172로 기탁된 에스케리키아 콜라이 RF7800에 내재된 pALK2529에 포함된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 13**

제1항 또는 제2항에 있어서, 숙주에서 세린 프로테아제 암호화 유전자의 발현을 유도할 수 있는 조절 서열에 작동적으로 연결된 진균 세린 프로테아제를 암호화한 핵산 분자를 포함한 재조합 발현 벡터로부터 생성됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 14**

제1항 또는 제2항에 있어서, 이중 숙주에서 생성됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 15**

제1항 또는 제2항에 있어서, 미생물 숙주에서 생성됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 16**

제1항 또는 제2항에 있어서, 트리코더마(*Trichoderma*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 푸사리움(*Fusarium*) 속, 후미콜라(*Humicola*) 속, 크리소스포리움(*Chrysosporium*) 속, 뉴로스포라(*Neurospora*) 속, 리조푸스(*Rhizopus*) 속, 페니실리움(*Penicillium*) 속 및 모르티에렐라(*Mortierella*) 속으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 숙주에서 생성됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 트리코더마 또는 아스퍼질러스에서 생성됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 트리코더마 리세이에서 생성됨을 특징으로 하는 진균 세린 프로테아제 효소.

**청구항 19**

(a) 세린 프로테아제 활성을 나타내며 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자; (b) 서열번호 11의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산 분자; (c) DSM 22171 또는 DSM 22172에 함유된 폴리뉴클레오타이드 서열의 암호화 서열로 이루어진 핵산 분자 및 (d) 유전자 암호의 축퇴로 인해 (b) 또는 (c) 중 어느 하나의 핵산 분자의 암호화 서열과 암호화 서열이 상이한 핵산 분자로 이루어진 그룹 중에서 선택된 진균 세린 프로테아제 효소를 암호화한 분리된 핵산 분자.

**청구항 20**

숙주에서 세린 프로테아제 암호화 유전자의 발현을 유도할 수 있는 조절 서열에 작동적으로 연결된 제19항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

**청구항 21**

제20항의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 미생물 숙주임을 특징으로 하는 숙주 세포.

**청구항 23**

제21항 또는 제22항에 있어서, 사상 진균임을 특징으로 하는 숙주 세포.

**청구항 24**

제21항 또는 제22항에 있어서, 트리코더마 속, 아스퍼질러스 속, 푸사리움 속, 후미콜라 속, 크리소스포리움 속, 뉴로스포라 속, 리조푸스 속, 페니실리움 속 및 모르티에렐라 속으로 이루어진 그룹으로부터 선택됨을 특징으로 하는 숙주 세포.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 트리코더마 또는 아스퍼질러스임을 특징으로 하는 숙주 세포.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 트리코더마 리세이임을 특징으로 하는 숙주 세포.

**청구항 27**

제21항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계 및 세린 프로테아제 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 세린 프로테아제 활성을 나타내는 폴리펩타이드의 제조 방법.

**청구항 28**

세린 프로테아제 활성을 나타내며, 제19항의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 제27항의 방법으로 수득할 수 있는 폴리펩타이드.

**청구항 29**

제21항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 세포로부터 세린 프로테아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 회수하거나 배양 배지로부터 상기 세포를 분리하고 상청액을 수득하는 단계를 포함하여, 세린 프로테아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 효소 제제를 수득하는 방법.

**청구항 30**

제29항의 방법에 의해 수득될 수 있는 효소 제제.

**청구항 31**

제1항에 따른 세린 프로테아제 효소를 포함하는 효소 제제.

**청구항 32**

제30항에 있어서, 프로테아제, 아밀라제, 셀룰라제, 리파제, 자일라나제, 만난아제, 큐티나제, 펙티나제 또는 옥시다제의 그룹중에서 선택된 다른 효소를 조정제와 함께 또는 조정제 없이 포함함을 특징으로 하는 효소 제제.

**청구항 33**

제30항에 있어서, 안정화제, 완충제, 계면활성제, 빌더, 표백제, 조정제, 부패방지제, 재오염방지제, 부식제, 마모제, 형광 증백제, 염료, 안료 및 보존제로 이루어진 그룹중에서 선택된 첨가제를 포함함을 특징으로 하는 효소 제제.

**청구항 34**

제30항에 있어서, 액체, 분말 또는 과립의 형태임을 특징으로 하는 효소 제제.

**청구항 35**

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제가 세제, 섬유 처리, 울 처리, 모발 처리, 피혁 처리, 식품 또는 사료 처리 또는 단백질성 물질의 변형, 분해 또는 제거와 연관된 모든 적용들을 위해 사용되는, 효소 제제.

**청구항 36**

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제가 세제 첨가제로서 사용되는, 효소 제제.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 세제 액체에 사용되는 효소 제제.

**청구항 38**

제36항에 있어서, 세제 분말에 사용되는 효소 제제.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 다양한 용도에, 특히 세탁 및 접시 세척-세제에 유용한 진균 세린 프로테아제 효소에 관한 것이다. 본 발명은 상기 효소를 암호화한 핵산 분자, 재조합 벡터, 상기 효소의 생성을 위한 숙주 세포, 상기 효소를 함유한 효소 조성물뿐만 아니라 그러한 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 효소 또는 그 효소를 함유한 조성물의 여러 가지 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 미생물 프로테아제는 가장 중요한 가수분해 효소들 사이에 위치하며, 세제, 식품, 피혁, 제약, 진단제, 폐기물 관리 및 은 회수와 같은 여러 산업 분야에서 응용되고 있다. 미생물 세포의 프로테아제는 전 세계의 산업적 효소 판매의 3분의 1 이상에 달하는 주요 부분을 차지한다 (Cherry and Fidantsef, 2003). 시판중에 있는 프로테아제의 약 90%는 세제 효소이다 (Gupta et al., 2002). 대부분의 시판용 프로테아제는 주로 중성 및 알칼리성으로서 바실러스 속에 속하는 유기체에 의해 생성된다.

[0003] 서브틸리신 계열 또는 바실러스 종에 의해 생성된 서브틸리신의 세린 프로테아제가 산업상 프로테아제의 가장 큰 서브그룹을 형성한다. 이들 효소는 단백질 분해 성분 또는 세정 세제의 첨가제로서 산업상 중요하다. 현재 시판되어 사용되고 있는 세제 제제는 바실러스 종으로부터 유래된 천연 알칼리성 세린 프로테아제를 포함하며 재조합 프로테아제 제제이다 (Maurer, 2004). 향상된 촉매 효능 및/또는 온도, 산화제 및 세정 조건의 변화에 대해 보다 양호한 안정성을 갖는 천연 효소의 변이체가 부위-특이적 및/또는 랜덤 돌연변이를 통해 개발되어 왔다. 상업적 프로테아제의 예로는 서브틸리신 칼스버그 (알칼라제(Alcalase)®, Novozymes, DK), 서브틸리신 309 (사비나제(Savinase)®, Novozymes, DK), 서브틸리신 147 (에스페라제(Esperase)®, Novozymes, DK), 카나제(Kannase)® (Novozymes, DK), 퓨라팩트(Purafect)® (Genencor Inc., USA), 퓨라팩트® Ox, 프로페라제(Properase)® (Genencor Inc., USA) 및 BLAP S 및 X 시리즈 (Henkel, DE)를 들 수 있다.

[0004] 또한, 여러 알칼리성 세린 프로테아제 (EC 3.4.21) 및 이들 효소를 암호화한 유전자가 효모 및 사상 진균을 포함한 진핵 유기체로부터 분리되었다. 미국특허 제3,652,399호 및 EP 519229 (Takeda Chemical Industries, Ltd., JP)에는 푸사리움 속 (무성 상태, 완전 세대) 또는 지베렐라 (무성 상태, 불완전 세대), 특히 푸사리움 종 S-19-5 (ATCC 20192, IFO 8884), F. 옥시스포룸 f. sp. *lini* (IFO 5880) 또는 G. 사우비네티 (ATCC 20193, IFO 6608)로부터 유래되고 세제 및 다른 세정제 조성물의 제형에 유용한 알칼리성 프로테아제가 기술되어 있다. WO 88/03946 및 WO 89/04361 (Novo Industri A/S, DK)에는 효소 세제 첨가제가 기술되어 있고, 또한 푸사리움, 특히 F. 옥시스포룸 또는 F. 솔라니로부터 유래된 진균 프로테아제 및 리파제를 포함한 세제 조성물이 기술되어 있다. WO 89/06270에는 단지 한 개 또는 두 개의 특정 아미노산에 인접한 펩타이드 결합에 대해 특이성을 갖는 프로테아제를 포함한 세제 첨가제가 기술되어 있다. WO 1994025583 (NovoNordisk A/S, DK)에는 푸사리움 종, 특히 F. 옥시스포룸 균주 (DSM 2672)로부터 유래된 활성 트립신-유사 프로테아제 효소 및 이를 암호화한 DNA 서열이 기술되어 있다. WO 2006101140 (SODX Co. Ltd., Nakamura)에는 푸사리움 종 BLB (FERM BP-10493)으로부터 유래된 신규 프로테아제의 아미노산 서열이 기술되어 있다. 또한, 트리티라치움 및 코니디오볼루스와 같은 진균 종 유래의 알칼리성 프로테아제가 보고된 바 있다 (참조: Anwar and Saleemuddin, 1998).

[0005] 또한, 진균 세린 프로테아제의 다른 용도가 몇몇 특허원에 공지되어 있다. 예를 들면, WO 1992018599 (NovoNordisk A/S)에는 세제 첨가제 또는 조성물로의 셀룰라제와 프로테아제, 특히 푸사리움 종 DSM 2672 유래의 트립신-유사 프로테아제의 배합이 기술되어 있다. 이러한 세제 조성물은 추가로 WO 1992003529 및

[0006] WO 1992005239 (NovoNordisk A/S)에 기술된 바와 같이 효소를 안정시키기 위한 가격적 프로테아제 억제제를 포함할 수 있다. WO 1997028243 (NovoNordisk A/S)에는 셀룰로즈 결합 도메인을 포함한 아미노산 서열에 연결된 그러한 프로테아제의 촉매적 활성 아미노산 서열을 포함한 효소 하이브리드를 사용하여 셀룰로즈 직물로부터 오염물 또는 얼룩을 제거 또는 표백하는 방법이 기술되어 있다. WO 1997002753 (NovoNordisk A/S)에는 리파제와 프로테아제, 바람직하게는 푸사리움으로부터 수득가능한 세린 프로테아제를 사용하여 오염된 프로세스 장비를 가볍게 세정하는 방법이 기술되어 있다. EP 1464626 특허원 (Biovitis S.A., FR)에는 폐수중의 유기물을 감소

시키기 위한 F. 에퀴세티 및 기타 진균의 용도가 기술되어 있다.

- [0007] 사회경제적 도전 및 정부 규제에 의해 세계 산업은 소량으로 사용하여 환경 폐기물의 생성량을 줄일 수 있는 보다 규제에 부합하는 화합물질의 사용뿐만 아니라 에너지 절감의 필요성도 포함하는 많은 환경적 측면을 고려하게 되었다. 세제 효소, 특히 프로테아제는 세제 조성물에서 중요한 성분이다. 세정 온도를 낮춤으로써의 에너지를 절감할 필요성, 고온에 견딜 수 없는 합성 섬유 사용 증가 및 현대의 생활 방식으로 인해 소비자의 습관은 낮은 세정 온도를 선택하는 쪽으로 변했고 저온에서 효과적인 새로운 효소의 요구가 대두되었다.
- [0008] 다양한 미생물 유래의 세린 프로테아제, 예를 들면 액티노마이세테 (노카르디오프시스 다손빌레이) 및 진균 (패실로마이세스 마르쿠안디) 미생물 유래의 저온 알칼리성 프로테아제가 기술되어 있는 많은 특허 공보, 평론 및 논문[예를 들면, EP 0290567 및 EP 0290569 (Novo Nordisk A/S, DK)]이 공개되어 있다는 사실에도 불구하고, 단백질성 물질을 특히 저온 또는 중온의 온도 범위에서 변형, 분해 및 제거하는데 적합하고 효과적이며 고도로 다양한 특성을 갖는 세제의 존재 하에서 안정한 또 다른 세린 프로테아제에 대한 상당한 필요성이 여전히 남아 있다.
- [0009] 세계 산업은 그들의 신제품에 소비자의 습관 및 요구, 새로운 직물 제품 및 새로운 세정기의 특성을 적용하는데 상당히 앞서나가고 있다. 새로운 세제, 특히 세탁 및 접시-세척 조성물을 개발할 때 다양하고 급변하는 광범위한 요구를 만족시켜야 한다는 것은 분명하다. 세계 산업 및 정부 규제의 다양한 모든 요건을 충족하기 위해 세제 조성물을 위한 새로운 세린 프로테아제 성분은 넓은 pH 및 온도 범위에서 그 성능을 발휘할 수 있어야 할 뿐만 아니라 여러 가지 상이한 세제와의 배합에 따른 기계적 및 화학적 간섭을 포함한 다양한 조건에서 안정을 유지할 수도 있어야 하며, 또한 비용면에서 효율적인 하향식 공정이 가능하여 발효액 및 균사체로부터 간단한 분리 의해 세린 프로테아제의 대량 생산이 가능해야 한다.

**발명의 내용**

- [0010] 본 발명의 목적은 넓은 기질 특이성을 나타내고, 넓은 pH 범위에서 활성이며, 넓은 최적 온도 범위를 갖는, 즉 저온 및 중온 모두에서 작용하는 진균 기원의 세린 프로테아제를 제공하는 것이다. 또한, 세탁 및 세정 세제용 세린 프로테아제는 세제의 존재 하에 안정하거나 또는 세제와 혼화 가능해야 한다. 특히, 본 발명의 목적은 세탁물 및 접시 세척시 오염물을 포함한 단백질성 물질을 현재 시판되고 있는 효소제보다 낮은 온도에서 제거하여 에너지를 저감할 수 있는 세린 프로테아제를 제공하는 것이다. 진균 세린 프로테아제는 고수율의 진균 숙주에서 그리고 하향식 공정으로 생성할 수 있고, 예를 들면 발효액 및 균사체의 분리를 실시하는 것이 간편하다.
- [0011] 본 발명은 세린 프로테아제 활성을 나타내고 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe<sub>RF6318</sub> 효소의 아미노산 서열 또는 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe<sub>RF6318</sub> 효소의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 진균 세린 프로테아제 효소에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 효소는 푸사리움 에퀴세티 (*Fusarium equiseti*), 더욱 바람직하게는 기탁 균주 CBS 119568로부터 수득할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 효소는 분자량이 25 내지 35 kDa이다. 이 효소는 pH 9에서의 최적 온도 범위가 30°C 내지 70°C이다. 이 효소의 최적 pH 범위는 50°C에서 pH 6 내지 pH 11이다. 최적 온도 및 pH는 15분의 반응 시간과 기질로서 카세인을 사용하여 결정되었다. 본 발명의 세린 프로테아제는 10°C 내지 60°C에서 세제의 존재 하에 단백질 얼룩을 분해 또는 제거할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 진균 세린 프로테아제 효소는 수탁번호 DSM 22171로 기탁된 이. 콜라이 RF7664에 내재된 뉴클레오타이드 서열번호 9를 포함한 플라스미드 pALK2521에 포함된 폴리뉴클레오타이드와 엄중조건하에서 하이브리드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0015] 상기 효소는 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe<sub>RF6318</sub> 효소의 아미노산 서열 또는 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe<sub>RF6318</sub>의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 바람직하게는, 상기 효소는 뉴클레오타이드 서열번호 14를 포함한 분리된 핵산 분자에 의해 암호화된다.
- [0016] 본 발명의 전장 진균 세린 프로테아제 효소는 수탁번호 DSM 22172로 기탁된 에스케리키아 콜라이 RF7800에 내재된 pALK2529에 포함된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0017] 진균 세린 프로테아제 효소는 적합한 숙주에서 세린 프로테아제 암호화 유전자의 발현을 유도할 수 있는 조절

서열에 작동적으로 연결된 본 발명의 진균 세린 프로테아제 암호화 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터로부터 생성된다. 적합한 숙주는 이종 숙주, 바람직하게는 트리코더마 (*Trichoderma*), 아스퍼질러스 (*Aspergillus*), 푸사리움 (*Fusarium*), 후미콜라 (*Humicola*), 크리소스포리움 (*Chrysosporium*), 뉴로스포라 (*Neurospora*), 리조푸스 (*Rhizopus*), 페니실리움 (*Penicillium*) 및 모르티에렐라 (*Mortierella*) 속의 미생물 숙주를 포함한다.

[0018] 바람직하게는 상기 효소는 트리코더마 또는 아스퍼질러스에서 생성되며, 가장 바람직하게는 T. 리세이 (*T. reesei*)에서 생성된다.

[0019] 또한, 본 발명은 (a) 세린 프로테아제 활성을 나타내며 서열번호 15로 규정된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자; (b) 세린 프로테아제 활성을 나타내며 서열번호 15의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자; (c) 서열번호 10으로 규정된 뉴클레오타이드 서열의 암호화 서열을 포함하는 핵산 분자; (d) DSM 22171 또는 DSM 22172에 함유된 폴리뉴클레오타이드 서열의 암호화 서열을 포함하는 핵산 분자; (e) 유전자 암호의 축퇴로 인해 (c) 또는 (d) 중 어느 하나의 핵산 분자의 암호화 서열과 암호화 서열이 상이한 핵산 분자; (f) DSM 22171에 함유된 핵산 분자와 엄중조건하에서 하이브리드화하고, 세린 프로테아제 활성을 나타내고 서열번호 15로 규정된 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자로 이루어진 그룹 중에서 선택된 진균 세린 프로테아제 효소를 암호화한 분리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 적합한 숙주에서 상기 세린 프로테아제 암호화 유전자의 발현을 유도할 수 있는 조절 서열에 작동적으로 연결된 본 발명의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다. 적합한 숙주는 이종 숙주, 바람직하게는 트리코더마, 아스퍼질러스, 푸사리움, 후미콜라, 크리소스포리움, 뉴로스포라, 리조푸스, 페니실리움 및 모르티에렐라 속의 미생물 숙주를 포함한다. 바람직하게는 상기 효소는 트리코더마 또는 아스퍼질러스에서 생성되며, 가장 바람직하게는 T. 리세이에서 생성된다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기된 바와 같이 재조합 발현 벡터를 포함한 숙주 세포에 관한 것이다. 바람직하게는 숙주 세포는 사상 진균과 같은 미생물 숙주이다. 바람직한 숙주는 트리코더마, 아스퍼질러스, 푸사리움, 후미콜라, 크리소스포리움, 뉴로스포라, 리조푸스, 페니실리움 및 모르티에렐라 속의 진균이다. 더욱 바람직한 숙주는 트리코더마 또는 아스퍼질러스이며, 가장 바람직하게는 사상 진균인 T. 리세이이다.

[0022] 본 발명은 세린 프로테아제 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계 및 회수하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 핵산 서열에 의해 암호화된 세린 프로테아제 활성을 나타내고 상기된 방법에 의해 수득할 수 있는 폴리펩타이드가 본 발명에 속한다.

[0023] 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 단계, 세포로부터 폴리펩타이드를 회수하거나 배양 배지로부터 세포를 분리하는 단계, 및 상청액을 수득하는 단계를 포함하는 효소 제제의 수득 방법에 관한 것이다. 또한, 상기된 방법에 의해 수득할 수 있는 효소 제제가 본 발명에 속한다.

[0024] 본 발명은 본 발명의 세린 프로테아제 효소를 포함한 효소 제제에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 효소 제제는 또한 조정제의 존재 또는 부재 하에 프로테아제, 아밀라제, 셀룰라제, 리파제, 크실라나제, 만나아제, 큐티나제, 펙티나제 또는 옥시다제의 그룹중에서 선택된 다른 효소뿐만 아니라, 안정화제, 완충제, 계면활성제, 표백제, 조정제, 부패방지제, 증강제, 재오염방지제, 형광 증백제, 염료, 안료, 부식제, 마모제 및 보존제 등의 그룹 중에서 선택되는 적합한 첨가제도 포함할 수 있다.

[0026] 생산 숙주의 소비된 배양 배지는 그대로 사용할 수 있고, 또는 숙주 세포를 제거하거나 그리고/또는 배양 배지를 농축, 여과 또는 분획하여 사용할 수 있다. 또한, 배양 배지는 건조될 수 있다. 본 발명의 효소 제제는 액상, 분말 또는 과립의 형태일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 세린 프로테아제 효소 또는 효소 제제를 세제로, 섬유 처리제로, 울 처리제로, 헤어 처리제로, 피혁 처리제로, 식품 또는 사료 처리제로 또는 단백질성 물질의 변형, 분해 또는 제거와 관련된 모든 응용에 사용하기 위한 용도가 본 발명에 속한다. 특히 본 발명의 효소 또는 효소 제제는 액체 세제 및 분말 세제 중의 세제 첨가제로서 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

[0028] 도 1은 푸사리움 에퀴세티 RF6318 *Fe prtS8A* 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 추론된 아미노산 서열을 보여준

다. SignalP V3.0 프로그램에 의해 분석된 추정 신호 펩타이드는 소문자로 밀줄친 부분이다. pro 서열 및 이의 추론된 아미노산 서열은 소문자로 표기된 부분이다. 성숙한 뉴클레오타이드 및 펩타이드 서열은 대문자로 표기된 부분이다 (정제된 야생형 Fe\_RF6318 단백질로부터 결정된 N-말단 서열). 추정 인트론 서열의 위치는 이탤릭체 소문자로 뉴클레오타이드 서열 아래에 점선으로 표시된 부분이다. 정지 코돈은 서열 아래 별표로 표시되어 있다. 야생형 Fe\_RF6318 단백질로부터 수득된 N-말단 서열 및 펩타이드 서열은 회색 배경으로 하이라이트되어 있다.

도 1a는 *Fe prt8A* 유전자의 ATG 개시 코돈부터 CCT 코돈 (뉴클레오타이드 898 내지 900)까지의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 이 서열 영역은 Fe\_RF6318 단백질의 Met1 내지 Val278까지의 아미노산 서열을 암호화한다.

도 1b는 *Fe prt8A* 유전자의 CTC 코돈 (뉴클레오타이드 901 내지 903)으로부터 TAA 정지 코돈까지의 뉴클레오타이드 서열을 나타내고, 이 서열 영역은 Fe\_RF6318 단백질의 Leu279 내지 Ala412까지의 아미노산 서열을 암호화한다.

도 2는 트리코더마 리세이에서 *Fe prtS8A* 유전자를 발현하는데 사용된 카세트를 도식적으로 보여준다.

도 3은 12% SDS PAGE 겔 상에서 분석된 부분적으로 정제된 재조합 Fe\_RF6318 단백질을 보여준다. 레인 1은 부분적으로 정제된 Fe\_RF6318의 시료이고, 레인 2는 분자량 마커 (Bench Mark Protein Ladder, Invitrogen)이다.

도 4a는 15분의 반응시간 및 기질로서 카세인을 사용하여 pH 9에서 분석된 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 온도 프로필을 보여준다. 데이터 포인트는 3회의 개별 측정의 평균값이다.

도 4b는 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 활성에 미치는 pH의 영향을 보여준다. 사용된 완충액은 40 mM Britton-Robinson 완충액이고, 카세인이 기질로 사용되었으며, 반응 시간은 15분, 반응 온도는 50°C였다. 데이터 포인트는 3회의 개별 측정의 평균값이다.

도 5는 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 116, EMPA)에 대한 30°C, pH 9, 60분의 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제  $\alpha$ -사비나제 울트라® 16L (Novozymes A/S, DK) 및 퓨라펙트® 4000L (Genencor Inc., USA)가 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.

도 6은 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 116, EMPA)에 대한 50°C, pH 9, 60분의 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제  $\alpha$ -사비나제® 울트라 16L (Savinase® Ultra 16L) 및 퓨라펙트® 4000L (Purafect® 4000L)이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.

도 7a는 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 세제 분말 (Art 601, EMPA)의 존재 하에 40°C, 약 pH 10, 60분 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 퓨라펙트® 4000L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.

도 7b는 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 세제 분말 및 표백제 (Art 604 및 606, EMPA)의 존재 하에 40°C, 약 pH 10, 60분 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 퓨라펙트® 4000L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.

도 8a는 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 세제 분말 (Art 601, EMPA)의 존재 하에 50°C, 약 pH 10, 60분 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 퓨라펙트® 4000L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.

도 8b는 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 세제 분말 및 표백제 (Art 604 및 606, EMPA)의 존재 하에 50°C, 약 pH 10, 60분 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 퓨라펙트® 4000L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.

도 9는 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 액체 세제 아리엘  $\alpha$ -센서티브(Ariel Sensitive) 존재 하에 40°C, 약 pH 7.9, 60분 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 사

비나제® 울트라 16L 및 퓨라펙트® 4000L이 사용되었다. X축은 효소 용량 (활성 단위/ml)을, Y축은  $\Delta L^*$  (델타L\*)을 나타내고,  $\Delta L^* = \text{효소 처리된 직물의 광택 값 } L^* - \text{완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 } L^*$ .

도 10은 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 착색 식물용 액체 염기 세제의 상이한 농도 하에 30°C 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 퓨라펙트® 4000L 및 사비나제® 울트라 16L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값  $L^*$ .

도 10a는 5 g/l의 세제 농도 하에 pH 7.5 조건에서의 성능을 보여준다.

도 10b는 5 g/l (단백질로 계산된 효소 용량)의 세제 농도 하의 성능을 보여준다.

도 10c는 3.3 g/l의 세제 농도 하에 pH 7.4 조건에서의 성능을 보여준다.

도 10d는 1 g/l의 세제 농도 하에 pH 7.3 조건에서의 성능을 보여준다.

도 11은 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 식물용 액체 세제 아리엘 센서티브 (효소 블랭크)의 상이한 농도 하에 30°C 조건에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 퓨라펙트® 4000L 및 사비나제® 울트라 16L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값  $L^*$ .

도 11a는 5 g/l의 세제 농도 하에 pH 8 조건에서의 성능을 보여준다.

도 11b는 5 g/l (단백질로 계산된 효소 용량)의 세제 농도 하의 성능을 보여준다.

도 11c는 3.3 g/l의 세제 농도 하에 pH 7.9 조건에서의 성능을 보여준다.

도 11d는 1 g/l의 세제 농도 하에 pH 7.6 조건에서의 성능을 보여준다.

도 12는 로운더 오미터(Laundry Ometer) 시험에서 상이한 얼룩에 대한, 액체 세제 아리엘 센서티브의 존재 하에 (효소 블랭크) 30°C 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 사비나제® 울트라 16L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값  $L^*$ .

도 12a는 혈액/우유/잉크/PE-면 (Art 117, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 12b는 혈액/우유/잉크/면 (Art 116, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 12c는 풀 (Art 164, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 13은 로운더 오미터 시험에서 상이한 얼룩에 대한, 착색 식물용 액체 염기 세제의 존재 하에 30°C 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라펙트® 4000 L이 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값  $L^*$ .

도 13a는 혈액/우유/잉크/PE-면 (Art 117, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 13b는 혈액/우유/잉크/면 (Art 116, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 13c는 풀 (Art 164, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 13d는 코코아 (Art 112, EMPA)에 대한 성능을 보여준다.

도 14는 현장 규모의 세탁 시험으로 8 가지의 상이한 프로테아제 감수성 얼룩 (표 5)에 대한 Fe\_RF6318 효소 제제의 총 얼룩 제거 효능 (델타 %SR)을 보여준다.

도 14a는 프로테아제 제제의 용량을 활성에 따라 사용한 경우의 총 얼룩 제거 효능을 보여준다.

도 14b는 프로테아제 제제의 용량을 단백질의 양에 따라 사용한 경우의 총 얼룩 제거 효능을 보여준다.

도 15는 현장 규모의 시험으로 30°C의 조건에서 착색 식물용 액체 세제 염기의 존재하의 얼룩 제거 효과를 보여준다.

- 도 15a는 혈액/우유/잉크/면 (C-05-014/CFT)의 얼룩 제거를 보여준다.
- 도 15b는 혈액/우유/잉크/PE-면 (C-05-014/CFT)의 얼룩 제거를 보여준다.
- 도 15c는 초콜릿 우유/안료/면 (C-03-030/CFT)의 얼룩 제거를 보여준다.
- 도 15d는 땅콩기름/우유/면 (C-05-014/CFT)의 얼룩 제거를 보여준다.
- 도 15e는 난황/안료/면 (CS-38-010/CFT)의 얼룩 제거를 보여준다.
- 도 16은 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한 10℃ 내지 60℃의 온도, pH 9, 60분 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 사비나제 울트라® 16L (Novozymes A/S, DK), 퓨라팩트® 4000L (Genencor Inc., USA) 및 프로페라제® (Genencor Inc., USA)가 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.
- 도 16a는 10℃에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318 및 시판 프로테아제 제제의 성능을 보여준다.
- 도 16b는 20℃에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318 및 시판 프로테아제 제제의 성능을 보여준다.
- 도 16c는 30℃에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318 및 시판 프로테아제 제제의 성능을 보여준다.
- 도 16d는 40℃에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318 및 시판 프로테아제 제제의 성능을 보여준다.
- 도 16e는 50℃에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318 및 시판 프로테아제 제제의 성능을 보여준다.
- 도 16f는 60℃에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318 및 시판 프로테아제 제제의 성능을 보여준다.
- 도 17은 혈액/우유/잉크 얼룩 (Art 117, EMPA)에 대한, 3.3 g/l의 액체 염기 농도 하에 10℃ 및 20℃의 온도 조건에서의 재조합 Fe\_RF6318 단백질의 성능을 보여준다. 대조용으로 시판 제제 사비나제 울트라® 16L, 퓨라팩트® 4000L 및 프로페라제®가 사용되었다.  $\Delta L^*$  (델타L\*) = 효소 처리된 직물의 광택 값 L\* - 완충액만으로 (효소 블랭크) 처리된 직물의 광택 값 L\*.
- 도 17a는 10℃에서의 성능을 보여준다.
- 도 17b는 20℃에서의 성능을 보여준다.

서열 목록

- 서열번호 1 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제로부터 유래된 아미노말단 펩타이드 #3792의 서열.
- 서열번호 2 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제로부터 유래된 트립신 분해 펩타이드 1246.673의 서열.
- 서열번호 3 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제로부터 유래된 트립신 분해 펩타이드 3341.633의 서열.
- 서열번호 4 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제로부터 유래된 트립신 분해 펩타이드 1503.799의 서열.
- 서열번호 5 아미노말단 펩타이드 서열번호 1로부터 유도된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PR087의 서열.
- 서열번호 6 아미노말단 펩타이드 서열번호 1로부터 유도된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PR088의 서열.
- 서열번호 7 펩타이드 서열번호 4로부터 유도된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PR089의 서열.
- 서열번호 8 펩타이드 서열번호 4로부터 유도된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 PR090의 서열.
- 서열번호 9 프라이머 PR088 (서열번호 6) 및 PR089 (서열번호 7) 및 주형으로서 푸사리움 에퀴세티 RF6318 게놈 DNA를 사용하여 수득된 PCR 절편의 서열.
- 서열번호 10 전장 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제 유전자 (*Fe prtS8A*)의 뉴클레오타이드 서열.
- 서열번호 11 Met1부터 Ala412까지의 아미노산을 포함한 전장 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제 (Fe\_RF6318)의 추론된 아미노산 서열.
- 서열번호 12 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제의 전구효소의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열.
- 서열번호 13 전장 프로테아제의 아미노산 Ala21 내지 Ala412를 포함한 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제의 전구효소 형태의 아미노산 서열.

서열번호 14 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제의 성숙한 형태의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열.

서열번호 15 전장 효소의 아미노산 Ala124 내지 Ala412를 포함한 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제의 성숙한 형태의 아미노산 서열.

기탁

푸사리움 에퀴세티 RF6318은 네덜란드 우트레흐트 3508 AD 읍살랄란 8에 소재한 Centraalbureau Voor Schimmelcultures에 2006년 4월 7일에 기탁되었고 수탁번호 CBS 119568로 등록되었다.

플라스미드 pALK2521을 포함한 이. 콜라이 균주 RF7664는 독일 D-38124 브라운슈바이그 인호펜슈트라세 7 b에 소재한 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)에 2009년 1월 14일에 기탁되었고, 수탁번호 DSM 22171로 등록되었다.

플라스미드 pALK2529를 포함한 이. 콜라이 균주 RF7800은 독일 D-38124 브라운슈바이그 인호펜슈트라세 7 b에 소재한 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)에 2009년 1월 14일에 기탁되었고, 수탁번호 DSM 22172로 등록되었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0029] 본 발명은 넓은 기질 특이성을 나타내며, 높은 pH 범위에서 안정하고, 넓은 최적 온도 범위를 갖는, 즉 저온 및 중온 모두에서 양호한 성능을 나타내는 진균 기원의 세린 프로테아제를 제공한다. 효소는 세제 용품에 이상적이고, 산화제와 킬레이트제에 견디며 세제 용액 중의 낮은 효소 수준에서 효과적이다. 특히, 세린 프로테아제는 10℃ 정도의 낮은 온도에서 활성이며, 바람직한 온도 범위는 10℃ 내지 60℃이다. 따라서, 본 발명은 세제 및 다른 용품에 사용하기 위한 또 다른 세린 프로테아제를 제공한다. 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 고수율의 진균 숙주에서 이의 하향 공정 (예, 발효액과 균사체의 분리가 실시하기 쉽다)으로 생성될 수 있다.
- [0030] 본 발명과 관련하여 사용된 용어 "세린 프로테아제" 또는 "세린 엔도펩티다제" 또는 "세린 엔도프로티나제"는 국제 생화학 및 분자생물학 협회의 명명법에 따라 EC 3.4.21로 분류된 효소를 의미한다. 세린 프로테아제는 단일 세포 및 복합 유기체 모두에서 발견된다. 이들의 구조적 유사성을 기준으로, 세린 프로테아제는 최소 6개의 군 (SA, SB, SC, SE, SF 및 SG; S는 세린 프로테아제를 표기한 것이다)으로 나뉘며, 각 군은 유사한 아미노산 서열과 3차원 구조를 갖는 계열의 아군으로 더 나뉜다 (참조예: 세린 프로테아제 홈페이지 <http://www.biochem.wustl.edu/~protease/>, Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University of Medicine, St. Louis, MO, USA). 이들 단백질 가수분해 또는 분해 효소는 이들의 활성 부위에 친핵성 세린 그룹의 존재하는 것을 특징으로 하고, SA 군 및 SB 군의 프로테아제는 또한 세린과 함께 촉매성 3잔기를 형성하는 필수 아스파테이트와 히스티딘 잔기를 가짐으로써 구분된다.
- [0031] 주요 군은 카이모트립신, 트립신 및 엘라스타제를 포함하는 "카이모트립신-유사" 세린 프로테아제 (SA 군) 및 "서브틸리신-유사" 세린 프로테아제 (SB 군)를 포함한다. 이 효소들은 절단 부위를 에워싼 아미노산 잔기의 측쇄를 기초로 폴리펩타이드 쇄의 다른 영역을 표적으로 한다. 본 발명의 세린 프로테아제는 SB 군에 속한다.
- [0032] 성장확인된 "서브틸리신-유사 세린 프로테아제" 또는 "서브틸라제"는 일반적으로 세균 기원이다. B. 아밀로리퀴파시엔스, B. 리체니포르미스 및 B. 서브틸리스와 같은 다양한 바실러스 (Rao et al., 1998)로 대표되는 상기 프로테아제 부류는 티로신, 페닐알라닌 및 류신과 같은 방향족 또는 소수성 잔기에 대해 특이적이다.
- [0033] 본 발명에서 사용된 용어 "세린 프로테아제 활성"은 카세인, 헤모글로빈, 케라틴 및 BSA와 같은 단백질 함유 기질에 대한 가수분해 활성을 의미한다. 단백질분해 활성을 분석하는 방법은 문헌에 잘 공지되어 있으며 예를 들면 Gupta et al.(2002)를 참조로 한다.
- [0034] 프로테아제는 그룹 특이적 억제제를 사용하여 분류할 수 있다. "세린 프로테아제 억제제"의 다양한 그룹은 화학 합성 억제제 및 천연 단백질성 억제제를 포함한다. 천연 억제제의 한 그룹은 항트롬빈 및 알파 1-항트립신과 같은 세르핀 (세린 프로테아제 억제제의 약어)이다. 인공 합성 억제제는 3,4-디클로로이소쿠마린 (3,4-DCI), 디이소프로필플루오로포스페이트 (DFP), 페닐메틸설포닐 플루오라이드 (PMSF) 및 토실-L-라이신 클로로메틸 케톤 (TLCK)를 포함한다. 세린 프로테아제 중 일부는 활성 부위 근처에 시스테인 잔기가 존재하기 때문에 p-클로로머큐리벤조에이트 (PCMB)와 같은 티올 시약에 의해 억제된다. 따라서, 세린 프로테아제 활성은 특이적 기질의 절단에 기초한 검정 또는 적합한 조건 하에서 세린 프로테아제의 특이적 억제제의 존재 또는 부재 하에

임의의 단백질 함유 기질을 사용한 검정으로 결정될 수 있다.

- [0035] 세린 프로테아제는 일반적으로 중성 또는 알칼리성 pH에서 활성이고, 최적의 pH는 7 내지 11이고, 넓은 기질 특이성을 갖는다. "알칼리성 세린 프로테아제"는 pH 9 내지 pH 11에서 또는 pH 10 내지 12.5에서 조차 (Shimogaki et al., 1991) 활성이 안정하며, pH 9 정도에서 등전점을 갖는 효소를 의미한다. 이들 효소는 상업적 세린 프로테아제의 가장 큰 서브그룹을 나타낸다. 알칼리성 세린 프로테아제의 분자량은 15 내지 35 kDa이다. 천연 세린 프로테아제의 최적 온도는 60°C 정도이다 (Rao et al., 1998).
- [0036] 프로테아제 활성을 생성할 수 있는 미생물 균주는 선별될 수 있으며, 상이한 기질에 대한 활성은 결정될 수 있다. 선택된 균주는 적합한 배지에서 배양할 수 있다. 충분한 양의 목적하는 세린 프로테아제가 생성된 후, 이 효소는 분리 또는 정제할 수 있으며, 그 성질은 더 완벽히 특성화할 수 있다. 대안으로서, 다양한 유기체 중의 세린 프로테아제 암호화 유전자를 분리할 수 있으며 이 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열은 본원의 실시예에서 분리되고 정상화된 세린 프로테아제의 아미노산 서열과 비교할 수 있다.
- [0037] 생성된 프로테아제 효소, 특히 세린 프로테아제는 염 제조, 한외여과, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 겔 여과 및 소수성 상호작용 크로마토그래피와 같은 효소 화학의 통상적인 방법을 사용하여 정제할 수 있다. 정제는 단백질 결정, 효소 활성 검정 및 SDS 폴리알킬아미드 겔 전기영동으로 모니터링할 수 있다. 정제된 효소의 다양한 온도 및 pH 값에서의 효소 활성 및 안정성뿐만 아니라 분자량 및 등전점도 결정할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 바람직한 세린 프로테아제의 정제는 실시예 1b에서 입증되었다. 여과된 배양 상청액은 Q Sepharose FF 컬럼에 적용되었다. 유동 분획은 페닐 Sepharose HP 컬럼에 적용되었고 단백질은 선형 감소 염구배로 용출되었다. 프로테아제 활성을 보여주는 분획을 모아 농축하여 Superdex 75 10/300 GL 컬럼에 적용하였다. 실시예 1b에 기술된 바와 같이 정제 후 레소루핀-표지된 카세인에 대한 활성 검정을 실시하였다. 당연히, 본원에 기술된 방법 대신에 또는 이외에 다른 공지된 정제 방법을 사용하여 본 발명의 효소를 분리하는 것은 가능하다. 재조합 세린 프로테아제는 실시예 5에 기술된 바와 같이 정제되었고 pH 및 온도 프로파일의 정상화 인을 위해 사용되었다.
- [0039] 정제된 세린 프로테아제의 분자량은 질량분석법에 의해 또는 Laemmli (1970)에 따른 SDS-PAGE상에서 결정될 수 있다. 또한, 분자량은 효소의 아미노산 서열로부터 추정될 수 있다. 일반적으로, 성숙한 세린 프로테아제 또는 성숙한 세린 프로테아제 효소는 20 내지 35 kDa의 분자량을 가지며, 전형적으로는 대략 25 내지 30 kDa이다 (Rao et al., 1998).
- [0040] 세린 프로테아제는 불활성 "자이모겐 전구체" 또는 전전구효소의 형태인 "자이모겐"으로서 합성되며, 이들은 신호 서열 (분비 신호 펩타이드 또는 전펩타이드) 및 전구서열 (전구펩타이드)의 제거에 의해 활성화되어 성숙한 형태의 활성 효소로 생성된다 (Chen and Inouye, 2008). 이 활성화 프로세스는 프로테아제의 작용이 연루되어 있으며 세린 프로테아제의 한정된 자가분해 또는 자가촉매 프로세스에 기인할 수 있다. 전구서열은 예를 들어 생성의 해독 후 단계 동안에 또는 진행된 배양 배지에서 또는 배양 배지 또는 효소 제제의 저장시에 절단할 수 있다. 또한, 전구효소의 활성화는 불활성 전구효소를 활성 성숙 효소로 전환할 수 있는 단백질 분해 효소를 숙주 유기체가 배양된 배양 배지에 첨가함으로써 또는 배양 공정 후 단백질 분해 효소를 배양 상청액에 첨가함으로써 달성할 수 있다. 또한, 효소의 축소는 예를 들어 폴리펩타이드의 암호화 유전자를 생성 숙주로 형질전환하기 전에 절삭함으로써 달성할 수 있다.
- [0041] 용어 "성숙한"은 신호 서열과 전구 펩타이드의 제거 후 효소 활성 또는 촉매 활성을 위한 필수 아미노산을 포함하는 효소의 형태를 의미한다. 사상 진균에서 이것은 배양 배지 내로 분비된 천연 형태이다.
- [0042] 세린 프로테아제의 최적 온도는 실시예 1c, 실시예 5 또는 실시예 14에 기술된 바와 같이 기질로서 카세인을 사용함으로써 또는 문헌 (예, Gupta et al., 2002)에 기술된 다른 기질과 완충계를 사용함으로써 상이한 온도에서 적합한 완충액 중에서 결정할 수 있다. 최적 pH의 결정은 상이한 pH 값에서 적합한 완충액 중에서 단백질 기질에 대한 활성에 따라 실시할 수 있다.
- [0043] 프로테아제 활성은 일반적으로 가용성 기질의 분해를 기초로 한다. 세제 용도로서 프로테아제는 적어도 부분적으로 불용성인 물질에 작용해야 한다. 따라서, 세제 프로테아제에 중요한 변수는 이들 불용성 절편에 흡착하여 가수분해하는 능력이다.
- [0044] 세제 프로테아제의 선별에 중요한 다른 변수는 그 효소의 등전점 또는 pI 값이다. 세제 프로테아제는 이 효소가 작용하는 세제 용액의 pH 값이 그 효소의 pI 값과 거의 동일할 때 최고의 성능을 발휘한다. pI는 폴리알카

릴아미드, 전분 또는 아가로스로 구성되는 고정된 pH 구배 겔상에서 등전점 전기영동에 의해 또는 예를 들어 ExPASy 서버에서 pI/MW 툴 ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html); Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 아미노산 서열로부터 pI를 추산함으로써 결정될 수 있다.

- [0045] 정제된 프로테아제의 N-말단뿐만 아니라 내부 펩타이드는 실시예 2에 기술된 바와 같이 Edman 분해 화학법 (Edman and Begg, 1967)에 따라 또는 문헌에 기술된 다른 방법에 따라 서열분석될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 세린 프로테아제 효소는 세균, 고세균, 진균, 효모 및 고등 진핵생물 (예, 식물)을 포함한 임의의 유기체로부터도 유래될 수 있다. 바람직하게는 효소는 사상 진균 및 효소를 포함한 진균, 예를 들면 푸사리움을 포함한 그룹으로부터 선택된 속으로부터 기원한다. 진균 알칼리성 프로테아제가 세균 프로테아제보다 유리한데 그 이유는 미생물-유리 효소 또는 효소 조성물을 생성하는 하향 프로세싱의 간편함 때문이다. 균사체는 효소의 정제 이전에 여과 기술을 통해 쉽게 제거할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 넓은 온도 범위, 즉 저온 내지 중온, 예를 들면 10°C 내지 60°C에서 상당히 다양한 특성을 갖는 세제의 존재 하에 양호한 성능을 갖는 진균 세린 프로테아제에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에서 세제의 존재 하의 양호한 성능은 효소, 본원의 경우에는 본 발명의 진균 세린 프로테아제가 현재 시판되고 있는 많은 서브틸리신보다 낮은 온도 범위에서 작용함을 의미한다. 다시 말해서, 양호한 성능은 효소가 저온 내지 중온의 범위에서지만 특히 현재 시판되고 있는 제품, 예를 들면 시판 효소 제품 퓨라펙트® 4000L (Genencor Inc., USA)보다 낮은 온도 범위에서 단백질질 얼룩 또는 물질을 분해 또는 제거할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 저온 범위에서 작용한다. 예를 들면, pH를 변화시킴으로써, 효소 보호제를 포함한 적합한 특성을 갖는 세제를 선택함으로써 그리고 세정 조건을 조절함으로써 본 발명의 세린 프로테아제의 활성을 10°C 정도의 저온에서 유지할 수 있다. 따라서, 세정 조건 및 세제 중의 보조 성분 및 첨가제에 따라 본 발명의 세린 프로테아제는 50°C의 온도 또는 이하의 온도에서 특히 유용하다. 또한, 본 발명의 효소는 45°C 이하, 40°C 이하, 35°C 이하 또는 30°C 이하의 온도에서 작용한다.
- [0050] 세제의 존재 하에 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 10°C 내지 60°C에서 상기 정의된 바와 같이 작용한다. 실시예 6 내지 실시예 13에 비교 실시예가 기술되어 있으며, 도 7 내지 도 17로부터 델타L\* 또는 델타SR로 측정된 상이한 직물 재료 상의 많은 다른 얼룩에 대한 다양한 조건 및 다양한 처리에 노출된 진균 세린 프로테아제 Fe\_RF6318의 성능이 시판 제품 사비나제® 울트라 16L (Novozymes A/S, DK), 퓨라펙트® 4000L (Genencor Inc., USA) 및 프로페라제® 4000E (Genencor Inc., USA)의 성능보다 훨씬 더 양호함을 명백하다. 특히, 상기 진균 세린 프로테아제 Fe\_RF6318의 저온 내지 중온 범위, 예를 들면 10°C 내지 60°C에서의 얼룩 제거 효과는 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라펙트® 4000L에 비해 상당히 높다. 또한, 본 발명의 효소는 프로페라제® 4000E와 비교했을 때 30°C 내지 60°C의 범위에서 보다 높은 얼룩 제거능을 갖는다.
- [0051] 상기 실험 결과로부터, 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 세제 고객 및 세제 산업 및 세정 기기를 제공하는 산업의 상당히 다양한 요구를 만족시킬 수 있으며, 장래 규정 및 고객 습성의 요건에 아주 적합하다는 것으로 결론내릴 수 있다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 실시형태로서, 진균 세린 프로테아제 효소는 세린 프로테아제 활성을 가지며, 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 Fe\_RF6318의 성숙한 효소 또는 서열번호 15의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성 또는 서열번호 11의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드이다. 바람직한 효소는 86% 이상, 바람직하게는 87% 이상, 더욱 바람직하게는 88% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 90% 이상의 동일성을 보여준다. 더욱 바람직하게는 아미노산 서열은 서열번호 15의 아미노산 서열과 92% 이상 또는 94% 또는 96% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 보여준다. 두 효소의 동일성은 상응하는 서열 영역 내에서, 예를 들면 세린 프로테아제의 성숙한 또는 전장 영역 내에서 비교된다.
- [0053] 본 발명의 세린 프로테아제는 Fe\_RF6318로 표시되며 푸사리움 에퀴세티로부터 기원하는 분리된 세린 프로테아제로서 세린 엔도프로티나제의 SB 군 8 계열의 일원이다.
- [0054] 본원에서 용어 "동일성"은 거의 동일한 양의 아미노산을 갖는 상응하는 서열 영역 내에서 서로 비교된 두 아미노산 서열 사이의 동일성을 의미한다. 예를 들면, 두 아미노산 서열의 전장 또는 성숙한 서열의 동일성이 비교될 수 있다. 비교될 두 분자의 아미노산 서열은 한 개 이상의 위치에서 상이할 수 있지만, 분자의 생물학적 기능 또는 구조에 변형을 주지 않는다. 이러한 변이는 상이한 숙주 유기체 또는 아미노산 서열의 돌연변이 때문에 자연적으로 발생할 수 있거나, 또는 특이적 돌연변이 유도에 의해 달성될 수 있다. 변이는 아미노산 서열

중 한 개 이상의 위치에서의 결손, 치환, 삽입, 부가 또는 조합으로부터 기인할 수 있다. 서열의 동일성은 ClustalW 정렬을 사용함으로써 측정된다 (예, [www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw)). 사용된 매트릭스는 다음과 같다: BLOSUM, 공백 개시: 10, 공백 연장: 0.5.

- [0055] 바람직하게는 진균 세린 프로테아제는 푸사리움으로부터 획득될 수 있고, 더욱 바람직하게는 푸사리움 에퀴세티로부터 획득될 수 있다. 가장 바람직한 실시형태에 의하면, 본 발명의 세린 프로테아제는 Centraalbureau voor Schimmencultures에 수탁번호 CBS 119568로 기탁되어 있는 균주로부터 획득될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 바람직한 일 실시형태는 세린 프로테아제 활성 및 서열번호 15로 규정된 성숙한 Fe\_RF6318 효소의 아미노산 서열을 갖는 진균 세린 프로테아제 효소이다. 성숙한 효소에는 신호 서열 또는 전펩타이드 및 전구서열 또는 전구펩타이드가 없다. 본 발명의 성숙한 세린 프로테아제는 서열번호 11로 규정된 전장 프로테아제의 아미노산 Ala124 내지 Ala412를 포함한다. 따라서, 신호 서열 (전펩타이드) 및 전구펩타이드를 포함한 서열번호 11을 갖는 전장 Fe\_RF6318 효소 및 신호 서열 (전펩타이드)가 없는 성숙한 효소뿐만 아니라 신호 서열이 없음에 따라 서열번호 13을 갖는 전구효소 형태도 본 발명의 범위에 속한다.
- [0057] 본 발명은 그 성숙한 형태의 분자량이 20 내지 35 kDa, 바람직하게는 25 내지 33 kDa, 더욱 바람직하게는 28 내지 30 kDa인 진균 세린 프로테아제 효소에 관한 것이다. 가장 바람직한 분자량은 ExPASy 서버에서 Compute pI/MW 툴 (Gasteiger et al., 2003)을 사용하여 얻은 성숙한 폴리펩타이드에 대해 29 kDa인 Fe\_RF6318의 추론 분자량이다.
- [0058] 본 발명의 효소는 넓은 온도 범위에서 단백질성 물질을 분해하는데 효과적이다. 이 효소의 최적 온도는 실시예 5에 기술된 바와 같이 15분의 반응 시간 및 기질로서 카세인을 사용하여 pH 9에서 측정했을 때 30°C 내지 70°C (최대 활성의 약 20%), 바람직하게는 40°C 내지 60°C (최대 활성의 약 40% 이상), 더욱 바람직하게는 50°C 내지 60°C (최대 활성의 70% 이상), 가장 바람직하게는 60°C (최대 활성, Fe\_RF6318)이다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 일 실시형태로서, 진균 세린 프로테아제 효소는 적어도 pH 6 내지 pH 11의 pH 범위에서 최적 pH를 나타내며, 실시예 5에 기술된 바와 같이 15분의 반응 시간 및 기질로서 카세인을 사용하여 50°C 하의 pH 10에서 최대 활성의 40% 이상을 보여준다. 특히, 최적 pH는 50°C에서 pH 6 내지 pH 10 (최대 활성의 약 60%), 더욱 바람직하게는 pH 9 내지 pH 10 (최대 활성의 약 80%), 가장 바람직하게는 pH 10이다.
- [0060] 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 "세제의 존재 하에 양호한 성능"을 가지며, 즉 저온 범위에서, 특정적으로는 현 시판품, 예를 들어 상업적 효소 제품 퓨라펙트® 4000L (Genencor Inc., USA)보다 더욱 낮은 온도 범위에서 세제의 존재 하에 단백질성 얼룩 또는 물질을 분해 또는 제거할 수 있다. 세제의 존재 하에 본 발명의 효소는 10°C 내지 60°C, 바람직하게는 50°C 또는 그 이하에서 작용한다. 또한, Fe\_RF6318 효소는 45°C 또는 그 이하, 40°C 또는 그 이하, 또는 30°C 또는 그 이하의 온도에서 작용한다.
- [0061] 본 발명의 세린 프로테아제 효소는 추론된 아미노산 서열로부터 추정된 바와 같이 pI가 9 내지 9.5, 바람직하게는 9.1 내지 9.4이다. 본 발명에 따른 Fe\_RF6318 효소의 추론된 pI는 9.3이다.
- [0062] 정제된 효소의 N-말단 또는 트립신 분해 펩타이드의 아미노산 서열 상에서 합성된 올리고뉴클레오타이드 또는 이 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 획득한 PCR 생성물은 본 발명의 세린 프로테아제를 암호화한 cDNA 또는 게놈 유전자를 분리하는데 프로브로서 사용될 수 있다. 또한, 프로브는 상동 세린 프로테아제의 공지된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 기초로 디자인될 수 있다. 또한, 세린 프로테아제 클론은 효소에 대한 특이적 기질을 함유한 평판 상에서의 활성을 기초로 하거나 세린 프로테아제에 대해 특이적인 항체를 사용함으로써 선별할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 바람직한 실시형태에 의하면, 진균 세린 프로테아제 효소는 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)에 수탁번호 DSM 22171로 기탁된 이. 콜라이 RF7664 중의 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열을 포함한 플라스미드 pALK2521에 내포된 폴리뉴클레오타이드 또는 프로브 서열과 엄중 조건하에서 하이브리드화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0064] 본 발명에서 *Fe prt8A* 유전자는 실시예 3d에 기술된 바와 같이 엄중 하이브리드화를 사용하여 PCR에 의해 제조된 프로브로 분리하였다. 숙주 유기체의 cDNA 또는 게놈 DNA를 분리하는데 표준 분자 생물학 방법, 예를 들어 Sambrook 및 Russell, 2001과 같은 분자 생물학 안내서에 기술된 방법이 사용될 수 있다.
- [0065] 예를 들면, 100 내지 200개 이상의 뉴클레오타이드로 이루어진 서열번호 9와 같은 DNA 프로브와의 하이브리드화는 "고도의 엄중" 조건, 즉 완벽한 하이브리드의 계산된 융점 온도 (T<sub>m</sub>)보다 낮은 20-25°C의 온도에서의 하이브

리드화로 실시하는 것이 일반적이고, 상기 Tm은 Bolton 및 McCarthy (1962)에 따라 계산된다. 6xSSC (또는 6xSSPE), 5xDenhardt 시약, 0.5% (w/v) SDS, 100 µg/ml 변성되고 절편된 연어 정자 DNA 중에서 적어도 65°C에서 예비하이브리드화 및 하이브리드화를 실시하는 것이 일반적이다. 50% 포름아미드의 첨가는 예비하이브리드화 및 하이브리드화 온도를 42°C로 저하시킨다. 세척은 실온 (RT)에서 낮은 염 농도, 예를 들면 2xSSC-0.5% SDS (w/v)에서 15분간 실시하고, 이어서 실온에서 2xSSC-0.1% SDS (w/v), 마지막으로 적어도 65°C에서 0.1xSSC-0.1% SDS (w/v)에서 실시한다.

- [0066] 바람직한 일 실시형태에 의하면, 본 발명의 진균 세린 프로테아제 효소는 서열번호 15로 규정된 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드, 또는 서열번호 15의 아미노산 서열의 86% 이상 또는 서열번호 11의 아미노산 서열의 86% 이상을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 의해 암호화된다. 바람직한 효소는 적어도 86%, 바람직하게는 적어도 87%, 더욱 바람직하게는 적어도 88%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 보여준다. 더 더욱 바람직하게는 아미노산 서열은 서열번호 15의 아미노산 서열과 적어도 92%, 또는 적어도 94% 또는 96%, 더욱 바람직하게는 적어도 98%, 가장 바람직하게는 99%의 동일성을 보여준다. 두 효소의 동일성은 상응하는 서열 영역 내에서, 예를 들어 세린 프로테아제의 성숙한 또는 전장 영역 내에서 비교된다.
- [0067] 따라서, 성숙한 형태의 효소 이외에 전펩타이드 (신호 서열) 및 전구펩타이드를 포함한 본 발명의 전장 세린 프로테아제 효소의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자에 의해 암호화되고, 아미노산 서열이 서열번호 11로 규정되는 폴리펩타이드 서열이 본 발명의 범위에 속한다.
- [0068] 또한, 성숙한 형태의 효소 이외에 전구펩타이드를 포함한 본 발명의 세린 프로테아제 효소의 전구펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 의해 암호화되고, 아미노산 서열이 서열번호 13으로 규정되는 폴리펩타이드 서열이 본 발명의 범위에 속한다.
- [0069] 본 발명의 바람직한 일 실시형태는 서열번호 15를 갖는 성숙한 형태의 Fe\_RF6318 세린 프로테아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자에 의해 암호화된 진균 세린 프로테아제 효소이다.
- [0070] 바람직한 일 실시형태에 의하면, 본 발명의 진균 세린 프로테아제 효소는 성숙한 형태의 Fe\_RF6318 효소(서열번호 15)를 암호화하는 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자에 의해 암호화된다.
- [0071] 따라서, 효소에 대한 "암호 서열"을 포함하는 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 본 발명의 범위에 속한다. 표현 "암호 서열"은 해독 개시 코돈 (ATG)으로부터 개시되어 해독 정지 코돈 (TAA, TAG 또는 TGA)에서 정지하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 해독된 전장 폴리펩타이드는 보통 메티오닌으로 개시하고, 인트론 영역을 포함한다.
- [0072] 또한, Fe\_RF6318 전구효소 형태를 암호화하는 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 암호화된 진균 세린 프로테아제 효소가 본 발명의 범위에 속한다.
- [0073] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태에 의하면, 진균 세린 프로테아제는 수탁번호 DSM 22172로 기탁된 이. 콜라이 RF7800에 내재된 pAL2529에 포함된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다.
- [0074] 본 발명의 일 실시형태는 상기 특성화된 진균 세린 프로테아제 효소를 암호화하고 적합한 숙주에서 세린 프로테아제 암호화 유전자의 발현을 유도할 수 있는 조절 서열에 작동적으로 연결된 핵산 분자를 포함한 재조합 발현 벡터로부터 생성된 세린 프로테아제 효소이다. 상기 재조합 발현 벡터의 삭제 및 상기 벡터의 사용은 실시예 4에 보다 상세히 기술되어 있다.
- [0075] 진균 세린 프로테아제 효소의 생성에 적합한 숙주는 세균, 효모 및 진균을 포함한 세균 숙주와 같은 동종 또는 이종 숙주이다. 트리코더마, 아스퍼질러스, 푸사리움, 후미콜라, 크리소스포리움 뉴로스포라, 리조푸스, 페니실리움 및 모티리엘라와 같은 사상 진균이 효소 산물의 하향 프로세싱 및 회수의 간편함으로 인해 바람직한 생성 숙주이다. 적합한 숙주는 T. 리세이, A. 나이거, A. 오리제, A. 소제, A. 아와모리 또는 A. 자포니쿠스의 균주, F. 베네나툼 또는 F. 옥시스포룸, H. 인솔렌스 또는 H. 라누기노사, N. 크라사 및 C. 록노렌스와 같은 종을 포함하며, 이들 중 일부는 예를 들어 상업적 효소의 AMFEP 2007 목록 (<http://www.amfep.org/list.html>)에서 효소 생성 숙주 유기체로 수록되어 있다. 더욱 바람직하게는 효소가 T. 리세이 또는 A. 나이거, A. 오리제 또는 A. 아와모리와 같은 트리코더마 속 또는 아스퍼질러스 속의 사상 진균 숙주에서 생성된다. 본 발명의 가장 바람직한 실시형태에 의하면, 진균 세린 프로테아제 효소는 T. 리세이에서 생성된다.
- [0076] 또한, 본 발명은 (a) 세린 프로테아제 활성을 가지며 서열번호 15로 규정된 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자; (b) 세린 프로테아제 활성을 가지며 서열번호 15와 86% 이상의 동일성을 갖는 폴리

펩타이드를 암호화하는 핵산 분자; (c) 서열번호 10으로 규정된 뉴클레오타이드 서열의 암호 서열을 포함한 핵산 분자; (d) DSM 22171 또는 DSM 22172에 함유된 폴리뉴클레오타이드 서열의 암호 서열을 포함한 핵산 분자; (e) 암호 서열이 유전자 암호의 축퇴로 인해 (c) 또는 (d)중 어느 하나의 핵산 분자의 암호 서열과 상이한 핵산 분자; (f) DSM 22171에 함유된 핵산 분자와 엄중 조건 하에서 하이브리드화하고, 세린 프로테아제 활성을 나타내며 서열번호 15로 규정된 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 보여주는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자로 이루어진 그룹 중에서 선택된 진균 세린 프로테아제 효소를 암호화하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다.

- [0077] 본 발명의 핵산 분자는 RNA 또는 DNA일 수 있으며 여기서 DNA는 게놈 DNA 또는 cDNA일 수 있다.
- [0078] 게놈 및 플라스미드 DNA의 분리, DNA의 분해에 의한 DNA 절편의 생성, 서열분석, 이. 콜라이 형질전환 등을 포함하여 본 발명의 진균 세린 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 분리 및 효소 처리에 표준 분자 생물학 방법이 사용될 수 있다. 기본적인 방법은 표준 분자 생물학 안내서(예, Sambrook and Russell, 2001)에 기술되어 있다.
- [0079] Fe\_RF6318 폴리펩타이드를 암호화한 *Fe prtS84* 유전자의 분리는 실시예 3에 기술되어 있다. 간단히 설명하면, 축퇴성 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 서열 (서열번호 6 및 서열번호 7)을 사용함으로써 수득된 866 bp PCR 절편을 사용하여 pBluescript II KS+ 벡터 중의 푸사리움 에퀴세티 RF6318로부터 *Fe prt84*를 분리하였다. 전장 푸사리움 에퀴세티 *Fe prtS84* 유전자는 DSMZ 배양 기관에 수탁번호 DSM 22172로 기탁된 이. 콜라이 내재된 플라스미드 pALK2529에 내포되어 있었다. 세린 프로테아제의 유추된 아미노산 서열은 DNA 서열로부터 분석되었다.
- [0080] 푸사리움 에퀴세티 세린 프로테아제 *Fe prtS84*의 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 10) 및 유추된 서열 (서열번호 11)은 도 1a 및 도 1b에 제시되어 있다. 이 유전자의 길이는 1303 bp (정지 코돈을 포함)이다. 64 bp의 길이를 갖는 한 개의 추정 인트론이 발견되었다. 유추된 단백질은 서열은 20개 아미노산의 추론된 신호 서열 (SignalP V3.0; Nielsen et al., 1997 및 Nielsen and Krogh, 1998) 및 Ala21부터 Arg123까지의 전구펩타이드를 포함하여 412개 아미노산으로 구성된다. 야생형 Fe\_RF6318로부터 정제된 펩타이드는 유추된 아미노산 서열과 정합하였으며, 이는 클로닝된 유전자가 CBS 배양 기관에 수탁번호 CBS 119568로 기탁된 푸사리움 에퀴세티 속주 RF6318로부터 정제된 프로테아제를 암호화함을 가리킨다. 성숙한 폴리펩타이드의 추정 분자량은 29 kDa이고 추정 pI는 9.30이었다. 이들 추정치는 ExPASy 서버에서 Compute pI/MW 툴을 사용하여 얻은 것이다 (Gasteiger et al., 2003). 추론된 아미노산 서열은 두 개의 가능한 N-당화 부위 (Asn77 및 Asn255)를 함유하였으나, CBS 서버 NetNGlyc V1.0에 따르면 단지 1개 부위, Asn77 (전구 서열에 위치함)만이 가능하다. 공개된 프로테아제 서열과의 상동성은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 프로그램 버전 2.2.9를 사용하여 조사하였다 (Altschul et al., 1990). 성숙한 Fe\_RF6318 서열과 동종 서열의 상응하는 영역의 동일성 값은 ClustalW 정렬 (매트릭스: BLOSUM, 공백 개시: 10, 공백 연장: 0.5 (예, www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw))을 사용하여 얻었고 표 3에 수록되어 있다.
- [0081] 본 발명의 세린 프로테아제 Fe\_RF6318은 지베렐라 제에 가설 단백질 PH-1인 유전자좌 태그 FG03315.1 (미공개된 EMBL 등록번호 XP\_383491), T. 하르지아눔 CECT 2413 세린 엔도펩티다제 (EMBL 등록번호 CAL25508, Suarez et al., 2007) 및 T. 아트로비리데 알카리성 프로티나제 전구체 S08.066인 ALP (EMBL 등록번호 M87516, Geremia et al., 1993) (Catalyst Bioscience Inc.의 미국특허 제60/818,910호에서 서열번호 313의 아미노산 서열로 공지됨)과 최고의 동일성을 보였다. G. 제에 가설 단백질과의 동일성은 전장 효소의 85% 이내였다. 신호 서열이 없는 성숙한 폴리펩타이드와 전구펩타이드를 정렬하였을 때 동일성은 85%였다. T. 하르지아눔 CECT 2413 세린 엔도펩티다제와의 동일성은 70% (전장 효소) 및 75% (성숙한 효소)였다. T. 아트로비리데 ALP와의 동일성은 69% (전장 효소) 및 74% (성숙한 효소)였다.
- [0082] 따라서, 서열번호 15로 규정된 Fe\_RF6318 효소의 성숙한 형태의 아미노산 서열, 즉 서열번호 11의 전장 세린 프로테아제의 아미노산 Ala124 내지 Ala412를 포함하는 진균 세린 프로테아제 효소 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 분리된 핵산 분자가 본 발명의 범위에 속한다.
- [0083] 또한, 세린 프로테아제 활성을 나타내고 서열번호 15의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성 또는 서열번호 11의 아미노산 서열과 86% 이상의 동일성을 갖는 진균 세린 프로테아제 폴리펩타이드의 절편을 암호화하는 핵산 분자가 본 발명의 범위에 속한다. 바람직한 효소는 적어도 86%, 바람직하게는 적어도 87%, 더욱 바람직하게는 적어도 88%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 90%의 동일성을 보여준다. 더 더욱 바람직하게는 아미노산 서열은 서열번호 15의 아미노산 서열과 적어도 92%, 또는 적어도 94% 또는 96%, 더욱 바람직하게는 적어도 98%, 가장 바람직하게는 99%의 동일성을 보여준다. 두 효소의 동일성은 상응하는 서열 영역내, 예를 들어 세린 프로테아제의

전장 또는 성숙한 영역 내에서 비교된다.

- [0084] 바람직하게는 핵산 분자는 본 발명에 따른 진균 세린 프로테아제 효소의 전장 형태를 암호화하는 서열번호 10으로 규정된 암호 서열을 포함한 분자이다.
- [0085] 본 발명의 분리된 핵산 분자는 DSM 22171 또는 DSM 22172에 함유된 폴리뉴클레오타이드 서열의 암호 서열을 포함한 분자일 수 있다. DSM 22171은 전장 *Fe prtS8A* 유전자를 클로닝하는데 사용된 PCR 절편의 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 9)을 함유한다. DSM 22172는 전장 *Fe prtS8A* 유전자의 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 10)을 함유한다.
- [0086] 또한, 본 발명의 핵산 분자는 상기 규정된 뉴클레오타이드 서열의 유사체일 수 있다. "축퇴"는 한 개 이상의 뉴클레오타이드 또는 코돈에서 상이하지만 본 발명의 재조합 프로테아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 유사체를 의미한다.
- [0087] 또한, 핵산 분자는 수탁번호 DSM 22171로 기탁된 이. 콜라이에 내재된 플라스미드 pALK2521에 내포되고, 세린 프로테아제 활성을 나타내고 상응하는 서열 영역내에서 서열번호 15로 규정된 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 보여주는 폴리펩타이드를 암호화하는 PCR 프로브와 엄중 조건 하에서 하이브리드화하는 핵산 분자일 수 있다. 하이브리드화 DNA는 푸사리움 종에 속하는 진균으로부터 유래될 수 있거나 다른 진균 종으로부터 기원할 수 있다.
- [0088] 따라서, 서열번호 10, 서열번호 12 또는 서열번호 14로 규정된 뉴클레오타이드 서열을 포함한 분리된 핵산 분자 또는 이의 유사체가 본 발명의 범위에 속한다.
- [0089] 또한, 본 발명은 적합한 원핵생물 또는 진핵생물 숙주에서 해당 세린 프로테아제를 암호화하는 핵산 서열 또는 유전자를 증식 또는 발현하기 위해 사용될 수 있는 재조합 발현 벡터 또는 재조합 발현 작제물에 관한 것이다. 재조합 발현 벡터는 적합한 숙주에서 세린 프로테아제 암호화 서열의 발현 및 분비를 촉진 또는 유도하는 DNA 또는 핵산 서열, 예를 들면 상기 세린 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터, 인핸서, 터미네이터 (전사 및 해독 종결 신호를 포함함) 및 신호 서열을 포함한다. 또한, 발현 벡터는 형질전환 균주의 선별을 위한 마커 유전자를 포함하거나 선별 마커가 공동형질전환에 의해 다른 벡터 작제물로서 그 숙주에 도입될 수 있다. 상기 조절 서열은 생성 유기체에 동종 또는 이종일 수 있고, 또는 이들 서열은 세린 프로테아제를 암호화하는 유전자가 분리된 유기체로부터 기원할 수 있다.
- [0090] 사상 진균 숙주에서 본 발명의 세린 프로테아제를 발현하기 위한 프로모터의 예는 A. 오리제 TAKA 아밀라제, 알카리성 프로테아제 ALP 및 트리오스 포스페이트 이소머라제, 리조푸스 미에헤이 리파제, 아스퍼질러스 나이거 또는 A. 아와모리 글루코아밀라제 (*glaA*), 푸사리움 옥시스포리움 트립신-유사 프로테아제, 크리소스포리움 루크노웬스 셀로비오하이드롤라제 1 프로모터, 트리코더마 리세이 셀로비오하이드롤라제 I (*Cel17A*) 등의 프로모터를 포함한다.
- [0091] 효모에서 예를 들어 S. 세레비지에 에놀라제 (*ENO-1*), 갈락토키나제 (*GAL1*), 알코올 데하이드로게나제 (*ADH2*) 및 3-포스포글라이세레이트 키나제의 프로모터가 발현을 제공하기 위해 사용될 수 있다.
- [0092] 세균 숙주에서 본 발명의 세린 프로테아제의 전사를 유도하기 위한 프로모터 서열의 예는 에스케리키아 콜라이의 *lac* 오페론의 프로모터, 스트렙토마이세스 코엘리칼라 아가라제 *dagA* 프로모터, B. 리체니포르미스 알파-아밀라제 유전자 (*amyL*)의 프로모터, B. 스테아로써모필러스 말토제닉 아밀라제 유전자 (*amyM*)의 프로모터, B. 서브틸리스 *xyIA* 및 *xyIB* 유전자의 프로모터 등을 포함한다.
- [0093] 적합한 터미네이터는 상기 언급된 유전자의 터미네이터 또는 특성화된 다른 임의의 터미네이터 서열을 포함한다.
- [0094] 적합한 형질전환 또는 선별 마커는 숙주의 결핍을 보상하는 것, 예를 들어 B. 서브틸리스 또는 B. 리체니포르미스의 *dal* 유전자 또는 아스퍼질러스 *amdS* 및 *niaD*를 포함한다. 또한, 선별은 항생제 내성, 예를 들어 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 플레오마이신 또는 하이그로마이신 내성을 제공하는 마커에 기초할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 세린 프로테아제의 세포의 분비가 바람직하다. 따라서, 재조합 벡터는 선별 숙주에서 분비를 촉진하는 서열을 포함한다. 본 발명의 세린 프로테아제의 신호 서열 또는 전서열 또는 전펩타이드가 재조합 발현 벡터에 포함될 수 있거나 또는 본래의 신호 서열이 선별 숙주에서의 분비를 촉진할 수 있는 다른 신호 서열로 교

체될 수 있다. 따라서, 선택된 신호 서열은 발현 숙주에 동종 또는 이종일 수 있다.

- [0096] 적합한 신호 서열의 예는 진균 또는 효모 유기체의 신호 서열, 예를 들어 잘 발현된 유전자로부터의 신호 서열을 포함한다. 이러한 신호 서열은 문헌을 통해 잘 알려져 있다.
- [0097] 또한, 재조합 벡터는 안정적인 발현을 얻기 위해 숙주 염색체 DNA내로 벡터의 통합을 촉진하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0098] 본 발명의 Fe\_RF6318 프로테아제는 실시예 4에 기술된 바와 같이 T. 리세이 *cbh1* (*ce17A*) 프로모터로부터 자체의 신호 서열과 함께 발현되었다. T. 리세이 숙주를 형질전환하기 위해 사용된 발현 작제물은 또한 비형질전환 세포로부터 형질전환체를 선별하기 위해 *cbh1* 터미네이터 및 *amdS* 마커를 포함하였다.
- [0099] 또한, 본 발명은 상기된 재조합 발현 벡터를 포함한 숙주세포에 관한 것이다. 진균 세린 프로테아제 효소의 생성에 적합한 숙주는 세균, 효모 및 진균을 포함한 미생물 숙주와 같은 동종 또는 이종 숙주이다. 또한, 식물 또는 포유류 세포의 생성 시스템도 가능하다.
- [0100] 트리코더마, 아스퍼질러스, 푸사리움, 후미콜라, 크리소스포리움, 뉴로스포라, 리조푸스, 페니실리움 및 모르티에렐라와 같은 사상 진균이 효소 산물의 하향 프로세싱 및 회수의 간편함으로 인해 바람직한 생성 숙주이다. 적합한 발현 및 생성 숙주 시스템은 예를 들어 사상 진균 숙주 트리코더마 리세이 (EP 244234)를 위해 개발된 생성 시스템 또는 아스퍼질러스 생성 시스템 (예, A. 오리자 또는 A. 나이거 (WO 9708325, US 5,843,745, US 5,770,418), A. 아와모리, A. 소재 및 A. 자포니쿠스-형 균주) 또는 푸사리움 (예, F. 옥스포름 (Malardier et al., 1989) 또는 F. 베네나툼)을 위해 개발된 생성 시스템 및 뉴로스포라 크라사, 리조푸스 미에헤이, 모르티에렐라 알피니스, H. 라누기노사 또는 H. 인솔렌스 또는 크리소스포리움 루크노웬스 (US 6,573,086)를 위해 개발된 생성 시스템을 포함한다. 효모를 위해 개발된 적합한 생성 시스템은 사카로마이세스, 슈조사카로마이세스 또는 피키아 파스토리스를 위해 개발된 시스템을 포함한다. 세균을 위해 개발된 적합한 생성 시스템은 바실러스 (예, B. 서브틸리스, B. 리체니포르미스, B. 아밀로리퀴파시엔스), 이. 콜라이 또는 액티노마이세테 스트렙토마이세스를 위해 개발된 생성 시스템이다. 바람직하게는 본 발명의 세린 프로테아제는 트리코더마 속 또는 아스퍼질러스 속 (예, T. 리세이 또는 A. 나이거, A. 오리자, A. 소재, A. 아와모리 또는 A. 자포니쿠스-형 균주)의 사상 진균 숙주에서 생성된다. 본 발명의 가장 바람직한 실시형태에 의하면 진균 세린 프로테아제 효소는 T. 리세이에서 생성된다.
- [0101] 생성 숙주 세포는 본 발명의 세린 프로테아제와 동종 또는 이종일 수 있다. 숙주는 하나 이상의 숙주 프로테아제의 불활성화 또는 제거에 의한 (예, 동질 또는 동종 프로테아제를 암호화한 유전자의 결손에 의한) 프로테아제의 제거로 인하여 동질 프로테아제를 함유하지 않을 수 있다.
- [0102] 또한, 본 발명은 세린 프로테아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 적합한 조건 하에서 본 발명의 세린 프로테아제를 위한 재조합 발현 벡터를 함유한 천연 또는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 임의로 상기 효소를 분리하는 단계를 포함한다. 생성 배지는 숙주 유기체를 성장시키기에 적합하고 효율적인 발현을 위한 유도제를 함유한 배지일 수 있다. 적합한 배지는 문헌을 통해 잘 알려져 있다.
- [0103] 본 발명은 세린 프로테아제 활성을 갖는 폴리펩타이드에 관한 것이며, 상기 폴리펩타이드는 본 발명의 핵산 분자에 의해 암호화되고 상기된 공정에 의해 수득가능하다. 바람직하게는 폴리펩타이드는 본 발명의 세린 프로테아제를 위한 재조합 발현 벡터를 함유한 숙주 세포를 배양함으로써 수득된 재조합 프로테아제 효소이다.
- [0104] 또한, 본 발명은 세린 프로테아제 활성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한 효소 제제를 수득하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 세포로부터 폴리펩타이드를 회수하거나 또는 세포를 배양 배지로부터 분리하는 단계, 및 세린 프로테아제 활성을 갖는 상청액을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0105] 또한, 본 발명은 상기 성상확인된 세린 프로테아제 효소를 포함하는 효소 제제에 관한 것이다. 효소 제제 또는 조성물은 세린 프로테아제 활성을 가지며 본 발명의 방법에 의해 수득가능하다.
- [0106] 본 발명의 진균 세린 프로테아제, 바람직하게는 본 발명의 재조합 발현 벡터를 함유한 숙주 세포를 배양함으로써 수득된 재조합 프로테아제를 포함하는 효소 제제가 본 발명의 범위에 속한다.
- [0107] 상기 효소 제제는 본 발명의 세린 프로테아제 이외에 다른 유형의 효소, 예를 들면 다른 프로테아제, 아밀라제, 리파제, 셀룰라제, 큐티나제, 펙티나제, 만난아제, 크실라나제 및/또는 옥시다제 (예, 라카제 또는 퍼옥시다제)를 조정제와 함께 또는 조정제 없이 추가로 포함할 수 있다. 이들 효소는 처리될 물질에 존재하는 탄수화물

및 오일 또는 지방을 제거함으로써 본 발명의 세린 프로테아제의 성능을 증강시켜 주는 것으로 기대된다. 상기 효소들은 숙주 균주에 의해 생성된 천연 또는 재조합 효소일 수 있고, 또는 생성 공정 후 배양 상청액에 첨가될 수 있다.

- [0108] 상기 효소 제제는 계면활성제, 완충제, 부패 방지제, 안정화제, 표백제, 조정제, 빌더(builder), 부식제, 마모제 및 방부제, 형광발광제, 재부착방지제, 염료, 안료 등의 그룹중에서 선택된 적합한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0109] 계면활성제는 기름을 에멀전화하고 표면을 습윤화하는데 유용하다. 계면활성제는 반-극성을 포함한 비이온성 및/또는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 양쪽성이온성일 수 있다.
- [0110] 완충제는 효소 제제에 첨가되어 pH를 조정하거나 다른 성분의 성능 또는 안정성에 영향을 미칠 수 있다.
- [0111] 적합한 안정화제는 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤과 같은 폴리올, 당 또는 당 알코올, 락트산, 붕산 또는 붕산 유도체, 펩타이드 등을 포함한다.
- [0112] 표백제는 유기 화합물을 산화시키고 분해시키기 위해 사용된다. 적합한 화학적 표백제의 예로는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 공급원 (예, 테트라아세틸에틸렌디아민과 같은 과산-형성 표백 활성화제의 존재 또는 부재하의 과붕산염 또는 과탄산염) 또는 퍼옥시산 (예, 아미드, 이미드 또는 설폰 형)을 들 수 있다. 화학적 산화제는 라카제 또는 퍼옥시다제와 같은 산화 효소를 사용함으로써 부분적으로 또는 완전히 대체될 수 있다. 많은 라카제는 조정제의 부재하에서 효과적으로 작용하지 못한다.
- [0113] 혼화제 또는 빌더는 제올라이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 카보네이트, 시트레이트 등과 같은 물질을 포함한다. 효소 제제는 하나 이상의 중합체, 예를 들어 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리딘) 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 연화제, 부식제, 다른 성분의 부패를 방지하기 위한 방부제, 마모제 및 발포 및 점도 조정제가 첨가될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 바람직한 일 실시형태에 의하면 상기 효소 제제는 액체, 분말 또는 과립의 형태이다.
- [0115] 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 다른 프로테아제, 특히 알칼리성 프로테아제와 마찬가지로 세제, 단백질, 양조, 육류, 사진, 피혁, 유제품 및 제약 산업에 사용될 수 있다 (Kalisz, 1988; Rao et al., 1998). 예를 들면, 본 발명의 프로테아제는 섬유 단백질 폐기물 (예, 쌀, 피혁, 네일 및 모발)을 유용한 바이오매스, 단백질 농축물 또는 아미노산으로 전환시키는 화학물질의 대체물로서 사용될 수 있다 (Anwar and Saleemuddin, 1998). 본 발명에 따른 진균 세린 프로테아제의 사용은 다른 효소와 마찬가지로 피혁의 질을 개선하면서 환경 오염을 줄여 주고 에너지를 절감하는데 성공적임을 입증할 수 있으며 펩타이드의 합성 및 D,L-아미노산 혼합물의 분리에 유용할 수 있다. 화상 및 상처의 치료를 위해 넓은 스펙트럼 항생물질과 병용되는 서브틸리신은 제약 산업에서 세린 프로테아제의 사용 예가 되며, 이에 따라 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 또한 그러한 용도에 적용될 수 있고 또한 알칼리성 프로테아제와 마찬가지로 수술 도구에 묻은 혈액을 제거하고 콘택렌즈 또는 의치를 세정하는데 사용될 수 있다. 코니디오볼루스 코로나투스로부터 유래된 알칼리성 프로테아제와 마찬가지로, 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 동물 세포 배양액 중의 트립신을 대체하기 위한 것으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 프로테아제는 막을 세정하고 바이오필름을 분해하는데 사용될 수 있다. 제빵에서 본 발명의 프로테아제는 예를 들어 글루텐 망을 분해하기 위해 사용될 수 있고, 다른 식품 용도로서 식품 단백질 (예, 우유 중의 단백질)을 가수분해하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 프로테아제는 예를 들어 효모를 처리하고, 렌더링 하며 (동물 뼈에서 더 많은 단백질을 추출), 새로운 향료를 생성하고, 쓴맛을 저감시키며, 에멀전화 특성을 변화시키고, 생리활성 펩타이드를 생성하며, 단백질의 알레르기 유발 항원을 감소시키는데 사용될 수 있다. 기질은 동물, 식물 및 미생물 단백질을 포함한다.
- [0116] 세제 산업, 특히 세탁 세제 산업은 높은 pH 범위에서 활성을 나타내는 프로테아제의 주요 단일 소비재 산업으로 각광받아 왔다 (Anwar and Saleemuddin, 1998). 이상적인 세제 프로테아제는 식품, 풀, 혈액 및 기타 신체 분비물에 의한 아주 다양한 얼룩의 제거를 원활히 하기 위해 넓은 기질 특이성을 보유해야 한다. 이 효소는 세제 용액의 pH 및 이온세기, 세정 온도 및 pH에서 활성이어야 하며 기계적 작동뿐만 아니라 세제에 첨가된 킬레이트제 및 산화제에 견뎌야 한다. 프로테아제의 pI는 세제 용액의 pH에 근사하여야 한다. 오늘날의 에너지 위기 및 에너지 보존에 대한 자각으로 인해 보다 낮은 온도에서 프로테아제를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0117] 또한, 본 발명은 세린 프로테아제 효소 또는 효소 제제의 세제용 용도 및 식물 섬유의 처리, 울의 처리, 모발의 처리, 피혁의 처리, 사료 또는 식품의 처리 또는 단백질성 물질의 변형, 분해 또는 제거와 연관된 모든 응용에

사용하는 용도에 관한 것이다.

- [0118] 따라서, 본 발명의 바람직한 일 실시형태는 자동 접시 세척 조성물을 포함하여 세탁 세제 및 접시 세척 조성물을 위해 유용한 세제 첨가제로서의 상기 특성화된 세린 프로테아제 효소의 용도이다.
- [0119] 용어 "세제"는 세정을 보조하거나 세정 특성을 갖고 있는 것으로 의도된 물질 또는 재료를 의미하기 위해 사용된다. 용어 "세정력"은 세정 특성의 존재 또는 정도를 가리킨다. 세정 특성의 정도는 직물 섬유 또는 유리나 같은 수불용성 고체 담체에 결합된 상이한 단백질성 또는 단백질 함유 기질 물질 또는 얼룩 또는 얼룩 혼합물에 대해 피검될 수 있다. 전형적인 단백질성 물질은 혈액, 우유, 잉크, 계란, 풀 및 소스를 포함한다. 시험 목적을 위한 단백질성 얼룩의 혼합물이 시판되고 있다. 세제 효소의 작용은 단백질-함유 얼룩을 분해하고 제거하는 것이다. 시험 결과는 세정 시험에 사용된 얼룩의 유형, 세제의 조성 및 직물의 성질 및 상태에 의해 좌우된다.
- [0120] 전형적으로, 프로테아제 또는 세정 성능은 "얼룩 제거 효능" 또는 "얼룩 제거 효과" 또는 "세정 특성의 정도"로서 측정되며, 이들 용어는 얼룩진 재료 (예, 인위적으로 더럽힌 직물 또는 피검 의류)의 광택 또는 색깔 변화의 가시적이고 측정가능한 증가를 의미한다. 광택 또는 색깔변화 수치는 예를 들어 실시예 6 내지 실시예 10에 기술된 바와 같이  $L^*a^*b^*$  색공간좌표를 이용한 분광계로 색깔을 반사율 값으로 측정함으로써 결정될 수 있다. 프로테아제 성능 (얼룩 제거 효능)을 표시하는 단백질성 얼룩의 색차값 또는 제거는 예를 들어  $\Delta L^*$ 로서 계산되며, 이는 효소 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  - 효소 없이 완충액 또는 세정액으로 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  (대조군)을 의미한다. 세제의 존재는 얼룩을 제거하는데 효소의 성능을 향상시킬 수 있다.
- [0121] 본 발명의 세린 프로테아제는 중성 및 알칼리성 pH의 조건 하에서 및 다른 조성의 세제 존재 하에서 조차 여러 종류의 단백질성 얼룩을 분해시킨다 (실시예 6 내지 실시예 13에 기술됨).
- [0122] 실시예 6에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 세린 프로테아제는 pH 9 완충액 중 50°C, 특히 30°C에서 혈액/우유/잉크 얼룩을 시판 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라팩트® 4000L보다 더 양호하게 제거하였다 (도 5 및 도 6). 효소 제제의 용량은 활성 단위로서 적용되었다. 혈액/우유/잉크 얼룩에 대한 얼룩 제거 효과는 또한 실시예 12에 기술된 바와 같이 10°C 내지 60°C의 온도 범위에서 시험되었다. Fe\_RF6318 프로테아제 제제는 시판 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라팩트® 4000L과 비교하여 고도의 얼룩 제거능을 보여주었다. 또한, Fe\_RF6318 프로테아제 제제는 프로페라제® 4000E와 비교하여 30°C 내지 60°C의 온도 범위에서 고도의 얼룩 제거능을 보여주었다.
- [0123] 또한, Fe\_RF6318 프로테아제의 성능이 실시예 7에 기술된 바와 같이 pH 10, 40°C/50°C에서 세제 분말로 시험되었다. 폴리에스테르-면 재료상의 혈액/우유/잉크 얼룩을 제거하는 효소의 능력이 검증되었다. 각 효소 제제의 용량은 활성 단위 ( $\mu\text{mol}$  티로신/분)로서 적용되었다. 도 7 및 도 8에서 보는 바와 같이, 본 발명의 프로테아제는 또한 강 알칼리성 조건하에서 분말 세제에 적합하며 이의 표백제에 대한 내성은 시판 프로테아제 퓨라팩트® 4000L보다 약간 더 높았다.
- [0124] Fe\_RF6318 프로테아제는 또한 30°C하에 액체 염기 세제중에서 및 액체 염기 세제의 존재 하에 아리엘 센서티브 (Procter & Gamble, UK) 중에서 혈액/우유/잉크 표준 얼룩을 제거하였다 (실시예 9). 혈액/우유/잉크 얼룩에 대한 효능은 시판 제제 사비나제® 울트라 14L 및 퓨라팩트® 4000L보다 상당히 높았다 (도 10 및 도 11). 효소 제제의 용량은 활성 단위로 적용되었다. 용량이 첨가된 단백질의 양으로 계산되었을 때에도 동일한 효과가 관찰되었다 (도 10b 및 도 11b). 10°C 및 20°C하에 3.3 g/l의 액체 세제 농도로 실시된 세정은 시판 제제 사비나제® 울트라 14L, 퓨라팩트® 4000L 및 프로페라제® 4000E보다 우수한 성능을 보여주었다 (실시예 13; 도 17).
- [0125] 혈액/우유/잉크 얼룩 이외에 Fe\_RF6318 프로테아제는 30°C하에 액체 세제중에서 시험했을 때 풀 및 코코아와 같은 얼룩을 제거하는데 효과적이었다. 처리는 ATLAS LP-2 로온도오미터법으로 실시되었다. 결과 (도 12 및 도 13)는 Fe\_RF6318이 30°C와 같은 저온에서 수 가지 얼룩에 효과적이었음을 보여준다.
- [0126] T. 리세이에서 생성된 재조합 Fe\_RF6318 효소 제제의 성능이 30°C하에 세탁기에서 현장 규모로 액체 염기 세제의 존재 하에서 시험되었다 (실시예 11). 부작용을 시험하기 위한 8 가지의 상이한 프로테아제 민감성 추적자가 표 5에 수록되어 있으며 공정 조건은 표 6에 기술되어 있다. 시험에 사용된 효소 용량은 효소 활성 및 효소 단백질의 양 둘 다로서 계산되었다. 도 14a 및 도 14b에 제시된 결과는 상이한 얼룩으로 수득된 결과의 총합으로서 효소의 용량은 활성의 양 또는 단백질로서 적용되었을 때 Fe\_RF6318이 시판 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라팩트® 4000L보다 높았다는 것을 보여준다. Fe\_RF6318은 혈액/우유/잉크, 초콜릿/우유, 땅콩 오일/우유 및 난황 얼룩에 가장 효능이 있었다 (도 15a 내지 도 15e).

- [0127] 본 발명의 바람직한 실시형태에 의하면, 본 발명의 진균 세린 프로테아제는 실시예 6 내지 실시예 13에 기술된 바와 같이 세제 액체 및 세제 분말에 유용하다. 본 발명의 효소 제제의 효소는 손세탁 또는 세탁기에서 사용하기 위해 제형될 수 있거나 또는 경질 표면 세정에 사용하거나 바람직하게는 설거지 또는 식기세척기에서 사용하기 위해 제형될 수 있다.
- [0128] 실시예 1. 푸사리움 에퀴세티 RF6318 프로테아제의 생성 및 정제
- [0129] (a) 푸사리움 에퀴세티 RF6318의 배양
- [0130] 셀룰라제를 생성하는 사상 진균으로서 사전에 진균 균주 RF6318을 분리하였다. 이 균주는 푸사리움 cf. 에퀴세티 (Libert) Desmazieres (by Arthur de Cock, Identification Services, Centralbureau Voor Schimmencultures, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands)로 동정되었다. F. 에퀴세티 RF6318은 기질로서 해모글로빈을 함유한 한천 평판 검정에서 프로테아제 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 평판 배양은 약 10°C에서 실시되었음에 따라 이 결과는 RF6318이 냉온에서 작용하는 프로테아제 또는 프로테아제들을 생성함을 가리킨다. F. 에퀴세티 RF6318는 +4°C하에 포테이트 텍스트로즈 (PD) 한천 (Difco)상에서 성장, 유지 및 포자형성되었다. 효소 생성을 위해 RF6318 사면배양에 의한 포자를 30 g/l 옥수수 가루 (미세 분말), 5 g/l 옥수수 침지 분말, 4 g/l 탈지대두박, 2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l NaCl 및 1 g/l 파라핀유를 함유한 배양 배지에 접종하였다. 배지의 pH는 멸균전에 NaOH로 8.5로 조정하고 배지를 121°C에서 30분 동안 가압멸균처리하였다. 미생물을 28°C하에 진탕기 (200 rpm)에서 7일간 50 ml 용량으로 배양하였다. 사면배양 상청액은 알칼리성 프로테아제 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 활성 측정은 (실시예 1c, 실시예 5 또는 실시예 14에 따라) 다른 pH 값 (pH 7-10)에서 실시하였다. 이와 같은 알칼리성 활성때문에 RF6318 균주는 추정 프로테아제 유전자 제공 균주로 선택되었다.
- [0131] (b) F. 에퀴세티 RF6318 배양 배지로부터 프로테아제의 정제
- [0132] 사면 배양 배지를 +4°C하에 50000 g로 30분간 원심분리하여 세포와 고체를 제거하였다. 50 ml의 상청액을 프로테아제의 정제를 위해 사용하였다. 원심분리 후 상청액에 HCl를 첨가하여 pH를 8.0으로 조정하였다. 이어서, 상청액을 0.44 μm 필터 (MILLEX HV Millipore)에 통과시켜 여과하고 20 mM 트리스-HCl, pH 8에서 평형화된 5 ml Q Sepharose FF 컬럼 (GE Healthcare)에 적용하였다. 관통한 분획을 수거하고 HCl를 첨가하여 pH를 7.5로 낮췄다. 관통한 분획에 고체 황산암모늄을 첨가하여 1 M의 최종 염 농도를 수득하였다. 이어서 관통한 분획을 20 mM 트리스-HCl-1M 황산암모늄 pH 7.5로 평형화된 페닐 Sepharose HP (1 ml) 컬럼 (GE Healthcare)에 적용하기 전에 0.44 μm 필터를 통해 여과하였다. 단백질을 황산암모늄 선형 감소 구배 (1 M부터 0 M로)로 용출하였다. 1 ml의 분획을 수거하고 제조사의 지시에 따라 pH 8.0에서 레소루핀-표지된 카세인 (Boehringer Mannheim Biochemica)에 대한 프로테아제 활성을 분석하였다. 프로테아제 활성을 갖는 분획을 모아 10 k 막 (Amicon)으로 한외여과하였다. 농축 여액을 20 mM 트리스-HCl-200 mM NaCl, pH 7.5로 평형화된 Superdex 75 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare)에 적용하였다. 단백질을 동일한 완충액으로 용출하고 0.5 ml 분획을 수거하였다. 이들 분획으로부터 프로테아제 활성을 분석하였다. 프로테아제 활성을 갖는 분획은 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)으로 분석하였다. 분획은 약 29 kDa의 분자량을 갖는 한 개의 주요 단백질 밴드를 함유하는 것으로 나타났다. 선택된 분획을 모았다. 모은 분획은 펩타이드의 제제를 위해 사용되었다 (실시예 2). 활성 검정 측정에 따르면 정제된 단백질의 최적 pH는 10이었다. 이와 같이 정제된 F. 에퀴세티 RF6318 프로테아제는 Fe\_RF6318로 명명하였다.
- [0133] (c) 프로테아제 활성 검정
- [0134] 프로테아제 활성은 기질로서 카세인을 사용한 카세인 Folin-Ciocalteu 방법으로 검정하였다. 프로테아제에 의한 카세인 분해율은 시간 함수로서 산-용해성 질련의 방출의 분광 모니터링에 의해 측정되었다. 이 검정에서 사용된 카세인 기질은 다음과 같이 제조되었다: 6 g의 Casein Hammerstein Grade MP Biomedicals, LLC (101289)를 500 ml의 100 mM 트리스, 20 μM CaCl<sub>2</sub>, 7 μM MgCl<sub>2</sub>, 25 μM NaHCO<sub>3</sub>중에 용해시켰다. 기질 용액의 pH는 HCl로 9.0으로 조정하였다. 효소 반응은 1000 ml 증류수 중에 0.11 M TCA, 0.22 M 아세트산 나트륨, 0.33 M 아세트산, 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 함유한 TCA 용액을 사용하여 중지시켰다. 이 검정에서 사용된 Folin 시약은 25 ml의 2 N Folin-Ciocalteu's 페놀 시약 (SIGMA, F9252)을 증류수로 100 ml로 희석함으로써 제조되었다. 반응은 처음에 주어진 온도에서 5분 동안 2.5 ml의 기질 용액을 배양함으로써 개시하고, 그 후 0.5 ml의 효소 용액을 첨가하고 반응을 15분 또는 30분 수행하였다. 15분 또는 30분 반응 후 2.5 ml의 반응 정지 용액을 첨가하였고 내용물을 혼합하여 30분 동안 실온에서 방치해 두었다. 튜브를 4000 rpm으로 10분간 원심분리하였다

(Hettich Rotanta 460). 1 ml의 등명한 상청액을 피펫팅하고 2.5 ml의 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.5 ml의 묽은 Folin 시약과 혼합하였다. 5분 동안 기다린 후 (발색), 혼합물의 흡광도 (색깔)를 효소 블랭크를 기준으로 660 nm에서 측정하였다. 효소 블랭크는 다음과 같이 제조되었다: 0.5 ml 효소 용액을 2.5 ml 정지 용액 및 2.5 ml 기질과 혼합하고, 혼합물을 주어진 온도에서 15분 또는 30분 동안 배양하였다. 효소 활성의 1 단위는 티로신 1 µg/반응 혼합물 ml/분에 상응하는 산 용해성 단백질 가수분해 산물을 방출하는 효소의 양으로 정의된다.

[0135] 실시예 2. 정제된 F. 에퀴세티 프로테아제 Fe\_RF6318의 N-말단 및 내부 아미노산 서열분석

[0136] 내부 서열의 결정을 위해서 기본적으로 Shevchenko et al.(1996)에 기술된 바와 같이 쿠마시 브릴리언트 블루 염색 밴드를 폴리아크릴아미드 겔로부터 절단한 후 "겔내" 분해하였다. 단백질을 디티오쓰레이톨로 환원시키고 요오도아세트아미드로 알킬화한 후 트립신으로 분해시켰다 (Sequencing Grade Modified Trypsin, V5111, Promega).

[0137] 새로운 서열분석을 위해, 펩타이드 전농축을 위해 150 µm x 1.0 mm 트랩 컬럼 (3 µm, 120Å, #222403, SGE Ltd UK)을 사용한 것을 제외하고 기본적으로 Poutanen et al., 2001에 기술된 바와 같이 Ultimate 나노 액체 크로마토그래프 (LC-Packings, The Netherlands)에 연결된 Q-TOF 장비 (Micromass, Manchester, UK)를 사용하여 전기분무 이온화 사중극자 비행시간 이중 질량 스펙트럼을 생성하였다.

[0138] N-말단 서열 분석을 위해 SDS-PAGE/분리된 단백질을 일렉트로블로팅에 의해 폴리비닐리덴 디플루오로라이드 막 (ProBlott; Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, Calif.)으로 이동시켰다. 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색한 후 해당 단백질 밴드를 제거하고 Procise 494A 단백질 서열분석기 (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, Calif.)에서 Edman 분해법으로 N-말단 서열을 분석하였다.

[0139] 정제된 Fe\_RF6318 프로테아제로부터 정제된 N-말단 및 내부 펩타이드 서열이 표 1에 수록되어 있다. 펩타이드 서열은 EMBL 등록번호 Q5R2N9 및 074236를 갖는 푸사리움 옥시스포름 세린 프로테아제 유래의 프로테아제의 공개된 서열과 동일성을 보여주었다.

[0140] [표 1]

[0141] Fe\_RF6318 프로테아제로부터 결정된 N-말단 및 내부 펩타이드 서열

펩타이드	서열	서열번호	주석
#3792	ALTTQSNAPWGLAAISRXTPT	1	N-말단 서열 X는 C,S,T 또는 R일 수 있다
1246.673	TVAADSSWR	2	
3341.633	XTYGVAK	3	
1503.799	EA(L/I)TVGATTSADAK	4	3번째 아미노산은 확정된 것이 아니며 L 또는 I일 수 있다.

[0142]

[0143] 실시예 3. Fe\_RF6318 프로테아제를 암호화한 F. 에퀴세티 RF6318 유전자의 클로닝

[0144] (a) DNA 분리 및 사용된 분자 생물학 방법

[0145] DNA의 분리 및 효소 처리 (예, 플라스미드 DNA의 분리, DNA의 분해에 의한 DNA 절편 생성), 이. 콜라이 형질전환, 서열분석 등을 위해 표준 분자 생물학 방법이 사용되었다. 사용된 기본 방법은 효소, 시약 또는 키트 제조사의 지시에 따르거나 표준 분자 생물학 안내서 (예, Sambrook and Russell, 2001)에 기술된 바와 같았다. F. 에퀴세티 RF6318로부터의 게놈 DNA의 분리는 Raeder and Broda, 1985에 상세히 기술된 바와 같이 실시하였다.

[0146] (b) 프로브 제조를 위한 프라이머

[0147] Fe\_RF6318 단백질을 암호화하는 유전자를 클로닝하기 위한 프로브는 PCR로 합성하였다. 정제된 Fe\_RF6318로부터 수득된 펩타이드의 아미노산 서열을 기초로 하여 축퇴성 올리고를 설계하였다 (표 1). 프라이머의 서열은 표 2에 수록되었다 (서열번호 5-8).

[0148] [표 2]

[0149] 프로브 증폭에서 PCR 프라이머로 사용된 올리고뉴클레오타이드 (서열번호 5-8). 올리고, 서열번호, 올리고 길이 및 축퇴성, 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드 서열의 설계에 사용된 펩타이드의 아미노산.

올리고	서열번호:	길이 (nts)	축퇴성	서열 <sup>(a)</sup>	펩타이드 <sup>(b)</sup>
PRO87	5	20	256	CARTCNAAYGCNCCNTGGGG (s)	#3792
PRO88	6	20	128	CARAGYAAAYGCNCCNTGGGG (s)	#3792
PRO89	7	20	2048	GCRTCNGCNGANGTNGTNGC (as)	1503.799
PRO90	8	20	1024	GCRTCNGCRCTNGTNGTNGC (as)	1503.799

[0150]

[0151] <sup>(a)</sup> N=A,T,C 또는 G; R=A 또는 G; Y=T 또는 C; 괄호안의 "s"=센스 가닥; 괄호안의 "as"=안티센스 가닥.

[0152] <sup>(b)</sup> 펩타이드 서열은 표 1에 수록되어 있다.

[0153] (c) 클로닝을 위한 프로브의 PCR 반응 및 선별

[0154] F. 에퀴세티 RF6318 게놈 DNA를 프로브 합성을 위한 주형으로 사용하였다. PCR 반응 혼합물은 100  $\mu$ l 반응 용량당 10 mM 트리스-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 1  $\mu$ M 각 프라이머 및 4 단위의 Dynazyme II DNA 폴리머라제 (Finnzymes, Finland) 및 약 3  $\mu$ g의 게놈 DNA를 함유하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다: 96°C에서 5분 개시 변성, 이어서 96°C에서 1분의 32 주기, 55.5°C에서 30초 어닐링, 72°C에서 1분 연장 및 72°C에서 5분 최종 연장. 프라이머 조합 PRO88 (서열번호 6) 및 PRO89 (서열번호 7)은 예상된 크기 (공개된 진균 프로테아제 서열을 기초로 한 계산에 따름)를 갖는 특정 DNA 산물을 생성하였다. DNA 생성물을 PCR 반응 혼합물로부터 분리하고 정제한 다음, 제조사의 지침 (Invitrogen, USA)에 따라 pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> 벡터에 클로닝하였다. 이 플라스미드로부터 866 bp DNA 절편을 서열분석하였다 (서열번호 9). 이 PCR 증폭된 DNA 절편을 함유한 pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> 플라스미드는 pALK2521로 명명하였다. 이 플라스미드 pALK2521을 포함한 이. 콜라이 균주 RF7664는 수탁번호 DSM 22171로 DSM 기탁기관에 기탁되었다.

[0155] PCR 절편의 추론된 아미노산 서열은 내부 Fe\_RF6318 펩타이드 1246.673 (서열번호 2) 및 3341.633 (서열번호 3) (표 1)의 서열을 포함하였다. 또한, 프라이머에 포함되지 않은 N-말단 펩타이드 #3792 (서열번호 1)의 C-말단 부분은 추론된 아미노산 서열 (표 1)로부터 발견되었다. 이것은 PCR 반응으로부터 수득된 DNA 절편이 Fe\_RF6318 단백질을 암호화한 유전자의 일부이며 F. 에퀴세티 게놈 DNA로부터 전장 유전자를 선별하기 위한 프로브로서 사용되었음을 증명한다.

[0156] (d) Fe\_RF6318 프로테아제를 암호화하는 F. 에퀴세티 RF6318 유전자의 클로닝

[0157] F. 에퀴세티 게놈 DNA를 서던 블롯 분석을 위해 수 가지 제한 효소로 분해시켰다. 하이브리드화는 프로브로서 플라스미드 pALK2521로부터 절단되고 서열번호 9를 포함한 884 kb EcoRI 절편 (실시에 3c)으로 실시하였다. 상기 프로브는 제조사의 지침 (Roche, Germany)에 따라 디콕시제닌을 사용하여 표지하였다. 하이브리드화는 65°C에서 밤새 수행하였다. 하이브리드화 후 필터를 실온에서 2 x SSC-0.1% SDS를 사용하여 2 x 5분 세척하고, 이어서 65°C에서 0.1 x SSC-0.1% SDS를 사용하여 2 x 15분간 세척하였다.

[0158] F. 에퀴세티 게놈 DNA 분해물중의 수 가지 하이브리드화 절편이 검출될 수 있었다. 게놈 *MunI* 및 *BgIII* 분해물은 각각 약 4.2 kb 및 약 3.2 kb의 크기를 갖는 하이브리드화 절편을 함유하였다. 단일 하이브리드화 절편 크기는 공개된 진균 프로테아제 서열을 기초로 한 계산에 따라 Fe\_RF6318 단백질을 암호화하는 전장 유전자를 함유할 만큼 충분히 컸다. 게놈 DNA 절편은 하이브리드화 절편의 크기 범위 (*MunI* 분해를 위해 약 4 kb 및 *BgIII* 분해를 위해 약 3 kb)로부터의 RF6318 게놈 *MunI* 및 *BgIII* 분해물로부터 분리되었다. 게놈 절편을 아가로스 겔로부터 분리하고 EcoRI 및 *BamHI*으로 절단된 pBluescript II KS+ (Stratagene, USA) 벡터에 클로닝하였다.

[0159] 연결 혼합물로 에스케리키아 콜라이 XL10-골드 세포 (Stratagene)를 형질전환하고 50-100  $\mu$ g/ml 암피실린을 함유한 LB (Luria-Bertani) 평판에서 배양하였다. 프로브로서 pALK2521 삽입체와의 균체 하이브리드화를 사용하여 양성 클론에 대해 이. 콜라이 균체를 선별하였다. 하이브리드화는 RF6318 게놈 DNA 분해물에 대해 기술된 바와 같이 실시하였다. 평판으로부터 4개 양성 *BgIII* 및 8개 양성 *MunI* 클론을 수거하였다. 이들은 제한 분해에 의해 예상된 크기의 삽입체를 함유하는 것으로 나타났다. *BamHI* 벡터에 연결된 *MunI* 절편으로부터의 삽입체를 *PstI-SaI* 이중 분해로 절단하였다. EcoRI 벡터에 연결된 *BgIII* 절편으로부터 삽입체를 *PstI-NotI* 이중 분해로 절단하였다. 수거된 클론의 삽입체에 대해 서던 블롯을 실시하였다 (68°C에서의 서던 블롯 하이브리드화 및 실온에서 2 x SSC-0.1% SDS를 사용한 2 x 5분 세척에 이어서 68°C에서 0.1 x SSC-0.1% SDS를 사용한 2 x 15분 세척). 수거된 *BgIII* 클론중 3개 및 수거된 *MunI* 클론중 6개는 서던 블롯에서 하이브리드화 절편을 함유하

였다. Fe\_RF6318 프로테아제를 암호화하는 전장 유전자 (서열번호 10)를 3.2 kb *Bg*/II 삽입체로부터 서열분석하고 이 삽입체를 함유한 플라스미드는 pALK2529로 명명하였다. 플라스미드 pALK2529를 포함한 이. 콜라이 균주 RF7800은 DSM 기탁기관에 수탁번호 DSM 22172로 기탁되었다. Fe\_RF6318을 암호화하는 유전자는 *Fe prtS8A*로 명명하였다.

[0160] (e) Fe\_RF6318 프로테아제를 암호화한 유전자 및 추론된 아미노산 서열의 정상확인

[0161] *Fe prtS8A* 서열 (서열번호 10) 및 추론된 아미노산 서열 (서열번호 11)은 도 1a 및 도 1b에 나타나 있다. 이 유전자의 길이는 1303 bp (정지 코돈을 포함)이다. 64 bp의 길이를 갖는 한 개의 추정 인트론이 발견되었다 (Gurr et al., 1987에 기술된 진균 인트론의 것에 따른 5' 및 3' 경계 서열). 추론된 단백질 서열 (서열번호 11)은 20개 아미노산의 예상된 신호 서열 (SignalP V3.0; Nielsen et al., 1997 및 Nielsen and Krogh, 1998)을 포함한 412개 아미노산으로 구성된다. 완전한 N-말단 펩타이드 #3792 (또한 프로브 서열에 포함되지 않은 N-말단 부분)이 추론된 아미노산 서열에 포함되었다. 성숙한 폴리펩타이드에 대한 예상 분자량은 29141.09 Da 이고 예상된 pI는 9.30이었다. 이들 예상 수치는 ExpPASy 서버에서 Compute pI/MW 툴을 사용하여 얻었다 (Gasteiger et al., 2003). 추론된 아미노산 서열은 아미노산 위치 Asn77 및 Asn255에서 두 개의 N-당화 부위를 함유하였으나 (도 1), CBS 서버 NetNGlyc V1.0에 의하면 Asn77 위치 (전구 서열에 내재된) 한 부위에서만 존재하였다.

[0162] (f) 상동성, 동일성 및 정렬 연구

[0163] NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 BLASTX 프로그램 버전 2.2.9를 데폴트 세팅으로 사용하여 (Altschul et al., 1990) 공개된 프로테아제 서열과의 상동성을 조사하였다. 지베렐라 제애 (푸사리움 그라미네아룸) (EMBL 수탁번호 XP\_383491)로부터의 가설 단백질 및 트리코더마 하르지아눔 (하이포크레아 릭시) 세린 엔도펩티다제 (EMBL 등록번호 CAL25508)와의 상동성이 최고로 나타났다. 또한, 서열번호 313으로 미국특허원 US60/818,910 (Catalyst Bioscience Inc.)에 포함된 서열과의 상동성이 밝혀졌다. Fe\_RF6318 서열은 상기 상동성 서열과 정렬되었다. ClustalW 정렬 (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw; 매트릭스: BLOSUM, 공백 개시:10, 공백 연장:0.5)을 사용함으로써 수득된 동일성 값은 표 3에 나타나 있다.

[0164] [표 3]

[0165] 추론된 아미노산 서열의 ClustalW 정렬로부터 수득된 동일성 값(%). 신호 펩타이드 및 전구펩타이드를 제외한 성숙한 아미노산 서열들이 정렬되었다. 매트릭스: BLOSUM, 공백 개시:10, 공백 연장:0.5, EMBL\_EBI, G. 제애, XP\_383491; T. 하르지아눔 CAL25508; US 60/818,910의 서열번호 313.

	Fe_RF6318	G. 제애	T. 하르지아눔	US 60/818,910
Fe_RF6318	100	85	75	74
G. 제애		100	78	76
T. 하르지아눔			100	94
US 60/818,910				100

[0166]

[0167] 실시예 4. 트리코더마 리세이에서 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제의 생성

[0168] (a) 생성 (숙주) 벡터의 제조

[0169] 트리코더마 리세이에서 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제의 생성을 위해 발현 플라스미드 pALK2533을 작제하였다. 자체 신호 서열을 갖는 *Fe prtS8A* 유전자를 PCR에 의해 T. 리세이 *cbh1* (*cel7A*) 프로모터에 정확하게 융합시켰다. *Fe prtS8A* 유전자 절편을 BamHI에 의해 그의 3' 말단 (PCR에서 정지 코돈 뒤에 형성된 부위)으로부터 절단하였다. 작제물에서 *cbh1* 터미네이터 서열 앞에 최초의 *Fe prtS8A* 터미네이터는 남아 있지 않았다. *cbh1* 프로모터 및 *cbh1* 터미네이터를 포함한 작제물에 *amdS* 마커 유전자를 부가하였다. 작제물은 Paloheimo et al., 2003에 기술된 것과 유사하며 도 2는 8.7 kb 선형 발현 카세트를 보여준다. 발현 카세트는 *EcoRI* 분해 후 벡터 백분으로부터 분리하고 T. 리세이 원형질체를 형질전환하는데 사용하였다. 사용된 숙주 균주는 4 가지 주요 T. 리세이 셀룰라제 (CBHI, CBHII, EGI, EGII)의 어떠한 것도 생성하지 않는다. 형질전환은 Karhunen et al., 1993에 기술된 변형으로 Penttila et al., 1987에서와 같이 실시하였다. 형질전환체는 이들을 PD상에서 포자형성하기 전에 단일 분생자를 통해 선별 평판에서 정제하였다.

- [0170] (b) 진탕 플라스크 및 실험실 규모의 생물반응기에서의 프로테아제 생성
- [0171] 사면 배양물로부터 형질전환체를 접종하여 pH 6.0의 5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 로 완충된 50 ml의 복합 락토즈계 셀룰라제 유도 배지 (Joutsjoki et al., 1993)를 함유한 플라스크를 진탕시켰다. 30°C에서 250 rpm으로 7일 동안 성장시킨 후 배양 상청액으로부터 형질전환체의 프로테아제 생성을 분석하였다. SDS-PAGE 겔에서 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제에 상응하는 약 29 kDa의 주요 단백질 밴드를 사면배양 상청액으로부터 검출하였다. 실시예 1c 또는 실시예 14에 기술된 바와 같이 카세인을 기질로 사용하여 프로테아제 활성을 검정하였다. 배양 상청액으로부터 숙주와 비교하여 뚜렷히 증가된 활성이 측정되었다. 수 가지 계층 분해물이 포함되고 발현 카세트가 프로브로서 사용된 서던 블롯 분석을 사용함으로써 선택된 형질전환체로부터 진균 계층 내로의 발현 카세트의 통합이 확인되었다.
- [0172] 진탕 플라스크 배양물에서 최상의 프로테아제 활성을 생성하는 T. 리세이 형질전환체가 실험실 규모의 생물반응기에서 배양할 것으로 선택되었다. 셀룰라제 유도 복합 배지가 배양에 사용되었다. 배양에서 수득된 사면배양 배지는 응용 시험에 (실시예 6 내지 실시예 11) 및 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제의 정제 및 추가 정상확인을 위한 개시 물질로서 사용되었다.
- [0173] 실시예 5. 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제의 정제 및 정상확인
- [0174] 발효 (실시예 4)에서 얻은 사면배양 배지를 +4°C에서 50000 g로 30분 동안 원심분리 (Sorvall RC6 plus)하여 세포 및 고형물을 제거하였다. 15 ml의 상청액을 프로테아제의 정제를 위해 사용하였다. 모든 정제 단계는 냉온에서 실시하였다. 원심분리 후, 시료를 0.44  $\mu\text{m}$  필터 (MILLEX HV Millipore)를 통해 여과하고 20 mM 트리스 pH 8.8로 평형화된 HiPrep 26/10 탈염 컬럼 (GE Healthcare)에 적용하였다. 겔 여과된 시료를 20 mM 트리스 pH 8.8로 평형화된 20 mL Q Sepharose FF 컬럼 (GE Healthcare)에 적용하였다. 관통한 분획을 수거하고 12% SDS PAGE 겔에서 분석하였다 (도 3). 이 효소 시료는 pH 및 온도 프로파일의 정상확인을 위해 사용하였다.
- [0175] 온도 프로파일
- [0176] 15분 반응 시간을 이용한 실시예 1c 또는 실시예 14에 기술된 검정을 사용함으로써 pH 9에서 Fe\_RF6318 프로테아제에 대해 온도 프로필을 수득하였다.
- [0177] pH 프로파일
- [0178] 실시예 1c 또는 14에 기술된 바와 같이 기질로서 카세인을 사용하여 50°C에서 프로테아제의 pH 프로필을 결정하였다. 반응물의 pH는 40 mM Britton-Robinson 완충액을 사용하여 pH 6-12로 조절하였고, 반응 시간은 15분이었다. 효소 반응은 0.22 M 아세트산 나트륨과 0.33 M 아세트산을 함유한 0.11 M TCA 용액을 사용하여 정지시켰다. 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제는 pH 6 내지 pH 10에서 60% 이상의 상대적 활성을 나타내며 최적 활성은 pH 10 즈음에서 나타난다. 정제된 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제의 pH 프로파일은 실시예 1a에 기술된 바와 같이 정제된 야생형 Fe\_RF6318 프로테아제의 pH 프로필에 상응하였다.
- [0179] 실시예 6. 상이한 온도하에 pH 9 완충액에서의 재조합 Fe\_RF6318 프로테아제의 성능
- [0180] 실시예 4에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318 제제는 30°C 및 50°C의 온도에서 혈액/우유/잉크 표준 얼룩 (Art. 116, 100% 면, EMPA Testmaterialen AG, Switzerland)을 제거하는 능력에 대해 시험되었다. 시판되고 있는 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16 L (Novozymes) 및 퓨라팩트® 4000L (Genencor International) 및 효소 없이 처리 (대조)를 비교용으로 사용하였다. 처음에 얼룩 직물을 1.5 cm x 1.5 cm 견본 및 조각으로 절단하고 모서리를 절단하여 원형으로 만들었다. 조각은 미세역가 평판 (Nunc 150200)의 웰에 넣었다. 2 cm의 직경을 갖는 각 웰내 직물위로 글리신-NaOH 완충액 pH 9중의 1.5 ml 효소 희석액을 첨가하였다. 각 효소는 1.5 ml 완충액 당 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 4 및 8 활성 단위 ( $\mu\text{mol}$  티로신/분)의 양으로 적용되었다. 희석된 Folin 시약의 첨가 후 발색을 위해 10분의 시간을 사용한 실시예 1(c) 또는 실시예 14에 기술된 바와 같이 30분의 반응 시간을 사용하여 활성을 측정하였다. 시료가 적용된 미세역가 평판을 30°C 및 50°C하에 수평식 진탕기에서 60분 동안 125 rpm으로 배양하였다. 그 후, 직물 견본을 세정수 (약 45°C)에서 주의깊게 세정하고, 실외 빛이 차단된 격자에 올려놓고 실내 대기에서 밤새 건조시켰다.
- [0181]  $L^*a^*b^*$  색공간좌표 (광원 D65/2°)을 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 반사율 값의 색깔을 측정하여 얼룩 제거 효과를 평가하였다. 처리 후 직물 견본의 양면 색깔을 측정하였다. 각 값은 직물의 양면 모두로부터 측정된 적어도 2개의 유사한 직물 견본의 평균치였다. 프로테아제 성능 (얼룩 제거 효능)을 표시하는 혈액/우유/잉크 얼룩의 색차량은  $\Delta L^*$ 로 계산되었고,  $\Delta L^*$ 는 효소 처리된 직물의 광택 값  $L^*$  - 효소 없는 (효소 블랭크,

대조군) 세정액 (완충액)으로 처리된 식물의 광택 값 L\*을 의미한다.

- [0182] 도 5 및 도 6은 그 결과를 보여준다. Fe\_RF6318 프로테아제 제제는 시판 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라펙트® 4000L과 비교하여 50℃하에, 특히 30℃하에 pH 9 완충액중에서 상당히 더 높은 얼룩 제거능을 보였다.
- [0183] 실시예 7. 40℃/50℃ 및 pH 10에서 세제 분말로의 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 성능
- [0184] 실시예 4에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318 제제는 40℃ 및 50℃ (pH 약 10)에서 표백제의 존재 및 부재 하에 포스페이트 함유 참조 세제의 존재 하에 혈액/우유/잉크 표준 얼룩의 제거능에 대해 시험되었다. 표준 얼룩 Art.117 (혈액/우유/잉크, 폴리에스테르+면, EMPA)를 시험 재료로 사용하였다. 시판 프로테아제 퓨라펙트® 4000L 및 효소 없이 처리 (대조군)을 비교용으로 사용하였다. 각 효소는 세척액 ml 당 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 4 및 8 활성 단위 ( $\mu\text{mol}$  티로신/분)의 양이 적용되었다. 활성은 실시예 6에 기술된 바와 같이 측정하였다.
- [0185] 형광 증백제 (Art.601, EMPA) 없이 포스페이트 함유 ECE 참조 세제 77의 3.3 g을 1 리터의 수돗물(물,  $\text{dH} \leq 4$ )중에 용해시키고, 자석 교반기로 고루 혼합한 다음, 40℃/50℃로 가온하였다. 얼룩 직물을 실시예 6에 기술된 바와 같이 조각으로 절단하였다. 직물 건분을 미세역가 평판의 웰 (Nunc 150200)에 넣고 직물의 위로 수중에 세제와 효소 희석액 (60  $\mu\text{l}$  이하)을 함유한 1.5 ml의 세척액을 첨가하였다. 시료가 있는 평판을 40℃/50℃하에 수평식 진탕기에서 125 rpm으로 60분 동안 배양하였다. 그 후 직물 건분을 세정수 (약 45℃)에서 주의 깊게/철저히 세정하고 실외 빛이 차단된 격자에 올려놓고 실내 대기에서 밤새 건조시켰다. 세제 이외에 0.81 g의 차분 산나트륨 4수화물 (Art.604, EMPA) 및 0.16 g의 표백 활성화제 TAED 테트라아세틸에틸렌디아민 (Art.606, EMPA)를 첨가한 것을 제외하고 동일한 방식으로 다른 시험 시리즈를 실시하였다.
- [0186] 처리 후 직물 건분의 색깔을 L\*a\*b\* 색공간좌표를 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 측정하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 얼룩 제거 효과를  $\Delta L^*$ 로서 평가하였다.
- [0187] 도 7a, 도 7b, 도 8a 및 도 8b에 나타낸 결과는 프로테아제 Fe\_RF6318이 강알칼리성 조건에서 분말 세제와 함께 또한 적합하고 표백제에 대한 내성이 시판 프로테아제 퓨라펙트® 4000L보다 약간 더 높음을 보여주었다.
- [0188] 실시예 8. 40℃하에 액체 세제와 함께 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 성능
- [0189] 실시예 4에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318이 40℃ 및 약 pH 7.9에서 효소를 함유하지 않고 액체 세제 아리엘 센서티브 (Procter & Gamble, England)의 존재 하에 혈액/우유/잉크 표준 얼룩을 제거하는 능력에 대해 시험되었다. 표준 얼룩인 인위적으로 더럽힌 시험 의류 Art.117 (혈액/우유/잉크, 폴리에스테르+면, EMPA)를 시험 재료로 사용하였다. 시판 프로테아제 제제 퓨라펙트® 4000L, 사비나제® 울트라 16L 및 효소 없이 처리 (대조군)가 비교용으로 사용되었다. 각 효소는 세정액 ml 당 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 4 및 8 활성 단위 ( $\mu\text{mol}$  티로신/분)의 양으로 사용되었다. 활성은 실시예 6에 기술된 바와 같이 측정되었다.
- [0190] 3.3 g의 아리엘 센서티브를 1 리터의 수돗물 ( $\text{dH} \leq 4$ )중에 용해시키고, 자석 교반기로 고루 혼합한 다음, 40℃로 가온하였다. 얼룩 직물을 실시예 6에 기술된 바와 같이 조각으로 절단하였다. 직물 건분을 미세역가 평판의 웰 (Nunc 150200)에 넣고 직물의 위로 수중에 세제와 효소 희석액 (60  $\mu\text{l}$  이하)을 함유한 1.5 ml의 세척액을 첨가하였다. 시료가 있는 평판을 40℃하에 수평식 진탕기에서 125 rpm으로 60분 동안 배양하였다. 그 후 직물 건분을 세정수 (약 45℃)에서 주의 깊게 세정하고 실외 빛이 차단된 격자에 올려놓고 실내 대기에서 밤새 건조시켰다.
- [0191] 처리 후 직물 건분의 색깔을 L\*a\*b\* 색공간좌표를 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 측정하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 얼룩 제거 효과를  $\Delta L^*$ 로서 평가하였다.
- [0192] 도 9에서 나타낸 결과를 기초로 하여 Fe\_RF6318 프로테아제는 40℃에서 액체 세제와 함께 우수한 성능을 나타낸다. 혈액/우유/잉크 얼룩 (폴리에스테르+면)에 대한 Fe\_RF6318의 효능은 동일한 양의 프로테아제 활성이 적용되었을 때 시판 제제 퓨라펙트® 4000L 및 사비나제® 울트라 14L에 비하여 상당히 높았다. 세정액 ml 당 시판 효소의 4-8 단위의 용량은 세제 효소의 전형적인 사용 수준이 되는 세제의 중량 당 효소 제제의 약 0.2-0.5%의 용량과 동일하다.
- [0193] 실시예 9. 30℃에서 상이한 액체 세제 농도를 갖는 재조합 단백질 Fe\_6318의 성능
- [0194] 실시예 4에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318 제제가 30℃에서 액체 세제로의

혈액/우유/잉크 표준 얼룩을 제거하는 능력에 대해 시험되었다. 효소는 함유하지 않고 25% 세정 활성 물질, 폴리올 및 중합체 (표 4)를 함유한 착색 식물용 액체 기본 세제를 함유하는 아리엘 센서티브 (Procter & Gamble, England)가 세제로 사용되었고, 표준 얼룩 Art.117 (혈액/우유/잉크, 면+폴리에스테르, EMPA)이 시험 재료로 사용되었다. 시판 프로테아제 제제 퓨라팩트® 4000L, 사비나제® 울트라 16L 및 효소 없이 처리 (대조군)가 비교용으로 사용되었다. 각 효소는 세정액 ml 당 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 4 및 8 활성 단위 (μmol 티로신/분)의 양으로 사용되었다. 활성은 실시예 6에 기술된 바와 같이 측정되었다.

[표 4]

착색 식물용 액체 기본 세제의 조성

성분	%
NaLES (나트륨 라우릴 에테르 설페이트)	4.9
비이온성 C12-15 TEO (에틸렌 옥사이드)	15
Na-비누 (Palm Kernel FA)	4.4
코코 글루코사이드	1
<중 계면활성제>	<25.30>
폴리올 (글리세린)	5
포스포네이트 (32%) (ThermPhos)	2
PVP-Sokalan HP 53 (BASF)	1
Sokalan PA (BASF)	1.56
Sorez-100 (ISP)	0.4
100% 잔여 량의 물	

1 g, 3.3 g 및 5 g의 액체 세제를 1 리터의 수돗물 (dH≤4)중에 용해시키고, 자석 교반기로 고루 혼합한 다음, 30℃로 가온하였다. 세척액의 pH는 세제의 농도에 따라 기본 세제인 경우 약 7.3-7.5이거나 Ariel 세제인 경우 약 7.6-8.0이었다. 얼룩 직물을 실시예 6에 기술된 바와 같이 조각으로 절단하였다. 직물 건분을 미세역가 평판의 웰 (Nunc 150200)에 넣고 직물의 위로 수중에 세제와 효소 희석액 (60 μl 이하)을 함유한 1.5 ml의 세척액을 첨가하였다. 시료가 있는 평판을 30℃하에 수평식 진탕기에서 125 rpm으로 60분 동안 배양하였다. 그 후 직물 건분을 따뜻한 세정수에서 주의 깊게/철저히 세정하고 실외 빛이 차단된 격자에 올려놓고 실내 대기에서 밤새 건조시켰다.

처리 후 직물 건분의 색깔을 L\*a\*b\* 색공간좌표를 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 측정하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 얼룩 제거 효과를 ΔL\*로서 평가하였다.

도 10a 내지 도 10d는 착색 식물에 대해 기본 세제로 얻은 결과를 보여주며, 도 11a 내지 도 11d는 아리엘 센서티브로 얻은 결과를 보여준다. 혈액/우유/잉크 얼룩에 대한 Fe\_RF6318의 효능은 동일한 양이 적용되었을 때 시판 제제 퓨라팩트® 4000L 및 사비나제® 울트라 14L에 비해 양쪽 두 세제 및 모든 세제 농도에서 상당히 더 높았다. 또한, 투입량이 첨가된 단백질의 양으로 계산된 경우 (도 10b 및 도 11b), 얼룩 제거 효능은 Fe\_RF6318이 최고로 나타난다. 효소 제제로부터 단백질의 양은 표준으로서 소 감마글로불린 (Bio-Rad)를 사용한 Bio-Rad 단백질 검정 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 의해 결정되었다. 이들 시험의 결과는 Fe\_RF6318 프로테아제가 30℃와 같은 저온에서 액체 세제와 함께 우수한 성능을 나타냄을 가리킨다.

실시예 10. 30℃에서 액체 세제로의 상이한 얼룩에 대한 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 효능(Laundry Ometer)

실시예 4에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318 제제가 30℃에서 액체 세제를 사용하여 상이한 얼룩을 제거하는 능력에 대해 시험되었고, 시판 프로테아제 제제 퓨라팩트® 4000L 및/또는 사비나제 울트라® 16L과 비교되었다. EMPA로부터 입수한 다음의 인위적으로 더럽힌 시험 옷을 사용하였다: 혈액/우유/잉크 (Art.117, 폴리에스테르+면), 혈액/우유/잉크 (Art.116, 면), 풀 (Art.164, 면) 및 코코아 (Art.112, 면). 직물은 9 cm x 12 cm 건본으로 절단하고 가장자리는 지그재그로 말끔히 박음질되었다. 2회 시험 시리즈가 실시되었다: 즉, 일차는 효소 없이 아리엘 센서티브로, 2차는 착색 식물용 액체 기본 세제 (실시예 8)로 진행되었다. 위 두 실험에서는 다른 회분의 얼룩이 사용되었다.

얼룩 제거 처리를 LP-2 로온더오미터법으로 다음과 같이 실시하였다. 먼저 로온더오미터를 30℃로 예열하였다. 수돗물 (dH≤4) 1리터 당 5 g의 세제 및 효소 희석액을 함유한 온수 세정액 450 ml을 얼룩 Art.116과 Art.117 또는 얼룩 Art.164와 Art.112를 함유한 용기에 가했다. 각 효소의 투입량은 세정액 ml 당 0, 2, 5, 10 및 일부 시험에서 20 또는 30 활성 단위 (μmol 티로신/분)였다. 활성은 실시예 6에 기술된 바와 같이 측정하였다. 로

온도미터는 pH 약 7.5 (기본 세제) 또는 8 (Ariel), 30°C에서 60분 동안 작동되었다. 그 후 식물 건분을 세정수 (약 20°C)로 주의 깊게 세척하고 실외 빛이 차단된 격자에 올려놓고 실내 대기에서 밤새 건조시켰다.

[0204] 처리 후 식물 건분의 색깔을 L\*a\*b\* 색공간좌표를 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 측정하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 얼룩 제거 효과를 ΔL\*로서 평가하였다. 처리 후 식물 건분의 양면의 색깔을 측정하였다. 각 측정값은 식물 건본 당 적어도 20회 측정의 평균이었다. 처리 동안에 형성된 주름 부분에서는 식물이 겹쳐진 상태이므로 측정되지 않았다 (면 얼룩 Art.116 및 Art.112에서).

[0205] Ariel® Sensitive로 얻은 결과 (도 12a 내지 도 12c)는 30°C에서 동일한 양의 프로테아제 활성이 투입된 경우 혈액/우유/잉크 및 풀 얼룩에 대한 Fe\_RF6318의 효능이 시판 제제 사비나제® 울트라 16L에 비하여 상당히 높았음을 보여준다. 또한, 코코아 얼룩으로 얻은 결과도 또한 Fe\_RF6318로 처리한 경우 보다 더 양호하였다 (테이더 제시되지 않음).

[0206] 또한, 착색 식물에 대해 염기 세제 (5 g/l)로 얻은 결과 (도 13a 내지 도 13d)는 30°C에서 동일한 양의 프로테아제 활성이 투입된 경우 혈액/우유/잉크, 풀 및 코코아 얼룩에 대한 Fe\_RF6318의 효능이 시판 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라팩트® 4000L에 비하여 상당히 높았음을 보여준다. 세정액 ml 당 시판 효소의 10 단위의 용량은 세제 효소의 전형적인 사용 수준이 되는 세제의 중량 당 효소 제제의 약 0.4%의 용량과 동일하다. 이들 시험의 결과는 Fe\_RF6318 프로테아제가 30°C와 같은 저온에서 수 가지 얼룩에 대해 효능적임을 가리킨다.

[0207] 실시예 11. 30°C에서 현장 규모로의 액체 세탁 세제 중의 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 성능에 대한 평가

[0208] 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318 제제 (실시예 4)의 성능이 30°C하에 세탁기에서 현장 규모로 액체 세제중에서 시험되었고 시판 프로테아제 제제 퓨라팩트® 4000L 및 사비나제® 울트라 16L 및 효소 없이 세제로의 처리와 비교되었다. 실시예 9에 기술된 착색 식물용 액체 기본 세제 및 8 가지의 다른 프로테아제 민감성 추적자 (표 5)가 사용되었다. 또한 세탁 당 벨러스트 때 (CFT-SBL)의 두 조각을 다른 식물 건본과의 접촉에 의한 오염을 피하기 위해 세탁 망에 넣었다. 추적자는 CFT (Center For Testmaterials BV, The Netherlands)로부터 입수하였다. 얼룩 식물 건본 10 cm x 10 cm를 키친 타올에 꿰맸다. 공정 변수 및 조건은 표 6에 기술되어 있다. 시험에 사용된 효소 용량은 효소 활성 (세탁액 ml 당 약 0-14 활성 단위) 및 단백질의 양 (세탁액 ml 당 약 0-2.2 mg) 둘 다로서 계산되었다. 제제의 프로테아제 활성 및 단백질 함량은 실시예 6 및 실시예 9에 기술된 바와 같이 측정하였다.

[0209] [표 5]

[0210] 시험에 사용된 프로테아제 민감성 추적자

번호	모니터/직물 건본	기질
1	CFT/CS-01-106	혈액 (암적색)/면
2	CFT/C-03-030	초콜릿 우유/안료/면
3	CFT/C-05-059b	혈액/우유/잉크/면
4	CFT/PC-05-014	혈액/우유/잉크/PE-면
5	CFT/CS-08-069	풀/면
6	CFT/C-10-186b	땅콩기름/우유/면
7	CFT/CS-25-016	시금치/면
8	CFT/CS-38-010	난황/안료/면

[0211]

[0212] [표 6]

[0213] 공정 변수 및 조건

[0214] 기기 Miele N-Tronic Frontstar

[0215] 프로그램 30°C, 쇼트 프로그램

[0216] 물경도 13 리터 유입에 의한 약 11,2 ° dH

[0217] 벨러스트 부하 2.5 kg 침대 시트/욕실 타올 및 키친 타올

[0218] 세제 용량 80 g/기기 부하

[0219] 각 추적자의 양 기기 당 2개의 얼룩 트립 10 cm x 10 cm

- [0220] 세척 횟수 2
- [0221] 얼룩 제거 효과의 평가는 UV-필터가 구비된 Datacolor 분광계에 의한 반사율의 측정을 기초로 하여 백분율의 얼룩 제거 효과로 계산되었다 (%SR).
- [0222] %SR= 세탁 후 반사율 - 세탁 전 반사율 x 100% / 더럽혀지지 않은 직물의 반사율 - 세탁전 반사율
- [0223] 결과는 Δ%SR (델타 %SR)로서 계산되며, 이것은 효소 처리된 직물의 %SR에서 효소 없이 처리 (세제만으로 처리)의 %SR을 뺀 값을 의미한다.
- [0224] 각 얼룩의 2개 직물 견본을 함유한 2회 세탁은 효소의 각 투입량으로 수행하였고 각 얼룩 견본에 대해 3회 측정하여, 그 측정값은 제품당, 얼룩당 12회 측정치를 기초로 한 것이다.
- [0225] 도 14a 및 도 14b 및 도 15a 내지 도 15e는 총 때 제거 효능 (델타 %SR)의 결과를 보여준다. 8 가지 상이한 프로테아제 민감성 얼룩 (얼룩 1-8)의 합을 기초로 한 총 얼룩 제거 효과는 프로테아제를 활성의 양으로서 및 세탁액의 용량 당 단백질로서 투입되었을 때 Fe\_RF6318이 시판 프로테아제 제제 퓨라팩트® 4000L 및 사비나제® 울트라 16L에 비하여 더 높았다 (도 14a 및 도 14b). Fe\_RF6318은 혈액/우유/잉크, 초콜릿/우유, 땅콩 기름/우유 및 난황에 특히 효과가 있었다 (도 15a 내지 도 15e).
- [0226] 일반적인 세정능 추적자 (안료/오일)가 다른 기기에서 반복하는데 대조군으로 사용되었다. 여러 시험에서 차이는 관찰되지 않았다.
- [0227] 실시예 12. 10℃ 내지 60℃의 온도에서 pH 9 완충액 중에서의 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 성능
- [0228] 실시예 4에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318이 10℃ 내지 60℃의 온도에서 혈액/우유/잉크 표준 얼룩 (Art.117, 폴리에스테르+면, EMPA Testmaterialen AG, Switzerland)을 제거하는 능력에 대해 시험되었다. 시판 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16L, 퓨라팩트® 4000L 및 프로페라제® 4000 E 및 효소 없이 처리 (대조군)가 비교를 위해 사용되었다. 시험은 배양 온도 범위를 좀 더 넓게 하였고, 얼룩 재료는 다른 것이며, 직물 견본의 세정수 온도는 세탁 온도와 비슷하였던 것을 제외하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 pH 9 완충액에서 실시하였다. 처리 후 직물 견본의 색깔은 L\*a\*b\* 색공간좌표를 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 측정하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 얼룩 제거 효과를 ΔL\*로서 평가하였다.
- [0229] 결과는 도 16a 도 16f에 나타나 있다. Fe\_RF6318 프로테아제 제제는 시판 프로테아제 제제 사비나제® 울트라 16L 및 퓨라팩트® 4000L에 비하여 10℃ 내지 60℃의 온도에서 pH 9 완충액 중에서 더 높은 얼룩 제거능을 보였다.
- [0230] 실시예 13. 10℃ 및 20℃의 세정 냉온에서 액체 세제로의 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 성능
- [0231] 실시예 2에 기술된 바에 따라 트리코더마에서 생성된 재조합 단백질 Fe\_RF6318의 저온 하에서 액체 기본 세제로의 혈액/우유/잉크 표준 얼룩 (Art.117, 면+폴리에스테르, EMPA)의 제거능에 대해 시험되었다. 시험 방법은 3.3 g/l의 세제 농도와 10℃ 및 20℃의 낮은 배양 온도를 사용한 것을 제외하고 실시예 9와 동일하였다. 직물 견본의 세정수 온도는 세탁 온도와 비슷하였다.
- [0232] 처리 후 직물 견본의 색깔은 L\*a\*b\* 색공간좌표를 사용한 Minolta CM 2500 분광계로 측정하고 실시예 6에 기술된 바와 같이 얼룩 제거 효과를 ΔL\*로서 평가하였다. 효소 없이 (효소 블랭크) 처리한 경우는 세제 용액을 세탁액으로서 사용하였다.
- [0233] 10℃ 및 20℃하에 3.3 g/l의 액체 기본 세제 농도로 얻은 결과는 도 17a 및 도 17b에 나타나 있다. 혈액/우유/잉크 얼룩에 대한 Fe\_RF6318의 효능은 동일량의 활성이 투입되었을 때 10℃ 및 20℃ 모두에서 시판 제제 사비나제® 울트라 16L, 퓨라팩트® 4000L 및 프로페라제® 4000E와 비교하여 상당히 더 높았다.
- [0234] 실시예 14. 프로테아제 활성 검정 II
- [0235] 프로테아제 활성은 기질로서 카세인을 이용한 카세인 Folin-Ciocalteu 방법에 의해 검정되었다. 프로테아제에 의한 카세인 분해율은 시간 함수로서 산-용해성 절편의 방출을 분광 모니터링함으로써 측정하였다. 검정에서 사용된 카세인 기질은 다음과 같이 제조하였다: 6 g의 Casein Hammerstein Grade MP Biomedicals, LLC (101289)를 500 ml의 30 mM 트리스, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM NaHCO<sub>3</sub>중에 용해시켰다. 기질 용액의 pH는 HCl로 8.5로 조정하였다. 효소 반응은 0.11 M TCA 용액으로 정지시켰다. 검정에 사용된 Folin 시약은 25

ml의 2 N Folin-Ciocalteu 페놀 시약 (SIGMA, F 9252)를 증류수로 100 ml가 될 때까지 희석함으로써 제조하였다. 반응은 먼저 기질 용액 2.5 ml를 50°C에서 5분 동안 배양한 후 효소 용액 0.5 ml를 첨가하고 반응을 30분 동안 수행함으로써 개시하였다. 30분 반응 후 반응 정지 용액 2.5 ml를 첨가하고 내용물을 혼합한 다음 실온에서 30분 동안 방치해 두었다. 튜브는 10분간 4000 rpm으로 원심분리하였다 (Hettich Rotanta 460). 1 ml의 등명한 상청액을 2.5 ml의 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.5 ml의 묽은 Folin 시약과 혼합하였다. 적어도 5분간 기다린 후 (발색), 혼합물의 흡광도 (색깔)를 효소 블랭크와 비교하여 660 nm에서 측정하였다. 효소 블랭크는 다음과 같이 제조하였다: 0.5 ml의 효소 용액을 2.5 ml의 정지 용액 및 2.5 ml의 기질과 혼합하고 혼합물을 50°C에서 30분간 배양하였다. 효소 활성의 1 단위는 분 당 반응 혼합물의 ml (또는 g) 당 티로신 1 µg에 상응하는 산 용해성 단백질 가수분해 산물을 방출하는 효소 양으로서 정의되었다.

### 수탁번호

[0236]

기탁기관명 : 센트랄뷰레아우 포르 스텔멜컬튀레스(CBS)

수탁번호 : CBS119568

수탁일자 : 20060407

기탁기관명 : DSMZ-도이체 삼룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하

수탁번호 : DSM22171

수탁일자 : 20090114

기탁기관명 : DSMZ-도이체 삼룽 폰 마이크로오르가니즈멘 운트 젤쿨투렌 게엠베하(DSMZ)

수탁번호 : DSM22172

수탁일자 : 20090114

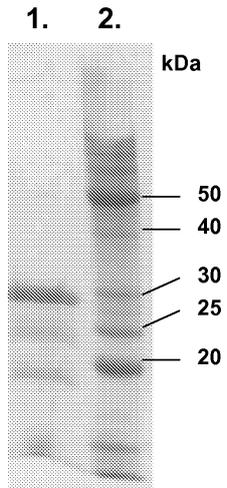
도면

도면1a

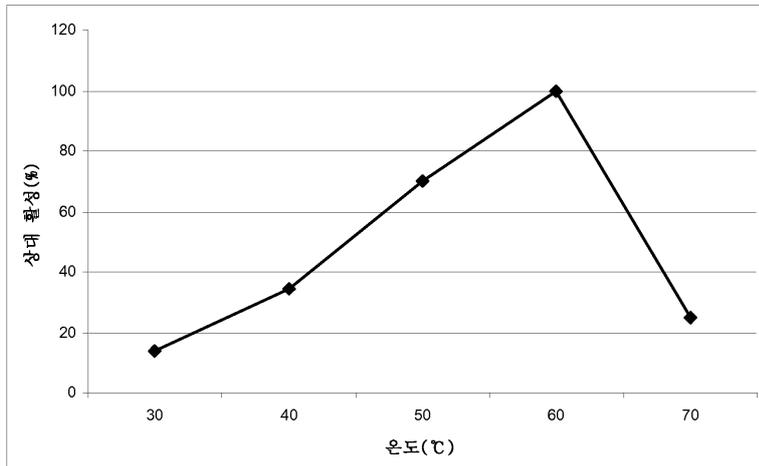
1 atgactagct tccgcgctat cgctcttggc cttgcagctc tgctgcccgc agtccctgcc gctcccaccy agaagcgaca ggaagctcaact  
 1 m t s f r r i a l g l a a l l p a v l a a p t e k r q e l t  
 91 gccgcctg acaagtacat catacctc aagcccagg ctgctgagg caagttcag gctcaatgg cttgggttac cgaagctccac  
 31 a a p d k y i i t l k p e a a e a k v e a h m a w v t d v h  
 181 cgcgcagcc toggaagcg tgacaattcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc tggaaagcct actctgggga gttcgaagat  
 61 r r s l g k r d t s g v e k k f n i s s w n a y s g e f d d  
 271 gctaceattg ctgagatcaa gaagagcccc gagttgect tgctcagcc cgaactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc  
 91 a t i a e i k k s p e v a f v e p d y i v t l d y k v e p l  
 361 tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gctccttggg gtccttggc catctccgc gaaaccccg GTGGCAGCAC CTACACCTAC  
 121 s d r [REDACTED] G G S T Y T Y  
 451 GACACCACTG CCGGTGCCGG TACTTAGGGT TACGTGTTG ACTCTGGTAT CAACACGGC CACACTGACT TTGGGGCCG TGCTTCTTC  
 151 D T T A G A G T Y G Y V V D S G I N T A H T D F G G R A S L  
 541 GGTTCACAACG CTGCTGGTGG CGCCACACT GATACCCTTG GCCACGGTAC CCACGTTGCT GGTACCATTG CCTCCAACAC CTACGGTGT  
 181 G Y N A A G A H T D T L G H G T H V A G T I A S [REDACTED]  
 631 GCCAAGCGTg taagtacaat cataccccc atgagctaca acatgatctg aactttatac ttaactattat tagGCCAACG TCACTCTGT  
 211 [REDACTED] R..... A N V I S  
 721 CAAGGPTTC GTCGTAACC AAGCTTCTAC CTCGTHTATC CTTCGTGGT TCAACTGGC TGTCACGCAC ATCACTCCA AGAACCGTGC  
 219 V K V F V G N Q A S T S V I L A G F N W A V N D I T S K N R  
 811 TAGCCGCTCT GTCATCAACA TGCTCTFCGG TGGTCCCTCT TCTCAGACCT GGGCTACTGC CATCAACGCT GCCTACAGCC AAGGTGTCCT  
 249 A S R S V I N M S L G G P S S Q T W A T A I N A A Y S Q G V



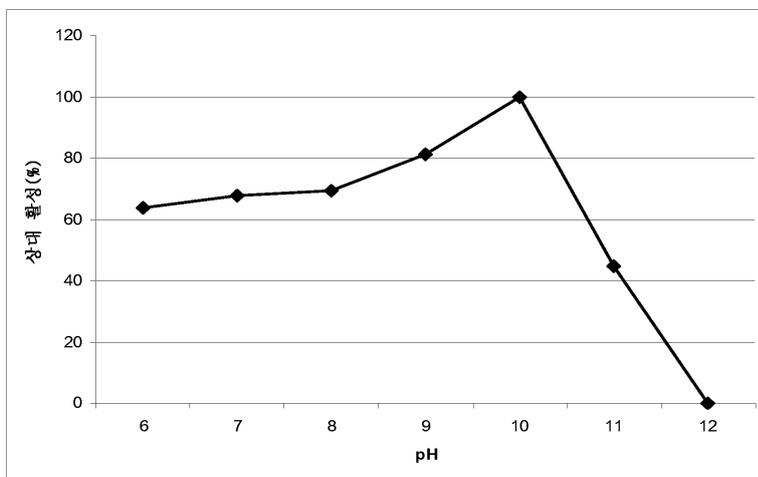
도면3



도면4a

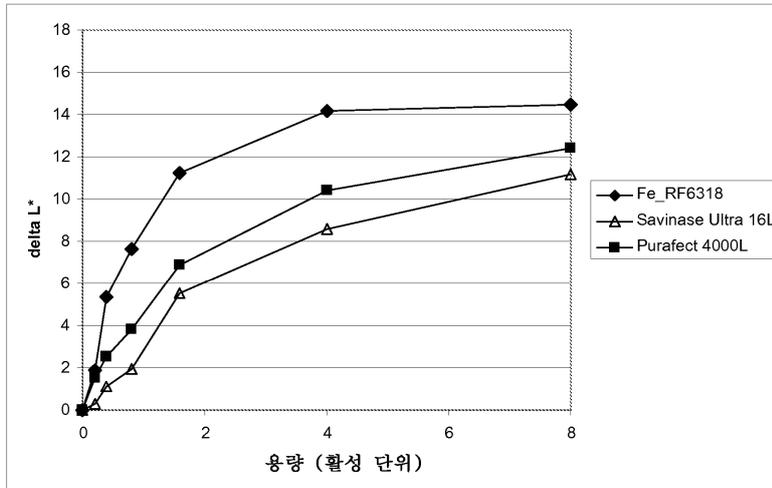


도면4b



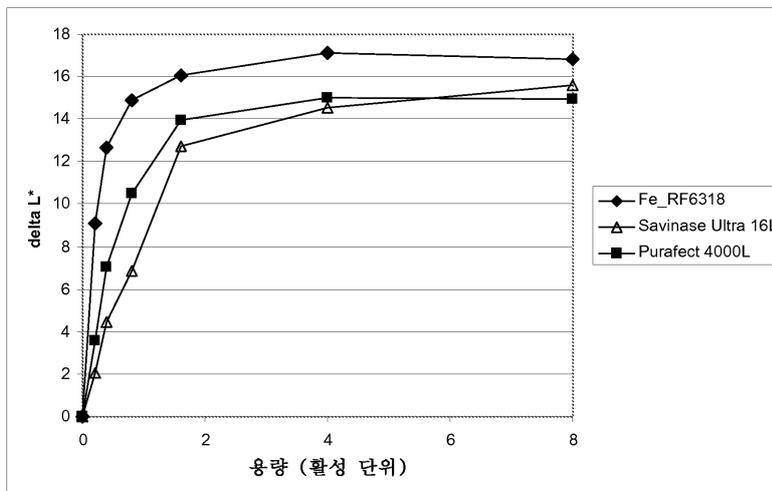
도면5

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 30 °C, pH 9, 60 min.



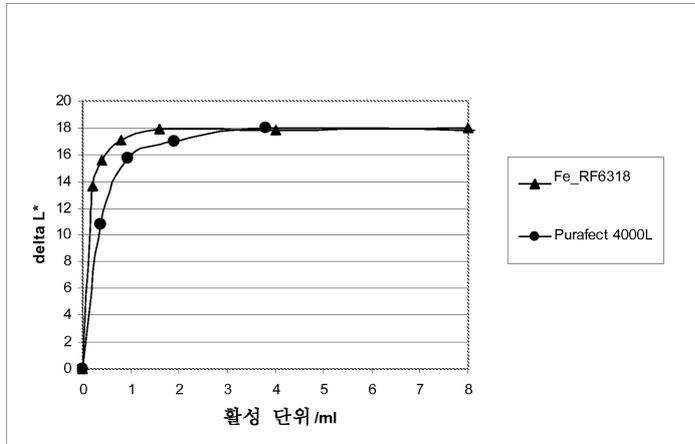
도면6

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 50 °C, pH 9, 60 min.



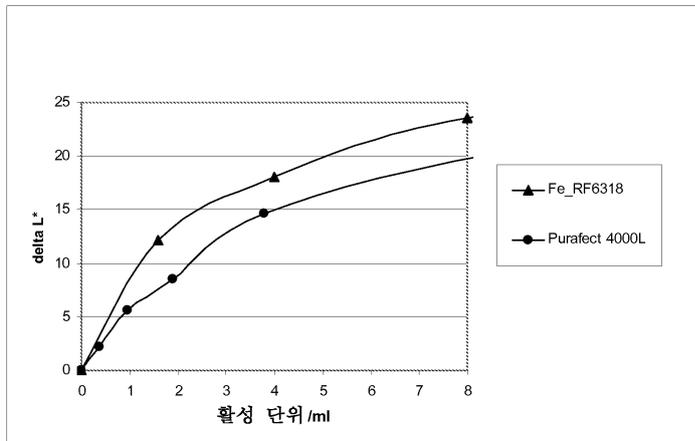
도면7a

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 40 °C, pH approx. 10, 60 min.  
 세제 분말



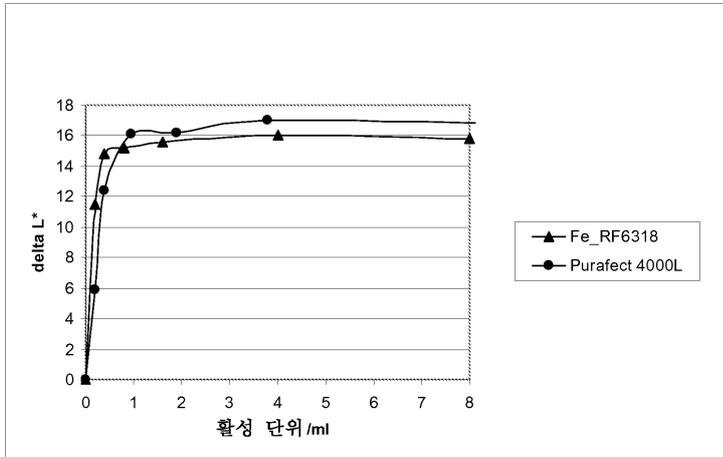
도면7b

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 40 °C, pH approx. 10, 60 min.  
 세제 분말 및 표백제



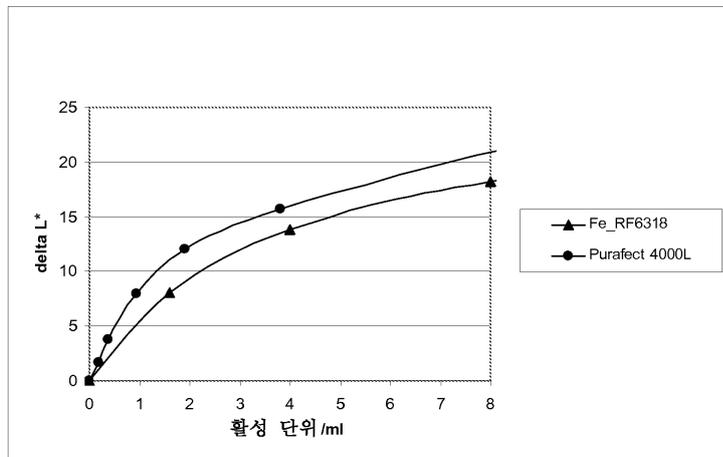
도면8a

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 50 °C, pH approx. 10, 60 min.  
 세제 분말



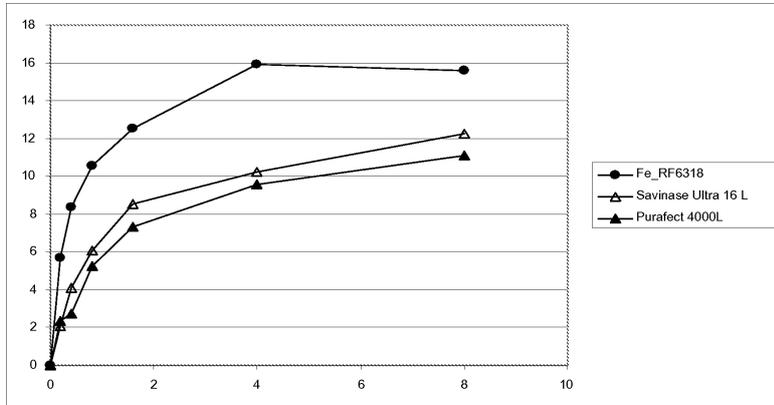
도면8b

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 50 °C, pH approx. 10, 60 min.  
 세제 분말 및 표백제



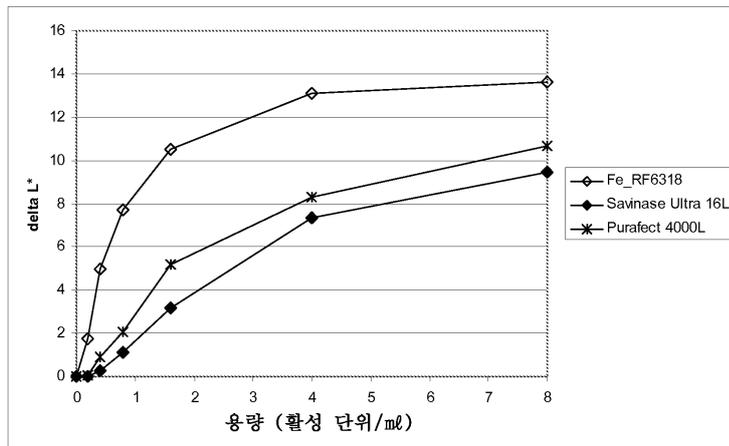
도면9

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 액체 세제 Ariel Sensitive  
 40 °C, pH approx. 7.9, 60 min.



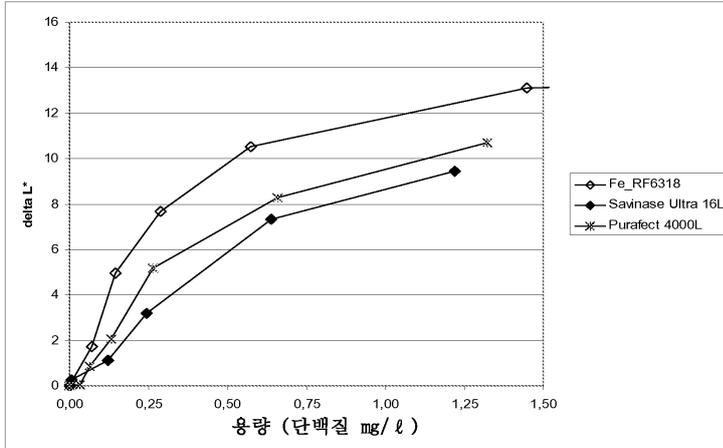
도면10a

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 착색 직물용 액체 기본 세제  
 30 °C, 세제 농도 5 g/l, pH 7.5



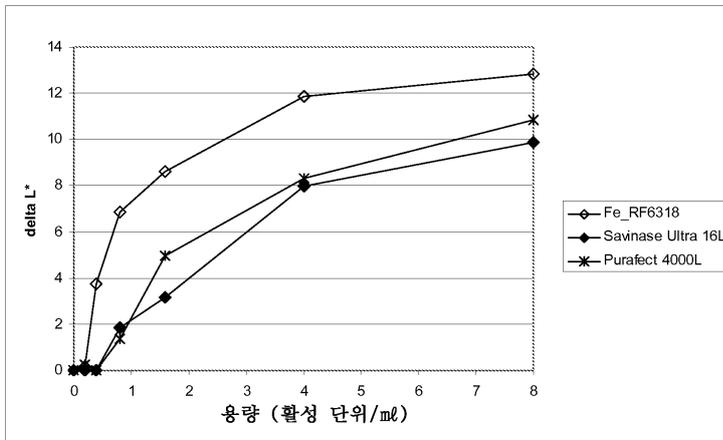
도면10b

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 착색 직물용 액체 기본 세제  
 30℃, 세제 농도 5 g/l (단백질로서 계산된 효소 용량)



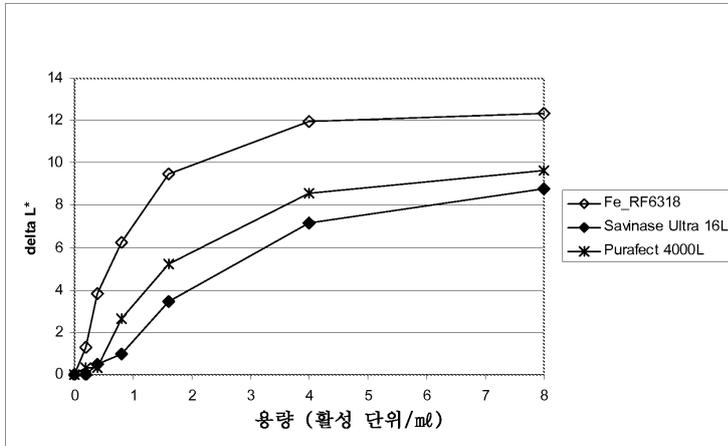
도면10c

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 착색 직물용 액체 기본 세제  
 30℃, 세제 농도 3.3 g/l, pH 7.4



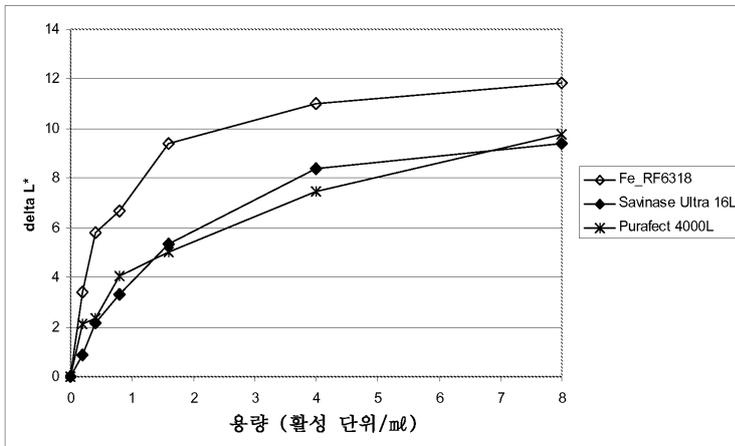
도면10d

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 착색 직물용 액체 기본 세제  
 30℃, 세제 농도 1 g/l, pH 7.3



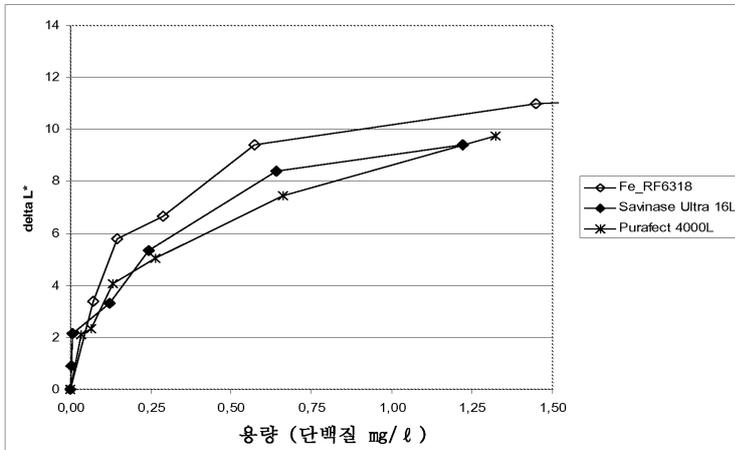
도면11a

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 Ariel Sensitive  
 30℃, 세제 농도 5 g/l, pH 8



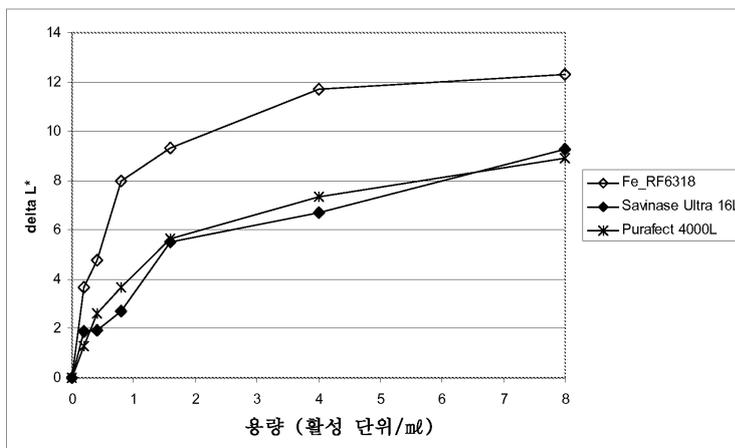
도면11b

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 헬액-우유-잉크 얼룩  
 Ariel Sensitive  
 30℃, 세제 농도 5 g/l (단백질로서 계산된 효소 용량)



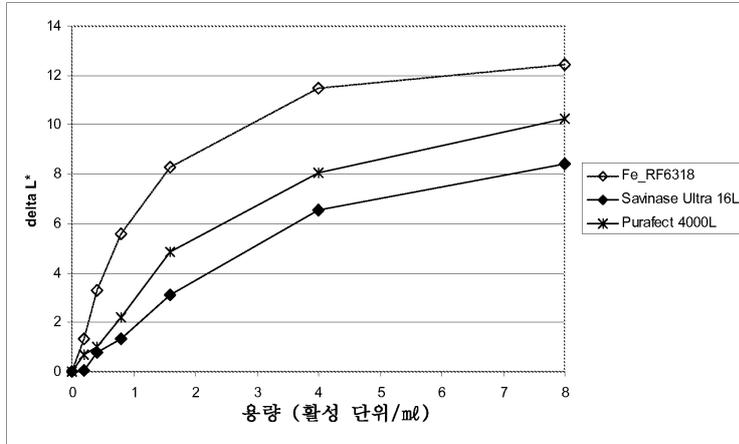
도면11c

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 헬액-우유-잉크 얼룩  
 Ariel Sensitive  
 30℃, 세제 농도 3.3 g/l, pH 7.9



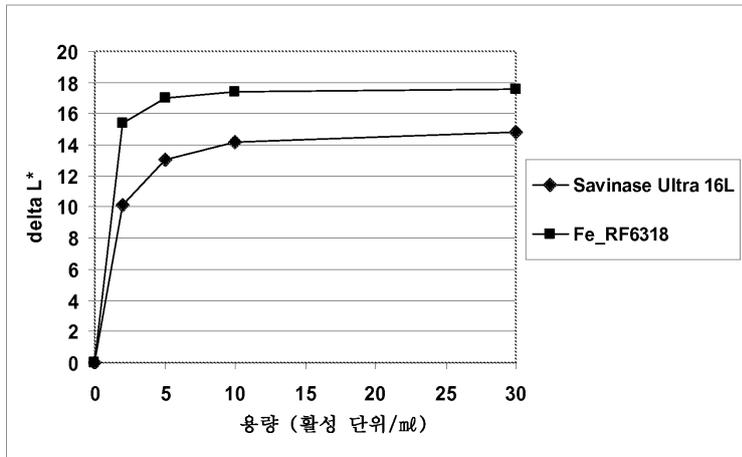
도면11d

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 Ariel Sensitive  
 30℃, 세제 농도 1 g/l, pH 7.6



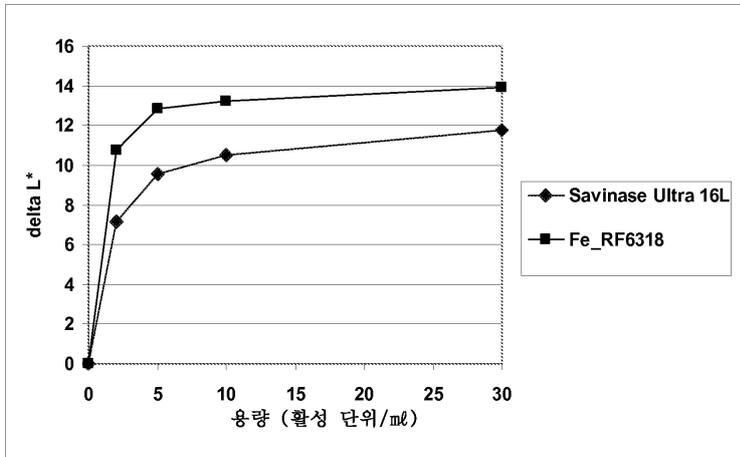
도면12a

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 로온더오미터 시험  
 액체 세제 Ariel Sensitive, 30℃  
 혈액-우유-잉크 얼룩



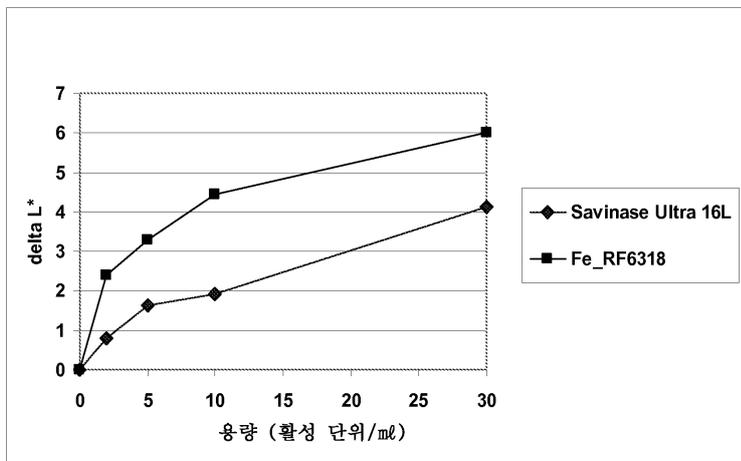
도면12b

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 로온더오미터 시험  
 액체 세제 Ariel Sensitive, 30°C  
 혈액-우유-잉크



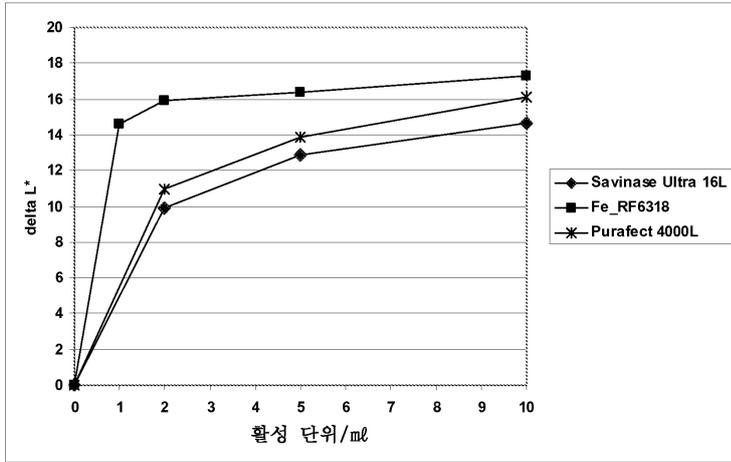
도면12c

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 로온더오미터 시험  
 액체 세제 Ariel Sensitive, 30°C  
 풀



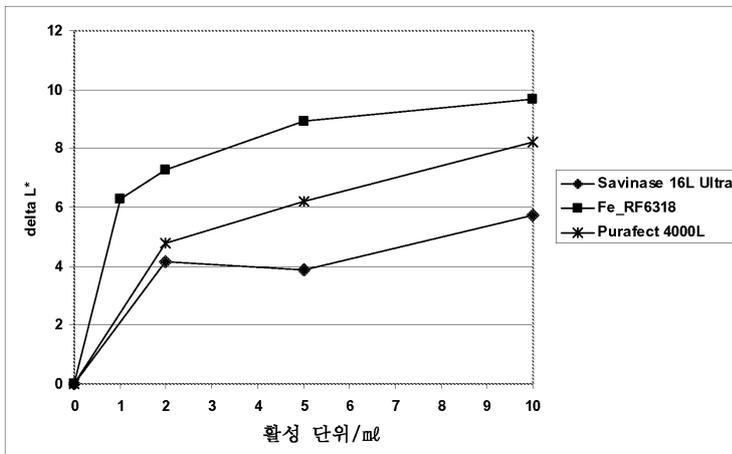
도면13a

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 로온더오미터 시험  
 착색 직물용, 30℃  
 혈액-우유-잉크



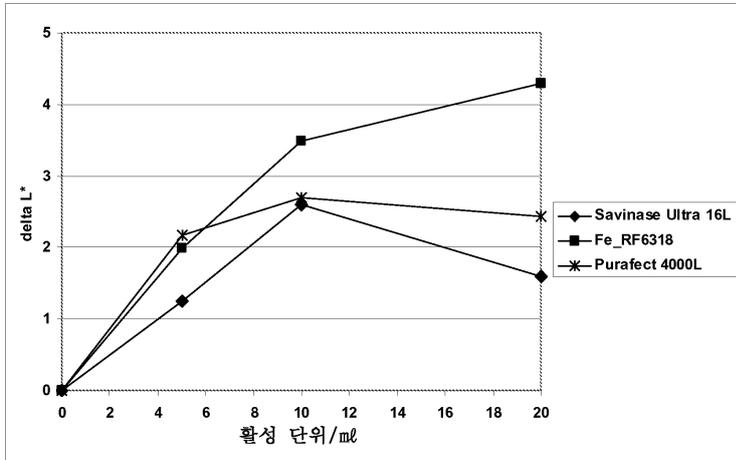
도면13b

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 로온더오미터 시험  
 착색 직물용 액체 세제, 30℃  
 혈액-우유-잉크



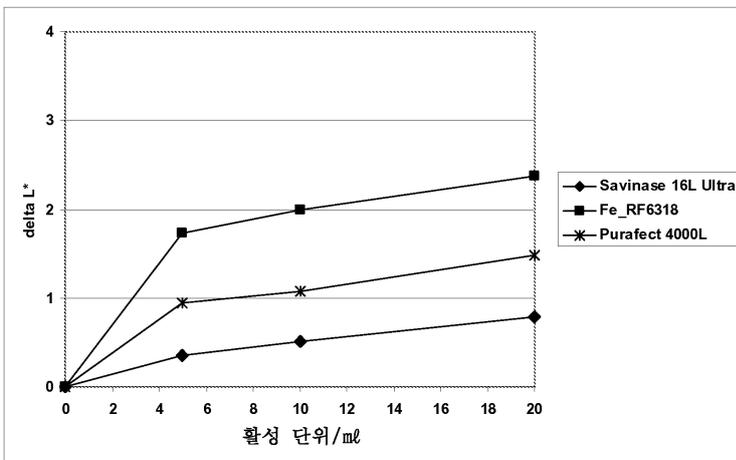
도면13c

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 투은더오미터 시험  
 착색 직물용 액체 세제, 30℃  
 풀



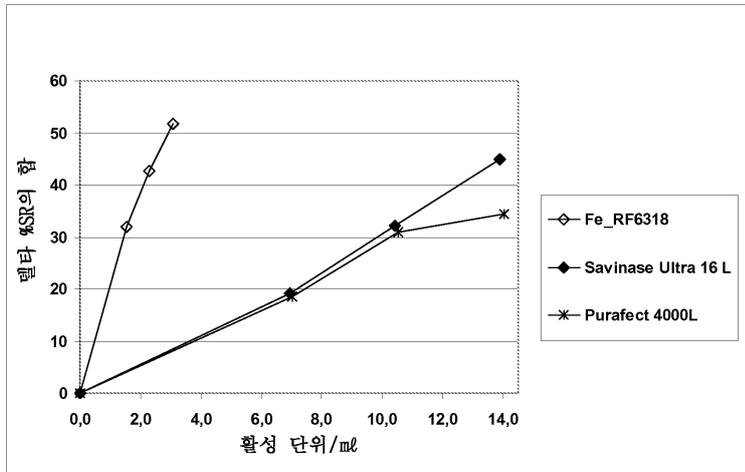
도면13d

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 투은더오미터 시험  
 착색 직물용 액체 세제, 30℃  
 코코아



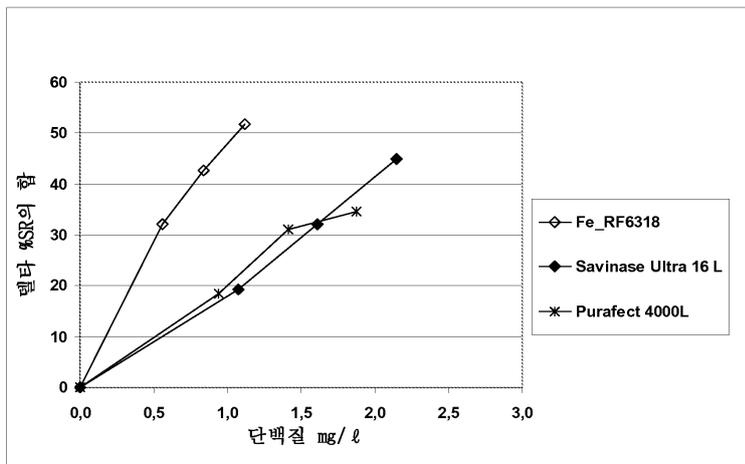
도면14a

염분 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8의 총 얼룩 제거능 (델타 %SR)  
 연장 규모



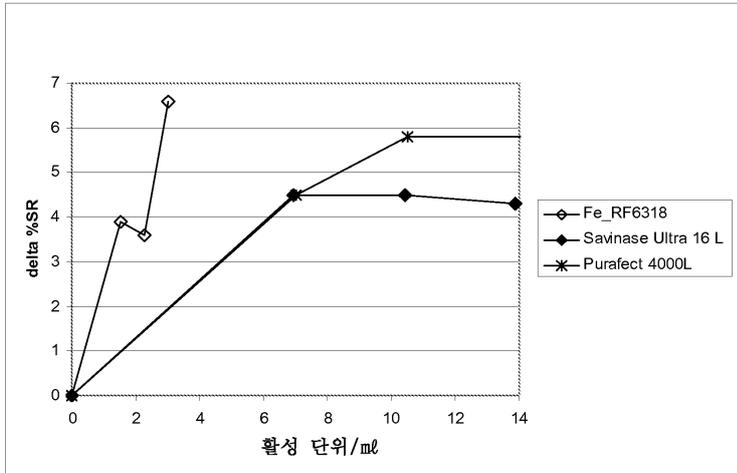
도면14b

염분 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8의 총 얼룩 제거능 (델타 %SR)  
 연장 규모



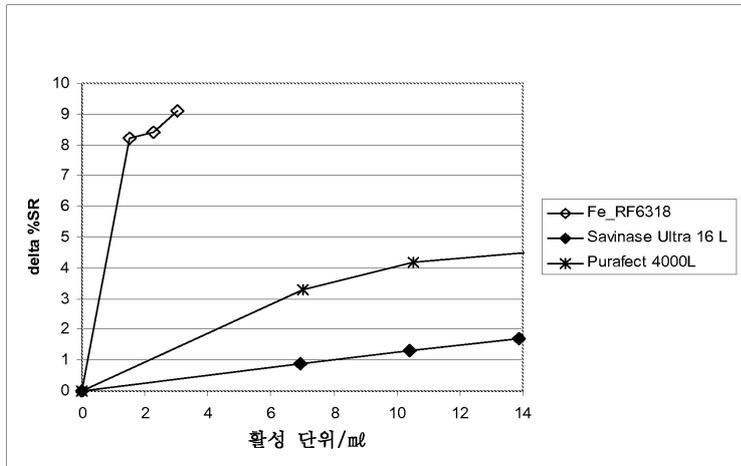
도면15a

30℃ 하의 현장 규모에서 착색 직물용 액체 기본 세제로의 얼룩 제거 효과  
혈액/우유/잉크 (C0)



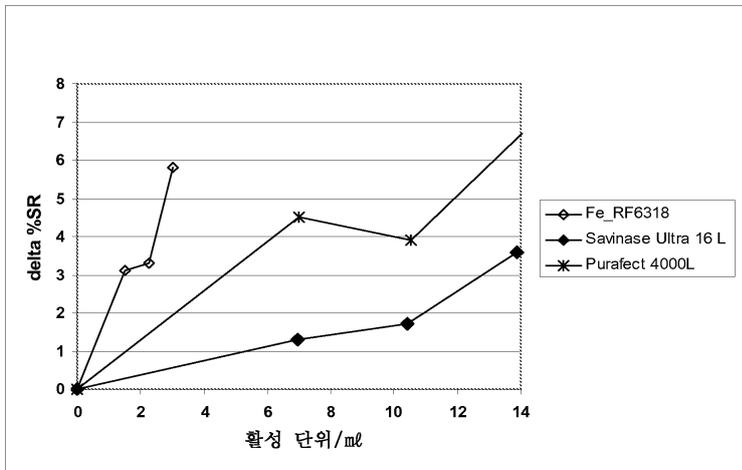
도면15b

30℃ 하의 현장 규모에서 착색 직물용 액체 기본 세제로의 얼룩 제거 효과  
혈액/우유/잉크 (C0)



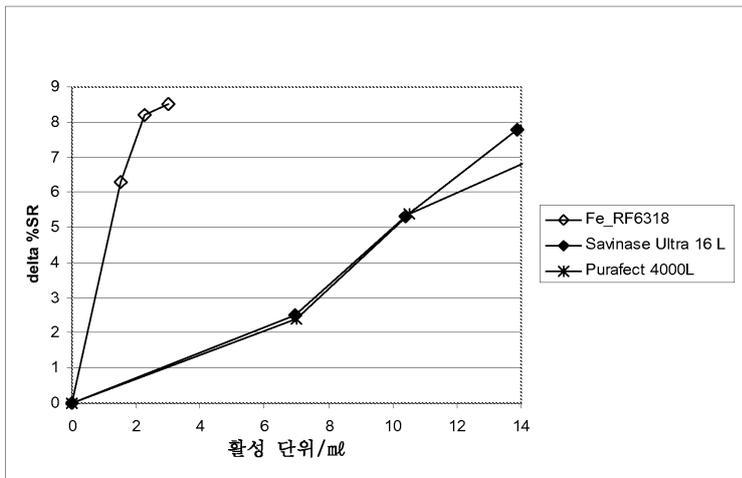
도면15c

30℃하의 현장 규모에서 착색 직물용 액체 기본 세제로의 얼룩 제거 효과  
혈액/우유/잉크 (C0)



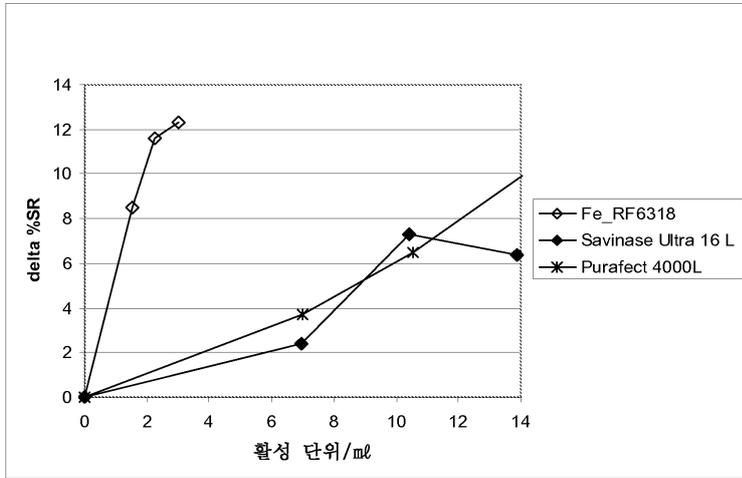
도면15d

30℃하의 현장 규모에서 착색 직물용 액체 기본 세제로의 얼룩 제거 효과  
혈액/우유/잉크 (C0)



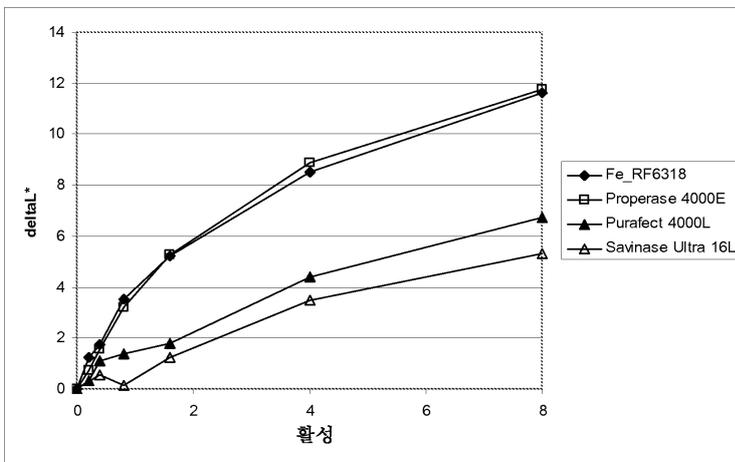
도면15e

30℃ 하의 현장 규모에서 착색 식물용 액체 기본 세제로의 얼룩 제거 효과  
 혈액/우유/잉크 (OO)



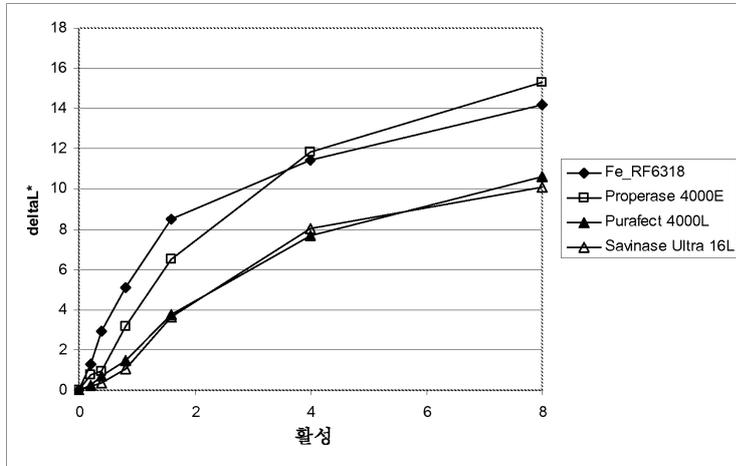
도면16a

재조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 10 °C, pH 9, 60 min.



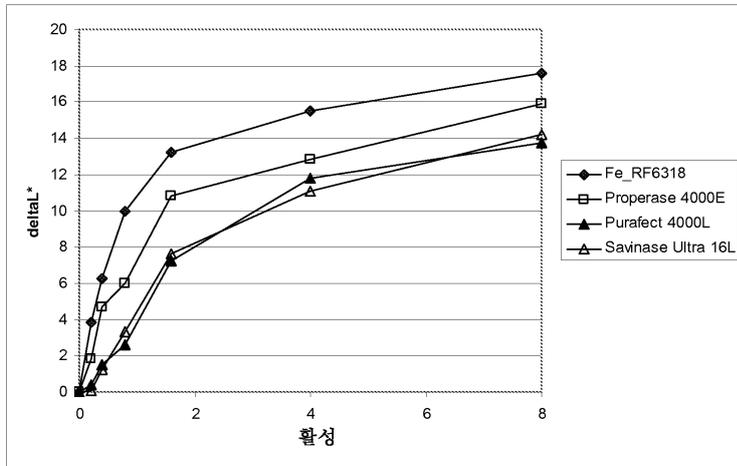
도면16b

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 20 °C, pH 9, 60 min.



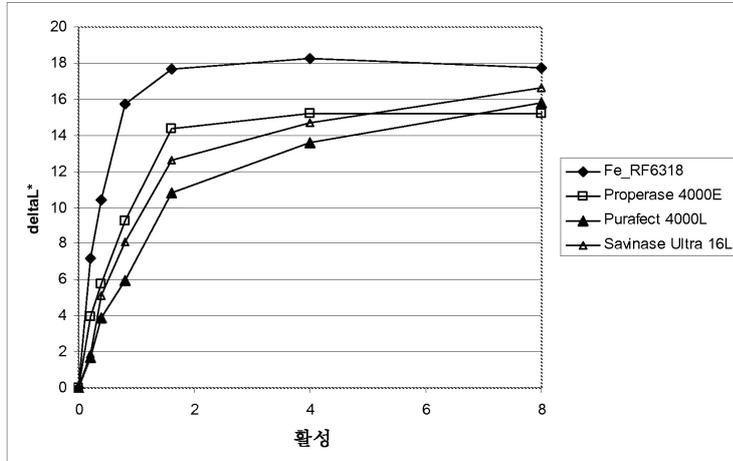
도면16c

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 30 °C, pH 9, 60 min.



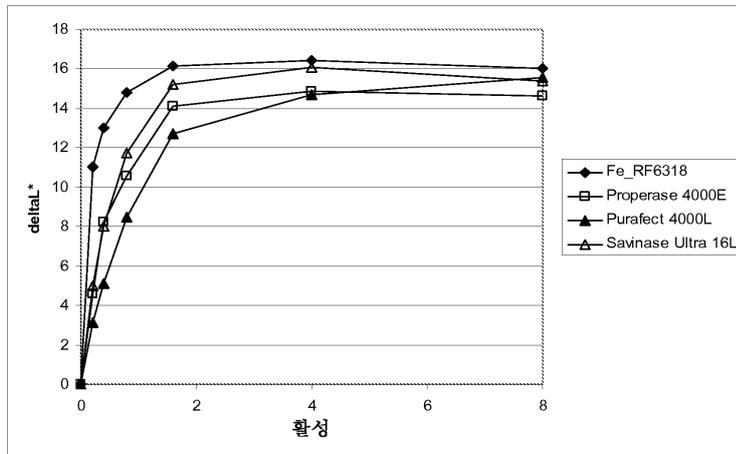
도면16d

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 40 °C, pH 9, 60 min.



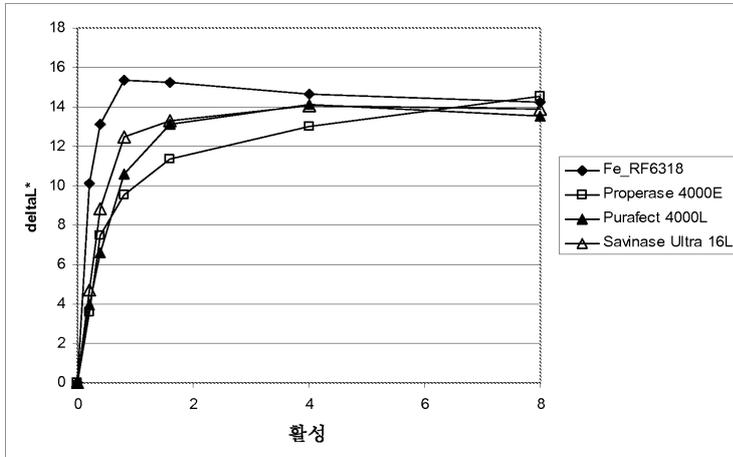
도면16e

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 50 °C, pH 9, 60 min.



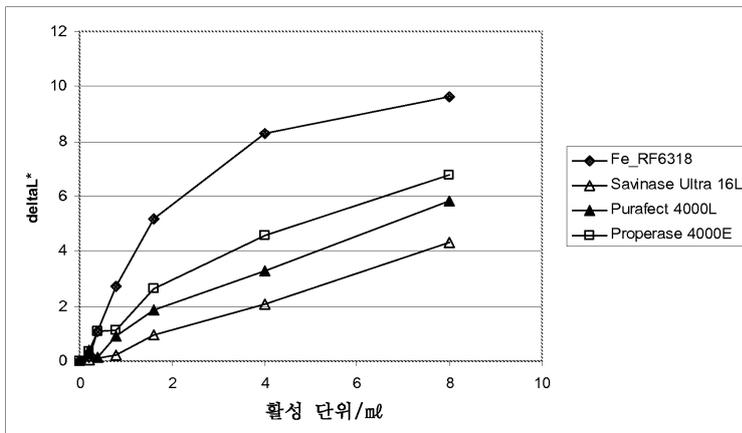
도면16f

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 60 °C, pH 9, 60 min.



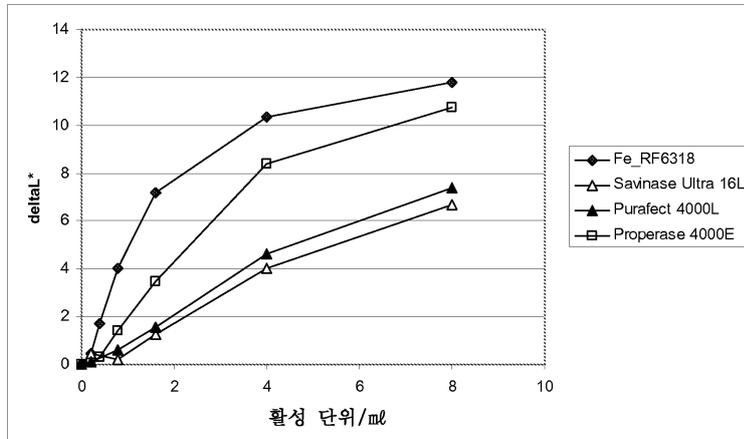
도면17a

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-우유-잉크 얼룩  
 액체 기본 세제 10°C, 세제 농도 3.3 g/l



도면17b

제조합 Fe\_RF6318의 성능  
 혈액-유유-인크 얼룩  
 액체 기본 세제 20℃, 세제 농도 3.3 g/l



서열 목록

- <110> AB Enzymes Oy
- <120> A novel fungal protease and use thereof
- <130> A9273PC
- <150> FI 20095497
- <151> 2009-04-30
- <160> 15
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Fusarium equiseti
- <220><221> MISC\_FEATURE
- <223> Sequence of an aminoterminal peptide #3792 from Fusarium equiseti RF6318 protease.
- <220><221> VARIANT
- <222> (18)..(18)
- <223> /replace= "Ser"
- <220><221> VARIANT
- <222> (18)..(18)
- <223> /replace= "Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (18)..(18)

<223> /replace= "Arg"

<400> 1

Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser

1                    5                    10                    15

Arg Cys Thr Pro

20

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Sequence of a tryptic peptide 1246.673 from Fusarium equiseti  
RF6318 protease.

<400> 2

Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg

1                    5                    10

<210

> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Fusarium equiseti

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Sequence of a tryptic peptide 3341.633 from Fusarium equiseti  
RF6318 protease.

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

Xaa Thr Tyr Gly Val Ala Lys

1                    5

<210> 4

<211> 14

<212> PRT  
 <213> Fusarium equiseti  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Sequence of a tryptic peptide 1503.799 from Fusarium equiseti

RF6318 protease

<220><221> VARIANT  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /replace= "Ile"  
 <400> 4  
 Glu Ala Leu Thr Val Gly Ala Thr Thr Ser Ala Asp Ala Lys  
 1                    5                    10

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PR087 derived from the  
           aminoterminal peptide SEQ ID NO:1.

<220><221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> r is a or g

<220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> y is t or c

<220><221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 5

cartcnaayg cncntgggg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PR088 derived from the aminoterminal peptide SEQ ID NO:1.

<220><221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> r is a or g

<220><221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> y is t or c

<220><221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> y is t or c

<220><221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 6

caragyaayg cncntgggg

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PR089 derived from peptide SEQ ID NO:4.

<220><221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> r is a or g

<220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 7

gcrtcngcng angngtngc

20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> The sequence of the oligonucleotide primer PR090 derived from  
           peptide SEQ ID NO:4.  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (3)..(3)  
 <223> r is a or g  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> r is a or g  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (12)..(12)

<223> n is a, c, g, or t  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n is a, c, g, or t  
 <400> 8

gcertcngcrc tngtngtngc 20

<210> 9  
 <211> 866  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence of the PCR fragment obtained using the primers PRO88 (SEQ ID NO:6) and PRO89 (SEQ ID NO:7) and *Fusarium equiseti* RF6318 genomic DNA as a template.

<400> 9

aaagcaacgc accgtggggc cttgtgcca tctcccgcg aacccccgt ggcagcacct 60  
 acacctacga caccactgcc ggtgccggta cttacggta cgtcgttgac tctggtatca 120

acaccgccc cactgacttt ggccggccgtg cttctctcgg ttacaacgct gctgggtggcg 180  
 cccacactga tacccttggc caggtacc accgttgctgg taccattgcc tccaacacct 240  
 acggtgttgc caagcgtgta agtacaatca taccacacat gagctacaac atgatctgaa 300  
 ctttatactt actattatta ggccaacgic atctctgtca aggttttcgt cggtaaccaa 360  
 gcttctacct ctgttatcct tgctggtttc aactgggctg tcaacgacat cacctccaga 420  
 accgtgctag cccgctctgt cateaacatg tctctcgggtg gtcctctctc tcagacctgg 480  
 gctactgcca tcaacgctgc ctacagccaa ggtgtcctct ccgttggttc tgccggtaac 540

ggtgattcca acggtcgtcc tctcccgc cctggccagt ctctgcca cgttcccaac 600  
 gctatcaccg ttgctgccgc cgactccagc tggcgaactg cctctttcac caactacggt 660  
 cctgaggtcg atgtcttcgg tcttggtgtc aacatccagt ccacctggta cacctccaac 720  
 agcgtacca acaccatcag cggctacctc atggcttgcc ctcacgttgc tggctcttgc 780  
 ctctacctcc aggtctctga gaacctcaat acccctgctg ccgtcaccaa ccgcatcaag 840  
 tctcttgcaa ctacctccgc tgacgc 866

<210> 10

<211> 1303

<212> DNA

<213> *Fusarium equiseti*

<220><221> misc\_feature

<223> The nucleotide sequence of the full-length *Fusarium equiseti* RF6318 protease gene (Fe prtS8A) .

<400> 10

atgactagct tccgccgat cgctcttggc cttgcagctc tgctgcccgc agtcctcgcc 60  
 gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact gccgcgctg acaagtacat catcacctc 120  
 aagcccaggc ctgctgaggc caaggtcgag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac 180  
 cgccgcagcc tcgcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc 240  
 tggaaagcct actctggcga gttcgacgat gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc 300

gaggttgcct tegtcgacc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc 360  
 tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gtccttggg gtcttgctgc catctcccgc 420  
 cgaacccccg gtggcagcac ctacacctac gacaccactg ccggtgccgg tacttacggt 480  
 tacgtcgttg actctggtat caaacccgcc cacactgact ttggcggcgg tgcttctctc 540  
 ggttacaacg ctgctgggtg cgcccacact gatacccttg gccacggtac ccacgttgct 600  
 ggtaccattg cctccaacac ctacggtgtt gccaagcgtg taagtacaat cataccccac 660  
 atgagctaca acatgatctg aactttatac ttactattat taggccaacg tcactctctg 720

caaggttttc gtcgtaacc aagcttctac ctctgttata cttgctggtt tcaactgggc 780  
 tgtaacgac atcacctcca agaaccgtgc tagccgetct gteatcaaca tgtctctcgg 840  
 tggcctctct tctcagacct gggctactgc catcaacgct gcctacagcc aaggtgtcct 900  
 ctccgttggt gctgccgta acggtgattc caacggtcgt cctctccccg cctctggcca 960  
 gtctctgccc aacgttccca acgtatac cgttgctgcc gccgactcca getggcgaac 1020  
 tgctctttc accaactacg gtcctgaggt cgatgtcttc ggtcctggtg tcaacatcca 1080  
 gtccacctgg tacacctcca acagcgtac caacaccatc agcgtacct ccatggcttg 1140

ccctcacgtt gctggtcttg ctctctacct ccaggctctc gagaacctca ataccctgc 1200  
 tgccgtcacc aaccgcatca agtctcttgc cactaccggc cgcatcactg gcagcctcag 1260  
 cggcagcccc aacgcatgg ctttcaacgg cgtactgct taa 1303

<210> 11

<211> 412

<212> PRT

<213> *Fusarium equiseti*

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The deduced amino acid sequence of the full-length *Fusarium equiseti* RF6318 protease (Fe\_RF6318) including amino acids from Met1 to Ala412.

<400> 11

Met Thr Ser Phe Arg Arg Ile Ala Leu Gly Leu Ala Ala Leu Leu Pro

1                    5                    10                    15  
Ala Val Leu Ala Ala Pro Thr Glu Lys Arg Gln Glu Leu Thr Ala Ala

                  20                    25                    30  
Pro Asp Lys Tyr Ile Ile Thr Leu Lys Pro Glu Ala Ala Glu Ala Lys

                  35                    40                    45  
Val Glu Ala His Met Ala Trp Val Thr Asp Val His Arg Arg Ser Leu

                  50                    55                    60  
Gly Lys Arg Asp Thr Ser Gly Val Glu Lys Lys Phe Asn Ile Ser Ser

65                    70                    75                    80  
Trp Asn Ala Tyr Ser Gly Glu Phe Asp Asp Ala Thr Ile Ala Glu Ile

                  85                    90                    95  
Lys Lys Ser Pro Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Ile Val Thr

                  100                    105                    110  
Leu Asp Tyr Lys Val Glu Pro Leu Ser Asp Arg Ala Leu Thr Thr Gln

                  115                    120                    125  
Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser Arg Arg Thr Pro Gly

                  130                    135                    140  
Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Tyr Gly

145                    150                    155                    160  
Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Thr Ala His Thr Asp Phe Gly Gly

                  165                    170                    175  
Arg Ala Ser Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly Ala His Thr Asp Thr

                  180                    185                    190

Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ser Asn Thr Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Gln Ala Ser Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly Phe Asn Trp Ala Val

225 230 235 240

Asn Asp Ile Thr Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg Ser Val Ile Asn Met

245 250 255

Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala Thr Ala Ile Asn Ala

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Pro Asn Ala Ile Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser Ser Trp Arg Thr Ala

305 310 315 320

Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val Phe Gly Pro Gly Val

325 330 335

Asn Ile Gln Ser Thr Trp Tyr Thr Ser Asn Ser Ala Thr Asn Thr Ile

340 345 350

Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His Val Ala Gly Leu Ala Leu Tyr

355 360 365

Leu Gln Ala Leu Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala Ala Val Thr Asn Arg

370 375 380

Ile Lys Ser Leu Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr Gly Ser Leu Ser Gly

385 390 395 400

Ser Pro Asn Ala Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr Ala

405 410

<210> 12

<211> 1243

<212> DNA

<213> *Fusarium equiseti*

<220><221> misc\_feature

<223> The nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of the proenzyme form of *Fusarium equiseti* RF6318 protease.

<400> 12

gctcccaccg agaagcgaca ggagctcact gccgcgctg acaagtacat catcacctc 60

aagcccgagg ctgctgaggc caaggtcgag gctcacatgg cctgggttac cgacgtccac 120

cgccgcagcc tcggcaagcg tgacacttcc ggtgttgaga agaagttcaa catcagcagc 180

tggaacgcct actctggcga gttcgacgat gctaccattg ctgagatcaa gaagagcccc 240

gaggttgctt tcgtcgagcc cgactacatt gtcaccctcg actacaaggt tgagcctctc 300

tctgaccgtg ctctgaccac tcagagcaac gtccttggg gtcttgctgc catctcccgc 360

cgaacccccg gtggcagcac ctacacctac gacaccactg ccggtgccgg tacttacggt 420

tacgtcgttg actctggtat caacaccgcc cacactgact ttggcggccg tgcttctctc 480

ggttacaacg ctgctggtgg cgcccacact gatacccttg gccacggtac ccacgttgtc 540

ggtaccattg cctccaacac ctacggtgtt gccaaagcgtg taagtacaat cataccccac 600

atgagctaca acatgatctg aactttatac ttactattat taggccaacg tcactctctgt 660

caaggttttc gtcgtaaac aagcttctac ctctgttate cttgtctggtt tcaactgggc 720

tgtaacgac atcacctcca agaaccgtgc tagccgctct gtcacacaaca tgtctctcgg 780

tggtccctct tctcagacct gggctactgc catcaacgct gcctacagcc aaggtgtcct 840

ctccgttgtt gctgccgta acggtgattc caacggctct cctctccccg cctctggcca 900

gtctctgcc aacgttcca acgctatcac cgttgctgcc gccgactcca gctggcgaac 960

tgctctttc accaactacg gtctgaggt cgatgtcttc ggtcctggtg tcaacatcca 1020

gtccacctgg tacacctcca acagcgtac caacaccatc agcggtaact ccatggcttg 1080

ccctcagtt gctggtcttg ctctctacct ccaggtctctc gagaacctca ataccctgc 1140

tgccgtcacc aaccgcatca agtctcttgc cactaccggc cgcatcactg gcagcctcag 1200

cggcagcccc aacgcatgg ctttcaacgg cgctactgct taa 1243

<210> 13

<211> 392

<212> PRT

<213> *Fusarium equiseti*

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The amino acid sequence of the proenzyme form of Fusarium

equiseti RF6318 protease including amino acids Ala21 to Ala 412  
of the full length protease.

<400> 13

Ala Pro Thr Glu Lys Arg Gln Glu Leu Thr Ala Ala Pro Asp Lys Tyr

1                    5                    10                    15

Ile Ile Thr Leu Lys Pro Glu Ala Ala Glu Ala Lys Val Glu Ala His

                  20                    25                    30

Met Ala Trp Val Thr Asp Val His Arg Arg Ser Leu Gly Lys Arg Asp

                  35                    40                    45

Thr Ser Gly Val Glu Lys Lys Phe Asn Ile Ser Ser Trp Asn Ala Tyr

                  50                    55                    60

Ser Gly Glu Phe Asp Asp Ala Thr Ile Ala Glu Ile Lys Lys Ser Pro

65                    70                    75                    80

Glu Val Ala Phe Val Glu Pro Asp Tyr Ile Val Thr Leu Asp Tyr Lys

                  85                    90                    95

Val Glu Pro Leu Ser Asp Arg Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro

                  100                    105                    110

Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser Arg Arg Thr Pro Gly Gly Ser Thr Tyr

                  115                    120                    125

Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly Ala Gly Thr Tyr Gly Tyr Val Val Asp

                  130                    135                    140

Ser Gly Ile Asn Thr Ala His Thr Asp Phe Gly Gly Arg Ala Ser Leu

145                    150                    155                    160

Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly Ala His Thr Asp Thr Leu Gly His Gly

                  165                    170                    175

Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Val Ala Lys

                  180                    185                    190

Arg Ala Asn Val Ile Ser Val Lys Val Phe Val Gly Asn Gln Ala Ser

                  195                    200                    205

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



gctctgacca ctcagagcaa cgctccttgg ggtcttgctg ccatctcccg cpgaaccccc 60

ggtaggcagca cctacaccta cgacaccact gccggtgccg gtacttacgg ttacgtcgtt 120

gactctggta tcaacaccgc ccacactgac tttggcggcc gtgcttctct cggttacaac 180

gctgctggtg gcgcccacac tgataccctt ggccacggta cccacgttgc tggtagcatt 240

gcctccaaca cctacggtgt tgccaagcgt gtaagtacaa tcatacceca catgagctac 300

aacatgatct gaactttata cttactatta ttaggccaac gtcactctctg tcaaggtttt 360

cgtaggtaac caagcttcta cctctgttat ccttgctggg ttcaactggg ctgtcaacga 420

catcacctcc aagaaccgtg ctagecgcctc tgtcatcaac atgtctctcg gtggtcctc 480

ttctcagacc tgggctactg ccatcaacgc tgcttacagc caaggtgtcc tctccgttgt 540

tgctgccggt aacgggtgatt ccaacggctg tcctctcccc gcctctggcc agtctcctgc 600

caacgttccc aacgctatca ccgttgctgc cgcgactcc agctggcgaa ctgcctcttt 660

caccaactac ggtcctgagg tcgatgtctt cggctcctggg gtcaacatcc agtccacctg 720

gtacacctcc aacagcgcta ccaacacat cagcggtagc tccatggctt gcctcacgt 780

tgctggctct gctctctacc tccaggctct cgagaacctc aataccctg ctgcegtcac 840

caaccgcatc aagtctcttg ccaactaccg ccgcatcact ggcagcctca gcggcagccc 900

caacgccatg gctttcaacg gcgctactgc ttaa 934

<210> 15

<211> 289

<212> PRT

<213> *Fusarium equiseti*

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> The amino acid sequence of the mature form of *Fusarium equiseti* RF6318 protease including amino acids Ala124 to Ala412 of the full length enzyme.

<400> 15

Ala Leu Thr Thr Gln Ser Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ala Ala Ile Ser

1                    5                    10                    15

Arg Arg Thr Pro Gly Gly Ser Thr Tyr Thr Tyr Asp Thr Thr Ala Gly

20                    25                    30

Ala Gly Thr Tyr Gly Tyr Val Val Asp Ser Gly Ile Asn Thr Ala His

35                    40                    45

Thr Asp Phe Gly Gly Arg Ala Ser Leu Gly Tyr Asn Ala Ala Gly Gly  
 50 55 60  
 Ala His Thr Asp Thr Leu Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Asn Thr Tyr Gly Val Ala Lys Arg Ala Asn Val Ile Ser Val  
 85 90 95  
 Lys Val Phe Val Gly Asn Gln Ala Ser Thr Ser Val Ile Leu Ala Gly  
 100 105 110  
 Phe Asn Trp Ala Val Asn Asp Ile Thr Ser Lys Asn Arg Ala Ser Arg  
 115 120 125  
 Ser Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Gln Thr Trp Ala  
 130 135 140  
 Thr Ala Ile Asn Ala Ala Tyr Ser Gln Gly Val Leu Ser Val Val Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Gly Asn Gly Asp Ser Asn Gly Arg Pro Leu Pro Ala Ser Gly Gln  
 165 170 175  
 Ser Pro Ala Asn Val Pro Asn Ala Ile Thr Val Ala Ala Ala Asp Ser  
 180 185 190  
 Ser Trp Arg Thr Ala Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Pro Glu Val Asp Val  
 195 200 205  
 Phe Gly Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Trp Tyr Thr Ser Asn Ser  
 210 215 220  
 Ala Thr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro His Val Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Ala Leu Glu Asn Leu Asn Thr Pro Ala  
 245 250 255  
 Ala Val Thr Asn Arg Ile Lys Ser Leu Ala Thr Thr Gly Arg Ile Thr  
 260 265 270  
 Gly Ser Leu Ser Gly Ser Pro Asn Ala Met Ala Phe Asn Gly Ala Thr  
 275 280 285  
 Ala

