

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 9/42		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2000년01월15일 10-0237148 1999년10월06일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 번역문제출일자 (86) 국제출원번호 (86) 국제출원일자 (81) 지정국	10-1992-0702788 1992년11월09일 1992년11월09일 PCT/DK 91/00123 1991년05월08일 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴 그리스 국내특허 : 오스트레일리아 브라질 캐나다 핀란드 일본 대한민국 노르웨이 소련 미국	(65) 공개번호 (43) 공개일자 (87) 국제공개번호 (87) 국제공개일자	특1993-0700649 1993년03월15일 W0 91/17243 1991년11월14일
(30) 우선권주장 (73) 특허권자 (72) 발명자 (74) 대리인	1159/90 1990년05월09일 덴마크(DK) 736/91 1991년04월22일 덴마크(DK) 노보 노르디스크 에이/에스 한센 핀 베네드 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레노보 노르디스크 에이/에스 안네 제헤르 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 그레테 라스무센 덴마크 디케이-2400 코펜하겐 엔브이 테크라베이 15 에스티. 티브이. 얀 뮐러 미켈센 덴마크 디케이-2820 겐토프테 스너얼레베이 20.1 마아틴 슐라인 덴마크 디케이-2100 코펜하겐 외 비이데벨쓰가데 51 삼칸트 아난트 파트카르 덴마크 디케이-2800 링비 크리스토퍼스 알레 91 프레드 하겐 미합중국 워싱턴 98112 시애틀 렉싱턴 웨이 이스트 1315 카아스텐 마이란트 흐요르트 덴마크 디케이-4000 로스킬데 개세아게렌 43 스벤 하스트롭 덴마크 디케이-2400 코펜하겐 엔브이 3 프레데릭스보르크베이 10 장용식		

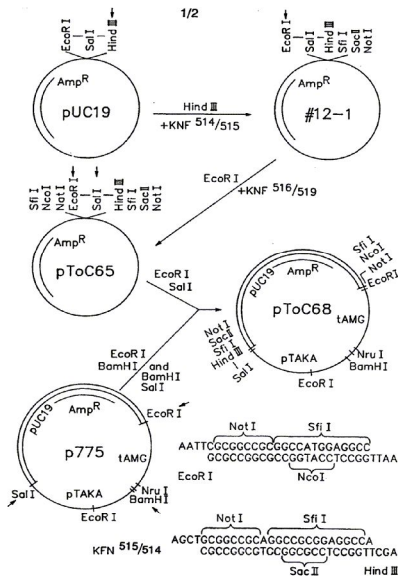
심사관 : 이치영

(54) 엔도글루칸아제 효소를 함유하는 셀룰라제 제조물

요약

Humicola insolens, DSM1800에서 추출한 고순도로 정제된 ~43KD엔도글루칸아제에 대해서 생긴 항체와 면역반응하거나 또는 상기의~43KD엔도글루칸아제에 동종성인 균질의 엔도글루칸아제 성분으로 본질적으로 이루어지는 셀룰라제 제조물을 거칠음 감소 또는 색깔 정화를 위해 섬유소-함유 직물을 처리하거나 또는 그러한 직물의 색깔의 부분적인 변화를 제공하는데 이용할 수 있다. 또한 그것을 종이필프 처리에 이용할수있다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

엔도글루칸아제 효소를 함유하는 셀룰라제 제조물

[발명의 분야]

본발명은 단일- 성분 엔도글루칸아제를 함유하는 셀룰라제 제조물, 셀룰라제 제조물을 함유하는 세정제 첨가물, 셀룰라제 제조물을 함유하는 세정제 조성물 뿐만 아니라 섬유소- 함유 직물을 셀룰라제 제조물로 처리하는 방법에 관한 것이다.

[발명의 배경]

일반적으로 면직물의 반복된 세탁은 직물에 현저한 불유쾌한 거칠음을 야기한다는 것이 당업계에서 알려져 있다. 그래서 이 문제를 극복하기 위한 몇가지 방법이 전에 당업계에서 제안되었다.

예컨대 Unilever Ltd. 의 GB 1,368,599에서는 면직물의 거칠음을 줄이기 위해 섬유소 분해효소를 이용하였다. 또한 US 4,435,307 (Novo Industri A/S)에서는 거칠음 감소 세정제 첨가물로서 AC_xI로 표시되는, Humicola insolens 로 부터 유래된 섬유소 분해효소 뿐만 아니라 그것의 분획을 이용하였다.

당업계에서 언급된 섬유소 분해효소의 다른 이용에는 직물에서의 얼룩제거와 직물의 색깔정화(예컨대 EP 220 016)가 포함되는데, 물흡수를 증가시키고(JP-B-52-48236), 색깔의 부분적인 변화를 일으켜서 처리된 직물이 “스톤-세탁된”(stone-washed)모양을 띠게 한다 (EP 307,564).

더욱이 섬유소 분해효소는 양조공업에서 β-글루칸 분해를 위해, 제빵공업에서 소맥분의 성질을 개선시키기 위해 사용될 수도 있다. 또한 종이펄프 공정에서 섬유소의 비- 결정질 부분을 제거하여 펄프내의 결정질 섬유소의 비율을 증가시키기 위하여, 그리고 펄프의 배수성질을 개선시키기 위하여, 및 동물사료에서 글루칸의 소화성을 개선시키기 위하여 사용될 수도 있다.

섬유소 분해효소의 실질적 이용은 어느 정도는 대개 복잡한 혼합물인 지금까지 알려진 셀룰라제 제조물의 본질에 의하여 늦춰졌다. 다수의 효소계 생성을 최적화하여 섬유소 분해효소의 공업적 비용-효과적인 생산을 이행하는 것은 어렵다. 그리고 그것의 실제 이용은 섬유소성 직물에 대한 원하는 효과를 달성하도록 다소 다량의 섬유소 분해효소를 적용할 필요에서 생기는 어려움에 의해 방해되었다. 이전에 제안된 셀룰라제 제조물의 결정은 많은 양의 엔도글루칸아제로 되어 있는 제조물을 이용함으로써 치유될 수 있다. 엔도글루칸아제 활성이 풍부한 셀룰라제 제조물이 WO 89/00069 에서 개시되었다.

[발명의 요약]

섬유소- 함유물질에 비해서 바람직한 활성수준을 나타내는 단일 엔도글루칸아제 성분이 분리되었다. 따라서, 본발명은 본질적으로 균질의 엔도글루칸아제 성분으로 구성되는 셀룰라제 제조물에 관한 것인데, 이 균질의 엔도글루칸아제 성분은 Humicola insolens, DSM 1800 으로부터 추출한 고순도로 정제된 43 kD 엔도글루칸아제에 대하여 생긴 항체와 면역반응 하거나 또는 상기의 43 kD 엔도글루칸아제와 상동성을 나타낸다.

셀룰라제의 이 특이한 엔도글루칸아제 성분이 섬유소-함유물질의 처리에 유용하다는 사실의 발견은 실제적으로 상당히 중요하다: 그것은 예컨대 활성성분을 생산하는데 재조합 DNA기술을 이용함으로써 셀룰라제의 비용-효과적인 생산을 가능하게 한다. 그리고 섬유소성 물질에 대한 원하는 효과를 달성하는데 더 적은 양의 셀룰라제 제조물이 필요하다는 사실은 효소와 실제적으로 효과적인 응용을 가능하게 한다.

[발명의 상세한 개시]

본발명의 셀룰라제 제조물은 유용하게 엔도글루칸아제 성분이 전체 단백질 mg 당 적어도 약 50 CMC-엔도아제 단위(endoase unit)의 CMC-엔도아제 활성을 나타내는 것이다.

여기서, “CMC-엔도아제활성”은 섬유소를 포도당, 셀로비오스 및 트리오스로 분해하는 능력에 의한 엔도글루칸아제 성분의 엔도글루칸아제 활성을 나타낸다. 이것은 하기에서 상세하게 기술될 것인데, 본발명의 셀룰라제 제조물과 카르복시메틸 셀룰로스(CMC) 용액을 배양시킨 후 이 CMC 용액의 점성도 감소로써 결정된다.

본발명의 바람직한 셀룰라제 제조물은 엔도글루칸아제 성분이 전체 단백질 mg 당 적어도 약 60, 특히 적어도 약 90의 CMC-엔도아제 단위의 CMC-엔도아제 활성을 나타내는 것이다. 특히, 바람직한 엔도글루칸아제 성분은 전체 단백질 mg 당 적어도 100 CMC-엔도아제 단위의 CMC-엔도아제 활성을 나타낸다.

CMC-엔도아제(엔도글루칸아제) 활성은 다음과 같이 CMC의 점성도 감소로 부터 결정될 수 있다: pH 9.0의 0.1M Tris 완충용액내에 35g/l CMC (Hercules 7 LFD)를 함유하는 기질용액을 제조한다. 똑같은 완충용액에 분석할 효소 샘플을 녹인다.

10ml의 기질용액과 0.5ml의 효소용액을 혼합하고나서 40°C로 자동온도조절된 점성도계(예컨대 Haake VT 181, NV sensor, 181 rpm)로 옮긴다. 혼합한 후 가능한 한 빨리 그리고 30분 후에 다시 점성도를 측정한다. 이러한 조건에서 점성도를 1/2만큼 감소시키는 효소의 양을 CMC-엔도아제 활성의 한 단위로 정의한다.

당업자들에게 공지된 방법으로 표지 단백질을 가지고 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)과 등전집속(isoelectric focusing)을 이용하여 본발명의 셀룰라제 제조물내의 엔도글루칸아제 성분의 분자량과 등전점(pi)을 결정하였다. 이 방법으로 특이적 엔도글루칸아제 성분의 분자량이 ≈ 43 kD으로 결정되었다. 이 엔도글루칸아제의 등전점은 약 5.1로 결정되었다. WO 89/00069에 기술되어 있는 것과 같이 엔도글루칸아제의 면역화학적 특성화 실험을 실질적으로 수행하여, 엔도글루칸아제가 *Humicola insolens*, DSM 1800의 고순도로 정제된 43 kD 엔도글루칸아제에 대해서 생긴 항체와 면역반응한다는 점을 밝혔다. 셀룰비오히드롤라제 활성은 셀로비오스 p-니트로페닐에 대한 활성으로 정의할 수 있다. 그 활성은 37°C, pH 7.0에서 분당 방출되는 니트로페닐의 μmole 로서 결정된다. 본발명의 엔도글루칸아제 성분은 본질적으로 셀로비오히드롤라제 활성을 갖지 않는다는 것이 밝혀졌다.

본발명의 셀룰라제 제조물에 있는 엔도글루칸아제 성분은 광범위한 정제과정, 즉 US 4,435,307에 따른 *H. insolens* 셀룰라제 조혼합물의 역상 HPLC 정제를 포함하는 정제과정에 의해 처음으로 분리되었다(실시예 1참조). 놀랍게도 이 과정에 의해 43 kD 엔도글루칸아제가 높은 엔도글루칸아제 활성에 기인한 바람직한 성질을 갖는 단일 성분으로서 분리되었다.

본발명의 다른 면은 첨부된 서열 리스트 ID#2에서 보여지는 아미노산 서열을 갖고 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 효소(하기에서는 “엔도글루칸아제 효소”로서 나타냈다), 또는 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 그것의 상동체에 관한 것이다.

여기서 “상동체”란 용어는 어떤 특이한 조건(5 × SSC에 미리 담근다음 20% 포름아미드 용액, 5 × 덴하르트용액, pH 6.8인 50mM 인산나트륨, 및 변성된 음파 파쇄된 송아지 흉선 DNA 50 μg 용액내에서 40°C에서 1시간 동안 미리 혼성화시킨 다음, 100 μM ATP가 들어있는 똑같은 용액에서 40°C에서 18시간 혼성화시키는 조건)하에서 이 아미노산 서열을 갖는 엔도글루칸아제 효소를 암호화하는 DNA와 똑같은 포도브에 혼성화하는 DNA에 의해 암호화된 폴리펩티드를 나타낸다. 이 용어는 상기에서 언급한 서열의 유도체를 포함하도록 의도되는데, 이 유도체는 본래 서열의 C-말단과 N-말단의 한쪽 또는 양쪽에 하나 이상의 아미노산 잔기를 첨가함으로써, 본래 서열의 하나 이상의 위치에 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환함으로써, 본래 아미노산 서열의 한쪽 끝 또는 양쪽 끝에서 또는 본래 서열내의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 삭제시킴으로써, 또는 본래 서열의 하나 이상의 위치에 하나 이상의 아미노산 잔기를 삽입함으로써 얻어진다.

본발명의 엔도글루칸아제 효소는 *Humicola insolens* 같은 *Humicola* 종, 예컨대 특허 절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약(부타페스트 조약)의 규정에 따라 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braun-schweig, FRG에 1981년 10월 1일 기탁된 균주 DSM 1800에 의하여 생성가능한 것일 수 있다.

본발명의 또다른 면은 첨부된 서열 리스트 ID#4에서 보여지는 아미노산 서열을 갖는 엔도글루칸아제 효소, 또는 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 그것의 상동체(상기에서 정의됨)에 관한 것이다.

상기의 엔도글루칸아제 효소는 *Fusarium oxysporum* 같은 *Fusarium* 종, 예컨대 부다페스트 조약 규정에 따라 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, FRG에 1983년 6월 6일 기탁된 균주 DSM 2672에 의하여 생성가능한 것일 수 있다.

더욱, 상동의 엔도글루칸아제가 섬유소 분해효소를 생산하는 다른 미생물, 예컨대 *Trichoderma*, *Myceliophthora*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, 및 *Geotricum* 종으로 부터 추출될 수 있다고 여겨진다.

본발명은 또한 상기에서 기술한 엔도글루칸아제 효소 또는 그 효소의 전구체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA구조체에 관한 것이다. 특히 DNA 구조체는 첨부된 서열 리스트 ID#1 또는 ID#3에서 보여지는 DNA 서열, 또는 그것의 변형 서열을 갖고 있다. 적당한 DNA 서열 변형의 실례로는 엔도글루칸아제의 다른 아미노산 서열로 되지는 않지만 DNA구조체가 도입된 숙주 개체의 코돈유시지(codon usage)에 해당되는 뉴클레오티드 치환, 또는 다른 아미노산 서열로 되어 아마도 본래 효소와는 다른 성질을 갖는 엔도글루칸아제 돌연변이체로 될수 있는 다른 단백질 구조로 되는 뉴클레오티드 치환이 있다. 가능한 변형의

다른 실례에는 서열내로 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 서열의 한쪽 끝에 하나 이상의 뉴클레오티드의 첨가, 또는 서열의 한쪽 끝 또는 서열내에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 삭제 등이 있다.

엔도글루칸아제 효소를 암호화하는 본발명의 DNA구조체는 공지된 표준방법, 예컨대 S.L. Beaucage 및 M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869에 기술된 포스포아미디트 방법, 또는 Matthes et al., EMBO Journal 3, 1984, pp. 801-805에 기술된 방법에 의하여 합성제조될 수 있다. 포스포아미디트 방법에 따라서, 올리고뉴클레오티드는 예컨대 자동 DNA 합성기에서 합성되어, 정제되고 어닐링되고 결합되고 적당한 벡터로 클로닝된다.

엔도글루칸아제 효소 또는 그것의 전구체를 암호화하는 DNA 구조체는 예컨대 *Humicola insolens*, DSM 1800 같은 셀룰라제-생산 미생물의 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 만들어서 통상적인 방법에 의하여 포지티브 클론을 스크리닝함으로써 분리할 수 있다. 이 통상적인 방법에는 표준기술에 따라서 엔도글루칸아제의 전체 또는 부분 아미노산 서열에 따라서 합성된 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용한 혼성화 방법(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor, 1989 참조), 또는 적당한 효소활성 (즉 상기에서 기술한 CMC-엔도아제 활성)을 발현하는 클론을 선택하는 방법, 또는 본래 셀룰라제(엔도글루칸아제)에 대한 항체와 반응하는 단백질을 생성하는 클론을 선택하는 방법 등이 있다.

결국, DNA 구조체는 표준기술에 따라서 그 단편이 전체 DNA 구조체의 다양한 부분에 해당되고 그 출처가 합성, 게놈 또는 cDNA인 단편을 결합함으로써 제조된, 혼합된 합성 및 게놈의 출처를 갖는 것, 혼합된 합성 및 cDNA 또는 혼합된 게놈 및 cDNA 출처를 갖는 것일 수 있다. DNA 구조체는 또한 특이적 프라이머를 이용한 중합효소 사슬반응, 예컨대 US 4,683,202 또는 R.K. Saiki et al., Science 239, 1988, pp. 487-491에 기술되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있다.

본발명은 또한 본발명의 DNA 구조체가 삽입되는 재조합 발현 벡터에 관한다. 이것은 통상적으로 재조합 DNA 과정에 이용되는 어떤 벡터일 수 있고, 벡터의 선택은 대개 그것이 도입될 숙주 세포에 의해 좌우될 것이다. 그리하여 벡터는 자율적으로 복제하는 벡터, 즉 염색체외 실체로서 존재하여 그것의 복제가 염색체 복제와 독립적인 벡터, 예컨대 플라스미드일 수 있다. 또한, 벡터는 숙주세포내에 도입되었을 때, 숙주 세포게놈 속에 통합되어 통합된 염색체와 같이 복제되는 것일 수도 있다.

벡터에서, 엔도글루칸아제를 암호화하는 DNA 서열이 적당한 프로모터와 터미네이터 서열에 작동적으로 연결되어야 한다. 프로모터는 선택된 숙주세포에서 전사활성을 나타내는 어떤 DNA 서열일 수 있고, 숙주 세포에 동종인 또는 이종인 단백질을 암호화하는 유전자로 부터 추출될 수 있다. 엔도글루칸아제를 코딩하는 DNA 서열, 프로모터 및 터미네이터를 각기 결합시켜서 그것을 적당한 벡터내로 삽입하는데 이용되는 과정은 당업자들에게는 공지되어 있다 (예컨대 Sambrook et al., op. cit. 참조).

본발명은 또한 본발명의 DNA 구조체 또는 발현 벡터로 형질 전환되는 숙주세포에 관한다. 숙주 세포는 예컨대 *Aspergillus* 종, 가장 바람직하게는 *Aspergillus oryzae* 또는 *Aspergillus niger*에 속할 수 있다.

프로토플라스트(protoplast) 형성과 프로토플라스트의 형질전환에 의해 본래 공지된 방법으로 세포벽을 재생시키는 과정에 의해 곰팡이 세포가 형질전환될 수 있다. 숙주 미생물로서 *Aspergillus*를 이용한 것이, 그 내용이 참고문헌에 의해 여기에 통합되어 있는 EP 238,023 (Novo Industri A/S)에 기술되어 있다. 숙주세포가 또한 효모세포, 예컨대 *Saccharomyces cerevisiae* 균주일 수도 있다.

한편, 숙주 개체가 세균, 특히 *Streptomyces*, *Bacillus*, 및 *E. coli* 균주일 수 있다. 세균세포의 형질전환은 통상적인 방법, 예컨대 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989에 기술되어 있는 방법에 따라 수행될 수 있다.

본발명은 또한 본발명의 엔도글루칸아제 효소를 생산하는 과정에 관한다. 이 과정은 엔도글루칸아제 효소의 발현을 허용하는 조건하에서 적당한 배양 배지내에서 상기에서 기술한 숙주세포를 배양하고, 배양물로 부터 엔도글루칸아제 효소를 회수하는 것으로 이루어진다. 형질전환된 숙주세포를 배양하는데 이용된 배지는 문제의 숙주세포를 성장시키는 데 적당한 어떤 통상적인 배지일 수 있다. 발현된 엔도글루칸아제는 편리하게 배양배지 속으로 분비되어 거기서, 원심분리 또는 여과에 의해 배지에서 세포를 분리하고 배지의 단백질성 성분을 황산암모늄 같은 염에 의하여 침전시키고 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피 과정에 의해 수행하는 공지된 방법으로 회수할 수 있다.

상기에서 지정한 재조합 DNA기술, 단백질 정제기술, 발효와 돌연변이 기술 또는 당업계에서 공지된 다른 기술을 이용하여 고순도의 엔도글루칸아제를 제공하는 것이 가능하다.

본발명의 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제 효소는 편리하게 침출 또는 세척공정시 다른 세정제 물질과 함께 섬유소-함유 식물에 첨가될 수 있다. 따라서 본발명의 다른 면은 본발명의 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제 효소로 구성된 세정제 첨가물에 관한다. 세정제 첨가물은 적당히 비-살포 입상형태, 안정화된 액체 또는 보호된 효소 형태일 수 있다. 비-살포 입상은 예컨대 US 4,106,991 및 4,661,452 (Novo Industri A/S)에 따라 생산될 수 있고 당업계에서 공지된 방법에 의해 선택적으로 코팅될 수 있다. 액체 효소 제조물은 예컨대 프로필렌글리콜 같은 폴리올, 당 또는 당알코올, 젖산 또는 붕산을 공지된 방법에 따라 첨가함으로써 안정화될 수 있다. 다른 효소 안정화제가 당업계에서 공지되어 있다. 보호된 효소는 EP 238,216에서 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다.

세정제 첨가물은 첨가물 g당 효소단백질을 1-500mg, 바람직하게는 5-250mg, 가장 바람직하게는 10-100mg 적당히 포함한다. 더욱 세정제 첨가물은 통상적으로 세정제 첨가물에 포함되는 프로테아제, 리파제, 퍼옥시다제 또는 아밀라제와 같은 하나 이상의 다른 효소를 포함할 수 있다.

본발명에 따라서, 프로테아제가 *Bacillus lentus* 세린 프로테아제 보다 더 높은 정도의 특이성을 갖는 것일때, 저장 안정성이 증가된 엔도글루칸아제 효소가 얻어진다는 것을 발견했다 (본 목적에 대하여 B.

lentus 세린 프로테아제 보다 더 높은 정도의 특이성을 갖는 프로테아제는 다음 조건하에서 B. lentus 세린 프로테아제 보다 인간의 인슐린을 더 적은 수의 성분으로 분해하는 것이다: pH 9.5인 B와 R완충용액 내의 인간의 인슐린의 1mg/ml 용액 0.5ml을 37°C에서 120분간 리터 당 0.6 CPU의 효소용액 75 μ l와 배양한다 [Novo Nordisk Analysis Methods No. AF 228/1], 그리고 1N HCl 50 μ l로 반응을 끝낸다). 그러한 프로테아제의 실례로는 서브틸리신 노보(subtilisin Novo) 또는 그것의 변형 (예컨대 US 4,914,031에 기술되어 있는 변형), Nocardia dassonvillei NRRL 18133에서 추출가능한 프로테아제(WO 88/03947에 기술되어 있음), Bacillus licheniformis에 의해 생성될 수 있는 글루탐산과 아스파르트산에 특이적인 세린 프로테아제(이 프로테아제는 공동 계류중인 국제특허출원 No. PCT/DK91/ 00067에 세부적으로 기술되어 있다), 또는 Fusarium SP. DSM 2672에 의해 생성될 수 있는 트립신- 같은 프로테아제(이 프로테아제는 WO 89/06270에 세부적으로 기술되어 있다)가 있다.

본발명의 또다른 면은 본발명의 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제 효소로 구성되는 세정제 조성물에 관한다.

본발명의 세정제 조성물은 부가적으로 음이온성, 비- 이온성, 양이온성, 양성, 또는 쌍성 유형일 수 있는 계면활성제 뿐만 아니라 이 계면활성제 유형의 혼합물로 되어 있다. 음이온성 계면활성제의 전형적인 실례로는 선상알킬벤젠 술폰산(LAS), 알파 올레핀술폰산(AOS), 알코올 에톡시황산(AES) 및 천연 지방산의 알칼리 금속염이 있다. 그러나, 엔도글루칸아제는 음이온성 세정제 존재하에서는 덜 안정하고, 비-이온성 세정제 또는 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리비닐알코올 같은 어떤 중합체 화합물 존재하에서는 더 안정하다는 것이 관찰되었다. 결과적으로, 세정제 조성물은 낮은 농도의 음이온성 세정제 및/ 또는 상기에서 지적한 비- 이온성 세정제 또는 안정화 중합체의 상당량을 포함할 수 있다.

본발명의 세정제 조성물은 당업계에서 공지된 다른 세정제성분 예컨대 유지, 표백제, 표백활성제, 향-부식제, 킬레이트화제, 향토양- 재침전제, 향수, 효소 안정화제 등을 포함할 수 있다.

본발명의 세정제 조성물은 어떤 편리한 형태, 예컨대 파우더 또는 액체로 제조될 수 있다. 상기에서 지적한 효소 안정화제를 포함시켜서 액체 세정제내에서 효소가 안정화될 수 있다. 대개, 본발명의 세정제 조성물 용액의 pH는 7-12 어떤 경우에는 7.0-10.5일 것이다. 본발명의 세정제 조성물 속에는 프로테아제, 리파제 또는 아밀라제 같은 다른 세정제 효소가 각각 별도로 또는 상기에서 지적한 결합된 첨가물로 포함될 수도 있다.

본발명의 셀룰라제 제조물에 의해 획득가능한 연성화, 얼룩제거 및 색깔정화 효과에는 일반적으로 세척용액내의 셀룰라제 제조물 농도가 리터 당 효소 단백질의 0.0001-100mg, 바람직하게는 0.0005-60mg, 가장 바람직하게는 0.01-20mg 필요하다. 본발명의 세정제 조성물은 전형적으로 세척용액내의 농도 0.5-20g/l로 이용한다. 일반적으로, 세정제 첨가물을 세정제 조성물의 0.1-5% w/w 양으로, 또는 바람직하게는, 0.2-2% 양으로 첨가하는 것이 가장 편리하다.

본발명의 다른 면은 섬유소- 함유 직물이 거칠어지는 속도를 감소시키는 방법 또는 섬유소- 함유 직물의 거칠음을 감소시키는 방법에 관한다. 이 방법은 섬유소- 함유 직물을 상기에서 기술된 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제 효소로 처리하는 것으로 이루어진다. 본발명은 또한 착색한 섬유소- 함유 직물을 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제로 처리하여 착색한 섬유소-함유 직물의 색깔 정화를 제공하는 방법, 그리고 착색한 섬유소- 함유 직물을 본발명의 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제로 처리하여 착색한 섬유소- 함유 직물의 부분적인 색깔 변화를 제공하는 방법에 관한다. 본발명의 방법은 세척하는 동안 섬유소- 함유 직물을 처리함으로써 수행될 수 있다. 그러나, 원한다면 단순히 직물이 있는 물 또는 직물을 담글 물에 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제 효소를 첨가함으로써 또는 침출 또는 행굼 동안 직물처리를 수행할 수도 있다.

본발명에 따라서, 종이 펄프의 배수성이 본발명의 엔도글루칸아제 처리로 상당한 강도의 상실 없이 개선될 수 있다. 결과적으로 본발명은 종이펄프를 본발명에 따라서 셀룰라제 제조물 또는 엔도글루칸아제 효소로 처리하여 펄프의 배수성을 개선시키는 방법에도 관계한다. 이 방법에 의해 처리가능한 펄프의 실례에는 휴지펄프, 재생마분지펄프, 크라프트펄프, 아황산염펄프, 또는 가공열 펄프 및 다른 고-수율 펄프가 있다.

본발명은 어떤 식으로든 본발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않는 하기의 실시예의 바람직한 구체예에서 상세히 기술된다.

[실시예]

[실시예 1]

[Humicola insolens 로 부터 43 kD 엔도글루칸아제의 분리]

[1. Humicola insolens 셀룰라제 혼합물로 부터 정제한 43 kD 엔도글루칸아제와 반응하는 토끼항체의 제조]

US 4,435,307, 실시예 6에 기술된 것처럼 Humicola insolens DSM 1800을 배양하여 셀룰라제를 생산했다. 조셀룰라제는 배양 육즙으로부터 규모조에서의 여과, 초여과(ultrafiltration) 및 체류물의 동결건조에 의하여 회수되었다 (US 4,435,307의 실시예 1과 6참조).

조셀룰라제를 WO 89/09259에 기술된 것처럼 정제하여 이 분획 F1P1C2를 쥐의 면역화에 이용했다. 면역화는 2주일 간격으로 5번 수행했고, 매번 프로인트 보조액(Freund's Adjuvant)을 포함한 25 μ g 단백질을 사용했다.

하이브리도마(Hybridoma) 세포계통은 Ed Harlow 및 David Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1988에 기술되어 있는 것처럼 확립시켰다. 그 과정을 간단히 기술하면 다음과 같다: 쥐를 방혈시켜서 쥐의 혈청이 F1P1C2 분획에 존재하는 단백질과 반응한다는 것을 보인 후

에, 지라를 제거하여 균질화시키고 그 다음 PEG 와 하이클론(Hyclone, Utah, USA)의 팩스- 리버(Fox-river) 골수중세포와 혼합시켰다. 하이브리도마는 확립된 HAT 스크리닝 과정에 따라 선택되었다. 재클로닝된 하이브리도마 세포 계통이 안정화되었다. 이 세포 계통에 의하여 생성된 항체를 스크리닝하여 세로텍(serotec, Oxford, England)의 상업적인 쥐의 단일 클론 검출키트를 이용하여 IgG1 아강에 속하는 것을 선택 하였다. 그 다음 포지티브 항체를 통상적인 ELISA로 F1P1G2와의 반응성을 스크리닝하여 F4, F15, F41을 선택하였다. 그것들은 모두 ELISA 반응이 매우 양호했지만 H. insolens, DSM 1800의 조셀룰라제를 SDS-PAGE 한후 웨스턴 블롯(Western Blot)하여 면역블로팅(immunoblotting)했을 때에는 다른 반응을 나타냈다. 이 사실은 그것들이 다른 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다.

CRBF₁ 쥐의 복수액에서 3개의 항체가 다량으로 생성되었다. 복수액으로 부터 세파로스에 결합된 단백질 A (Kem. En. Tek., Copenhagen, Denmark)를 이용한 단백질 A 정제에 의해 쥐의 감마글로불린을 정제하였다. 각기 다른 단일클론 감마글로불린에 있어 각 단일클론 항체를 캐칭(catching)항체로, 셀루자임(Celluzyme)의 다양한 HPLC 분획을 항원으로, 셀루자임의 엔도글루칸아제 B에 대해 생인 토끼의 항체를 탐지(detection)항체로 이용하는 샌드위치 ELISA에 대한 반응을 검사하였다. ELISA에서 결합을 눈에 보이게 하기위해, 토끼 IgG에 대한 포르신 항체를 다코파트(Dako patts, Copenhagen, Denmark)의 퍼옥시다제에 공유결합시켜서 OPD(1,2- 페닐렌디아민, 디히드로클로리드)/H₂O₂로 육안으로 볼수 있도록 하였다.

가장 강한 ELISA 반응은 단일클론 항체 F41에서 얻어져서, 이것을 면역친화성 정제 단계에서 이용했다.

정제한 쥐의 감마글로불린 F41을 제조회사(Pharmacia, Sweden)에 의해 기술된 것처럼 CNBr- 활성화된 세파로스 4B 43g에 결합시켜서 세척하였다.

[2. H. insolens 셀룰라제 혼합물로 부터 43 kD 엔도글루칸아제의 면역친화성 정제(Immunoaffinity purification)]

H. insolens 셀룰라제 혼합물 (상기에서 기술된 것과 같음)을 3% 건조물질로 희석하고 4°C에서 15분간 pH를 3.5 로 조정했다. pH를 7.5로 조정 한 후에 여과에 의해 침전물을 제거했다. 그 다음 황산나트륨을 첨가하여 활성효소를 침전시켰다. 이것은 40°C에서 행해졌다 (pH 5.5에서 kg당 260g). 침전물을 물로 용해시켜서 여과했다. 산처리를 반복했다. 최종적으로, 생성물을 여과하고 10,000MW 차단 폴리비닐술폰산막을 이용한 초여과에 의해 농축하였다.

셀룰라제 생성물을 3% 건조물질로 희석하고 pH를 9.0 으로 조정했다. 그리고 제조회사(Pharmacia, Sweden)에 의해 추천되는 DEAE- 세파로스 컬럼상에서 음이온 교환 크로마토그래피를 수행했다.

프로테아제- 제거 셀룰라제 생성물을 인산나트륨 완충용액 pH 8.0에서 상기에서 기술된 F41 감마글로불린- 결합된 세파로스 컬럼상에 적용시켰다. 적용후 컬럼을 0.5M 염화나트륨을 함유한 같은 완충용액으로 세척했다. 그 다음에는 컬럼을 0.5M 염화나트륨을 함유한 0.1M 아세트산나트륨 완충용액(pH 4.5)으로 세척했다. 그후 컬럼을 5mM 아세트산나트륨 완충용액(pH 4.5)으로 세척했다. 최종적으로 ~43 kD 엔도글루칸아제를 0.1M 시트르산으로 용출시켰다.

전체수율: 엔도글루칸아제 활성이 1563 CMC-엔도아제 단위인 25mg.

용출된 단백질은 SDS-PAGE에서 단일 밴드로서 움직이고 겔보기 MW가 ~43 kD이며 등전점속후 pI는 약 5.0 내지 5.2이었다. 불활성 단백질은 역상 정제에 의하여 제거했다.

불활성 및 활성단백질은 HPLC에 의해 2-프로판올을 구배를 이용하여 분리되었다. 불활성 단백질은 약 25% 2- 프로판올에서 용출되고 활성 ~43 kD 엔도글루칸아제는 30% 2- 프로판올에서 용출된다. 활성 엔도글루칸아제는 CMC-Congo Red 제거구역(clearing zone)에 의하여 검출할 수 있다.

이 방법으로 전체 122 CMC 엔도아제 단위를 갖는 0.78mg의 활성 단백질을 회수했다. 이 과정이 30번 반복되었다. ~43 kD 엔도글루칸아제는 TFA와 프로판올을 제거하기 위해 먼저 냉동건조시키고 그 다음 인산완충용액에 용해시켜서 회수했다.

정제된 물질의 엔도글루칸아제 활성은 단백질 mg 당 156 CMC-엔도아제 단위였고 냉동건조를 포함하여 전체 수율은 엔도글루칸아제 활성의 65% 였다.

그렇게 획득된 ~43 kD 효소를 N. Axelsen et al. in A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter 23에 기술되어 있는 과정에 따라 토끼를 면역화하는데 이용하였다. 항혈청으로 부터 공지된 방법으로 황산암모늄 침전, 투석, DEAE- 세파덱스(sephadex) 상에서 이온교환 크로마토그래피에 의하여 정제된 면역글로불린을 회수하였다. 정제된 면역글로불린과 엔도글루칸아제의 결합이 결정되었고, 더 연구하기 위해 토끼 면역글로불린 AS 169를 선택하였다.

2. ~43 kD 엔도글루칸아제의 특정화

아미노산조성: 전체 가수분해를 이용하여, 아미노산 분석한 후 다음 조성을 얻었다:

Asp	17
Asn	15
Thr	25
Ser	29
Glu	6

Gln	13
Pro	21
Gly	32
Ala	23
Cys	20
Val	14
Met	1
Ile	7
Leu	8
Tyr	6
Phe	15
Lys	9
His	2
Trp	9
Arg	12

비- 글리코실화된 단백질의 Mw는 아미노산 조성에 근거하여 30,069로 계산되었다. 글리코실화는 6,840 MW에 대응하는

갈락토스	10
만노스(Mannose)	28

로 측정되었고, 결국 엔도글루칸아제의 전체 MW는 36,900 (+/-2,400)으로 결정되었다. 몰 당 흡광 계수는 다음과 같이 측정되었다:

트립토판	9배	5690
티로신	6배	1280
시스테인	20배	120
전체	몰당	61290

흡광계수는 280nm 에서 1.66인데 이것은 m^l당 단백질 1mg에 해당한다 (참고: S.C. Gill 및 P. Hippel, Anal. Biochemistry 182, 312-326 (1989)).

아미노산 서열은 에드만(Edman) 분해를 이용한 Applied Biosystems 475A Protein Sequenator로 결정되었다. 단지 하나의 서열이 단백질의 순도를 나타냈다. 아미노산 서열은 첨부된 서열리스트 ID#2에서 보여진다.

효소성질:

이 효소는 pH3 과 9.5 사이에서 안정하다.

이 효소는 결정질 섬유소 또는 기질 셀로비오스 β-p- 니트로페닐(셀로비오히드롤라제 기질)을 분해하지 못하지만, 비결정질 섬유소는 주로 셀로비오스, 셀로트리오스 및 셀로테트라오스로 분해한다. 이것은 이 효소가 불용성의 비결정질 섬유소로부터 셀로덱스트린을 생성하는데 이용될 수 있다는 것을 나타낸다.

이 효소는 약 50°C에서 최대 활성을 갖고 pH 6.0과 10.0 사이에서 활성이 있다.

[실시예 2]

[*Aspergillus oryzae*에서 ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 클로닝과 발현]

[부분 cDNA:]

cDNA 라이브러리는 Okayama 및 Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 161-170 방법에 따라서 *Humicola insolens* 균주 DSM 1800 mRNA 부터 만들어졌다 (Kaplan et al. (1979) Biochem. J. 183, 181-184). 이 라이브러리는 재조합체로부터 고정화된 DNA를 갖는 필터로 방사성 표지된 올리고뉴클레오티드와의 혼성화에 의해 스크리닝되었다 (Gergen et al. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 2115-2136). 올리고뉴클레오티드 프로브는 정제된 ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 트립신 단편의 아미노산 서열에 기초하여 만들어졌다. 3 개의 다른 프로브(NOR 1251, 2048, 2050)에 혼성화하는 한개의 콜로니를 발견하여 분리했다. 그 서열은 삽입된 680 bp cDNA가 ~ 43 kD 단백질의 C-말단 181 아미노산과 3' 비번역되는 mRNA를 암호화한다는 것을 나타냈다. 이 클론으로부터 237 bp 길이의 Pvu I-Xho I 단편을 *H. insolens* mRNA 와의 노던 블롯(Northern blot; Sambrook et al, op. cit., P, 7.40-7.42 및 P, 7.46-7.48에 기술되어 있음) 을 프로브하는데 이용하였다. 그래서 전체 ~ 43 kD mRNA는 대략 1100 bp의 길이를 갖는다는 것을 알게되었다. 똑같은 균주로부터 게놈 라이브러리를 프로브하는 데에도 똑같은 237 bp 단편을 이용하였다.

[게놈클론:]

Humicola insolens 균주 DSM 1800의 게놈 라이브러리는 옐톤(Yelton) 방법(M. M. Yelton et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81. 1470-1474)에 의해 제조된 전체 DNA로 부터 만들어져서 Sau 3A로 부분 분해시켰다. 4 kb 보다 더큰 단편을 아가로스겔에서 분리하고 Bam HI으로 분해된 pBR 322에 결합시키고 탈인산화시켰다. 결합생성물을 통상적인 방법으로 r-m+ 로 만들어진 *E. coli* MC1000 속에 형질전환 시켰다 (Casadaban 및 Cohen (1980). J. Mol. Biol., 138, 179-207). 40,000개의 재조합체를 “부분 cDNA” 절에서 기술한 237 bp Pvu I -Xho I 부분 cDNA 단편으로 스크리닝했다. ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 전체 서열을 포함한 2개의 콜로니를 선택하여 그 유전자를 제조회사의 지침에 따라서 시퀀나제키트(Sequenase[®] kit, United States Biochemical Corporation)를 이용한 디데옥시 방법에 의하여 서열결정하였다. 그 서열은 게놈유전자에 있는 하나의 인트론만 제외하고는 전체 길이의 cDNA 유전자의 서열(하기의 “전체길이 cDNA” 절 참조)과 동일하였다.

게놈 유전자를 제조회사의 지침에 따라서 Perkin-Elmer/Cetus DNA Amplification System을 이용한 PCR 방법에 의해 증폭시켰다. 유전자의 5' 끝에는 프라이머 NOR 2378을 이용했다. 이 프라이머는 하나의 C가 T 치환되어 Bcl I 부위를 생성한 것을 제외하고는 그 유전자의 5' 비-번역되는 끝과 매치하는 25-mer이다. 이 유전자의 3' 끝에는 프라이머 NOR 2389를 이용했다. 이 프라이머는 21염기가 유전자의 3' 비번역되는 부분에 매치되고 프라이머 5' 끝에 있는 5 염기가 Sal I 부위를 채우는 26-mer이다.

Aspergillus 발현 벡터 pToC 68은 플라스미드 p775 (그것의 제조는 EP 238 023에 기술되어 있다)로 부터 다음 링커(linker)의 삽입에 의하여 제조되었다.

KFN 514: 5'-AGCTGCGGCCGCGAGGCCGCGGAGGCCA-3'
KFN 515: 3'-CGCCGGCGTCCGGCGCCTCCGGTTCTGA-5'
SacII HindIII

EcoRI NotI StI

KFN 516: 5'-AATTCGCGGCCGCGGCCATGGAGGCC-3'
KFN 519: 3'-GCGCCGGCGCCGGTACCTCCGGTTAA-5'
NcoI

pToC의 제조는 첨부한 제1도에 도시되어 있다.

상기에서 얻어진 PCR 단편을 BclI과 SalI으로 분해하고 BamHI 과 XhoI으로 분해된 pToC 68 속에 삽입시켰다. 결과적으로 생긴 플라스미드의 삽입체(pCaHj 109) 를 서열결정하여 본래의 클론과 동일하다는 것을 보였다.

[전체길이 cDNA:]

첫번째 사슬 cDNA는 알려진 서열내의 특이적인 프라이머 (NOR 2153)로 부터 합성되었고, 두번째 사슬 합성은 Gubler 및 Hoffman (1983) GENE 25, 263-269 방법에 의해 행해졌다.

게놈 유전자의 서열은 mRNA의 5' 부분을 포착하고 동시에 ATG 개시코돈 바로 앞에 Bam HI 부위가 도입되도록 PCR 프라이머를 디자인하는 것을 가능하게 했다(NOR 2334). 5' 끝에는 이 프라이머를 이용하고 3' 끝에는 다시 NOR 2153를 이용하여 이중사슬 cDNA 생성물에 대해서 PCR 을 수행했다. 그 다음 PCR-cDNA의 전체길이 코딩부분은 3' PvuI-Eco 0109와 함께 PCR 반응의 5' Bam HI-Pvu I 단편을 클리나우(klenow) 중합효소로 채워서 그것을 평채 말단화시킨 뒤 *Aspergillus* 발현 벡터 pToC 68의 Bam HI-Nru I 커트속에 클로닝함으로써 제조 되었고 (제1도), 삽입된 DNA의 서열을 체크하였다 (p5×320) (제2도 참조). 전체길이 cDNA의 서열은 첨부한 서열리스트 ID#1에서 보여지고 있다.

사용한 올리고뉴클레오타이드 프라이머:

- NOR 1251: 5'-AAYGCGACAAAYCC-3'
- NOR 2048: 5'-AACGAYGAYGGNAAYTTCCC-3'
- NOR 2050: 5'-AAYGAYTGGTACCAYCARTG-3'
- NOR 2153: 5'-GCGCCAGTAGCAGCCDGGCTTGAGGG-3'
- NOR 2334: 5'-ACGTCTCAACTCGGATCCAAGATCGTT-3'
- NOR 2378: 5'-CTCAACTCTGATCAAGATGCGTTCC-3'

Bcl I

- NOR 2389: 5'-TGTGACCAGTAAGGCCCTCAAGCTG-3'

명명법:

Y: 피리미딘 (C + T)

R: 퓨린 (A + G)

N: 4개의 염기 모두

진한부분: 본래의 서열에 대하여 변화 또는 삽입

밑줄친 부분: PCR에 의하여 도입된 제한 부위

~ 43 kD 엔도글루칸아제의 발현:

플라스미드 pS×320 을 *Aspergillus oryzae* IF0 4177의 프로테아제 결핍 유도체인 *Aspergillus oryzae* A1560-T40에 형질전환시켰다. 여기서는 PUC 19 벡터(Yannisch-Perron et al. (1985), GENE 33, 103-119) 상에 있는 2.7 kb Xba I 단편(Corrick et al. (1987), GENE 53, 63-71) 으로서 *A. nidulans* 의 amdS 유전자를 함유하는 pToC 90과 공형질전환시켜서 아세트아미드에서 선택하였다. 형질전환은 공표된 EP 특허 출원 번호 238 023에 기술되어 있는 것처럼 수행되었다. 많은 형질전환체를 ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 공- 발현에 대해서 스크리닝하였다. 형질전환체를 SDS-PAGE와 CMC-엔도글루칸아제 활성에 의하여 평가했다.

게놈 유전자를 포함하는 플라스미드(pCaHj 109)를 똑같은 과정으로 *Aspergillus oryzae* A1560-T40 속으로 형질전환시켰다.

형질전환체의 평가는 발현수준이 cDNA 형질전환체의 발현수준과 유사하다는 것을 나타냈다.

정제한 ~ 43 kD 엔도글루칸아제를 그것의 N-터미널 서열 및 탄수화물 함량에 대해서 분석했다. N-터미널 아미노산 서열은 HPLC 정제한 ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 그것과 동일하다는 것을 나타냈다. 탄수화물 함량은 HPLC 정제한 ~ 43 kD 효소의 그것과 달랐다. 재조합 효소는 포도당 보다 10+/-8 갈락토스당/mol을 포함하였다.

[실시예 3]

[*Fusarium oxysporum* 게놈 DNA의 분리]

*Fusarium oxysporum*의 냉동- 건조 배양물을 인산완충용액으로 재구성하여 5개의 FOX 배지 플레이트(6% 효모추출물, 1.5% K₂HPO₄, 0.75% MgSO₄·H₂O₂, 22.5% 포도당, 1.5% 한천, pH 5.6)의 각각에 5번 스폿팅(spotting)하고 37°C에서 배양하였다. 6일 동안 배양한 후에 콜로니를 플레이트로 부터 0.001% Tween-80 15mg로 벗겨내서 두껍고 흐린 현탁액으로 만들었다.

각각 300ml의 액체 FOX 배지를 함유하는 4개의 1 리터 플라스크를 2ml의 포자현탁액으로 접종하고 30°C, 240rpm에서 배양했다. 배양4일째 되는 날에 배양물을 4장의 멸균 가아제로 여과하고 멸균한 물로 세척했다. 균사체를 왓만(Whatman) 거름종이 위에서 건조시키고 나서 액체질소로 냉동시키고 냉각된 분쇄기에서 미세한 파우더로 분쇄시킨 다음 75ml의 새로운 용해(lysis) 완충용액(10mM Tris-HCl pH 7.4, 1% SDS, 50mM EDTA, 100µl DEPC)을 첨가했다. 완전히 혼합된 현탁액을 65°C 수조에서 1시간 배양하고 나서 벤치-탑 원심분리기에서 10분간 4000rpm, 5°C로 회전시켰다. 상층액을 따라서 EtOH로 침전시켰다. 얼음에서 1 시간후 용액을 20분간 19,000rpm으로 회전시켰다. 상층액을 따라서 이소프로판올로 침전시켰다. 10분간 10,000rpm으로 원심분리한 후, 상층액을 따라서 펠렛(pellet)을 건조시켰다.

각 튜브에 TER 용액(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA 2000 100µg RNase A) 1ml를 첨가하고, 2일 동안 4°C에서 보관했다. 튜브를 모아서 녹지않은 DNA를 현탁시키기 위해 30분간 65°C 수조에 놓았다. 이 용액을 페놀/ CHCl₃/ 이소아밀 알코올로 두번, CHCl₃/ 이소아밀 알코올로 두번 추출하고 그 다음 에탄올로 침전시켰다. 펠렛을 가라앉게 한다음 EtOH을 제거했다. 70% EtOH을 첨가하고 DNA를 -20°C에서 하룻밤 동안 보관했다. 상층액을 따라내고 건조시킨 후에 1ml와 TER을 첨가하고 튜브를 1 시간 동안 65°C에서 배양하여 DNA를 녹였다. 이 제조에 의하여 게놈 DNA 1.5mg을 얻었다.

[Fusarium oxysporum ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 클로닝]

Humicola ~ 43 kD 셀룰라제 PCR (US 4,683,195 및 US 4,683,202에 기술되어 있음)에 대한 Fusarium 상동체를 분리하고 클로닝했다. 그 다음 이 생성물을 서열결정 하고 라이브러리 프로브로 이용하고 PCR 증폭을 위해 프라이머를 제조했다. 이 올리고뉴클레오티드는 cDNA 라이브러리에서 대응되는 클론을 분리하는데 이용되었다.

43 kD 상동체의 부분길이 cDNA 및 게놈 단편을 분리하는데 PCR을 이용하였다. 축퇴(degenerate) 올리고뉴클레오티드(하기의 표 참조)의 7개의 다른 조합이 주형(template)으로서 cDNA 또는 게놈 DNA 와의 PCR 반응에 이용되었다. 단지 하나의 조합만이 Fusarium 43 kd 상동체의 부분적인 클론을 생성했다. 각 올리고뉴클레오티드 쌍에 대해 2가지의 분리된 세트의 PCR 조건을 이용하였다. 첫번째 세트는 매우 적은 양이지만 매우 높은 특이성을 갖는 생성물을 생성하도록 고안되었다. 28 사이클의 이러한 세트에서 다양한 요인이 특이성을 보충했다: 65°C의 어닐링 온도가 이 올리고뉴클레오티드에 대해서 매우 높았다; 어닐링 온도에서의 시간은 단지 30초로 세트되었다; 각 축퇴 프라이머 혼합물의 20pmole을 100µl 반응당 사용하였다.

사용된 올리고뉴클레오티드는 “클로닝 요소” 없이 단지 축퇴 부위만을 포함했다; 1 단위의 Amplitaq™ 중합효소(Perkin-Elmer Cetus)를 100µl 반응당 이용했다; 마지막 10분간의 72°C 배양의 끝에 반응 튜브에 EDTA를 첨가하여 더 낮은 온도에서의 미스매치된 프라이머로 부터 신장되어 PCR 사이클이 진행되지 못하게 했다. 첫번째 세트의 사이클 생성물은 고특이성을 보증하는데 필요한 증폭의 낮은 효율 때문에 아가로스겔 전기영동에서 에티듐 브로마이드(ethidium bromide) 염색에 의해 육안으로 보이는 것이 기대되지 않았다. 그러나, 두번째 세트의 증폭은 첫번째 세트로 부터 생성물을 효율적으로 증폭하도록 고안되었다. 이것을 보증하는 요인은 다음과 같다; 어닐링 온도를 55°C로 낮춘다; 어닐링 시간을 1분으로 길게한다; 올리고뉴클레오티드의 양을 100µl 반응당 각 혼합물을 100pmole까지 증가시킨다; 축퇴 부분을 갖는 “프라임(Prime)” 클로닝 요소를 함유하는 다른 세트의 올리고뉴클레오티드를 이용한다 (용해 온도를 극적으로 증가시킨다); 100µl 반응당 2.5 단위와 Amplitaq 중합효소를 이용한다.

PCR 반응은 Perkin-Elmer Cetus에 의해 추천된 대로 수행했다.

2개의 DNA 출처인 게놈과 cDNA 각각에 대하여 마스터 혼합물(master mix)을 만들었다. 이것은 1 × PCR 완충액(10mM Tris/HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% 젤라틴, Perkin-Elmer Cetus), 0.2mM 대옥

시뉴클레오티드(Ulti rapure™ dNTP 100mM 용액, Pharmacia), 1 단위의 Amplitaq™ 중합효소(Perkin Elmer Cetus) 및 100µl 반응 혼합물 부피당 0.5µg 게놈 DNA 또는 50ng cDNA로 구성되었다. 여기에 탈이온수가 100µl 반응당 부피가 98µl까지 되게하였다. 표식된 0.5튜브(Eppendorf) 에 각 올리고뉴클레오티드 혼합물(하기의 표 참조) 20pmole (20 pmole/ µl농도중 1µl) 을 첨가하였다.

이것을 0.5ml 튜브에 있는 마스터 혼합물 및 경광유(light mineral oil)와 더불어 75°C의 Perkin-Elmer Cetus 열순환기에 놓았다. 적당한 마스터 혼합물 98µl 및 경광유 55µl를 올리고뉴클레오티드가 있는 각 튜브에 첨가했다. 그 다음 스텝- 사이클 파일로 반응을 개시했다 (변수에 대해서는 하기의 차아트 참조). 마지막 72°C 배양의 끝에 10mM EDTA pH 8.0 용액 50µl를 각 튜브에 첨가하고 72°C에서 5분간 더 배양하였다.

43 kD 상동체 PCR 에 사용된 올리고뉴클레오티드 쌍의 표:

반응 cDNA	게놈의 염기	첫번째 세트에 대한 올리고	두번째 세트 축퇴(degenerate) "프라임" 에 대한 올리고	축퇴(degenerate) 쌍의 기대 크기
1	11	ZC3485 vs ZC3558	ZC3486 vs ZC3559	288
2	12	ZC3485 vs ZC3560	ZC3486 vs ZC3561	510
3	13	ZC3485 vs ZC3264	ZC3486 vs ZC3254	756
4	14	ZC3556 vs ZC3560	ZC3557 vs ZC3561	159
5	15	ZC3556 vs ZC3264	ZC3557 vs ZC3254	405
6	16	ZC3556 vs ZC3465	ZC3557 vs ZC3466	405
7	17	ZC3485 vs ZC3465	ZC3486 vs ZC3466	756

주: 올리고뉴클레오티드 서열에 대해서는 올리고뉴클레오티드

PCR 스텝-사이클 파일에 대한 조건은 다음과 같다:

세트 1:		세트 2:	
94°C	1분	94°C	1분
28 × 65°C	30 초	28 × 55°C	1분
72°C	2분	72°C	2분
72°C	10 분	72°C	10 분

첫번째 세트의 PCR 사이클 다음에는, DNA를 두번째 세트의 사이클에 사용하기 위하여 이소프로판올 침전에 의해 반응 혼합물에서 정제했다. 샘플을 새로 표식된 튜브로 옮기기 전에 대부분의 경광유를 각 샘플의 위로 부터 제거하였다. 각 튜브를 똑같은 부피의 PCI (49% 페놀: 49% 클로로포름: 2% 이소아밀 알코올) 로 추출하고 나서 똑같은 부피의 클로로포름으로 추출했다. 그 다음 다음과 같은 것을 첨가하여 반응물에서 DNA를 침전시켰다: 75 μ l 7.5M 아세트산 암모늄, 1 μ l 글리코겐 및 226 μ l 이소프로필 알코올.

펠렛을 20 μ l 탈이온수에 재현탁시켰다. 각 재현탁액 2 μ l를 각 새로운 프라이머 혼합물(상기의 표 참조) 100pmole (20pmole/ μ l농도중 5 μ l)과 더불어 두번째의 PCR 증폭을 위해 표식된 튜브 속에 놓았다. 마스터 혼합물은 알레게놈 주형(Alegenomic template) 및 cDNA 주형을 제외하고 반응 튜브내의 증가된 올리고뉴클레오티드와 DNA 부피를 첨가하는 물의 부피를 감소시켜서 보상하는 것을 제외하고는 상기와 같이 만들어졌다. 반응 및 사이클은 상기에서 기술한 대로 수행하였다 (상기의 표 참조).

28 사이클이 완결된 후에, 샘플의 위로 부터 경광유를 제거했고 PCR 혼합물이 새 튜브로 제거되었다. 각 샘플 10 μ l를 파라필름위에 스포팅하고 대략 5분간 45°C에서 배양하여 샘플의 부피가 줄어들게 하고 파라필름이 남아 있는 경광유를 흡수하도록 했다. 그 다음 드롭을 2 μ l 6 × 로딩염료(loading dye)와 섞고 1% 아가로스(Seakem GTG™, FMC, Rockland, ME) 겔에서 전기영동하였다. 대략 550 염기쌍인 단일 밴드가 주형이 cDNA인 반응번호 2에서 발견되었다. 주형이 게놈 DNA인 반응번호 12에서 대략 620 염기쌍의 밴드가 발견되었다. 이 반응은 올리고뉴클레오티드 ZC 3486 및 ZC 3561로 프라임되었다 (표 1). 이것은 Humicola 43 kD 서열과의 비교로 부터 예상되는 510 염기쌍의 PCR 생성물에 매우 가깝다. 게놈 주형과의 반응에서 더 큰 생성물의 합성은 이 부위내에 있는 인트론의 존재 때문이다.

이 2개의 밴드를 함유하는 아가로스를 절단하여 Prep-A-Gene™ 키트(BioRad)를 이용 하여 DNA를 추출했다. DNA를 50 μ l 탈이온수로 용출시키고 5 μ l 3M 아세트산나트륨, 1 μ l 글리코겐 및 140 μ l 에탄올로 침전시켰다. DNA 펠렛을 건조시켜서 7 μ l TE(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA)에 재현탁시켰다. PCR 단편은 pBS sk- 벡터로 클로닝하였는데, 이 벡터는 먼저 pBluescript II sk-(Stratagene, La Jolla, CA)를 EcoRI로 분해하고 이것을 Pre-A-Gene™ 키트(BioRad)를 가지고 0.8% 시플라크(seaplaque) GTG™ 아가로스(FMC)로 부터 겔 정제 절단 플라스미드로 제조하였다.

올리고뉴클레오티드 ZC 1773 및 ZC 1774 (표 1)는 각 올리고뉴클레오티드 2 pmole을 혼합하고, 반응부피를 탈이온수로 4 μ l가 되게한 후 0.5 μ l어닐링 완충액 (200mM Tris-HCl pH 7.6, 50mM MgCl₂) 을 첨가하고, Perkin-Elmer Cetus PCR 열순환기에서 온도를 30초 동안 65°C까지 되게 하고 20분간 천천히 20°C로 냉각시켜서 어닐링시켰다.

그 다음에는 올리고뉴클레오티드를 EcoRI 분해된 pBluescript 벡터에 결합시켰다. 그 방법은 5.5 μ l 탈이온수, 2 μ l 어닐링된 올리고뉴클레오티드, 분해된 벡터를 탈이온수로 1:3 희석한 1 μ l, 1 μ l 10 × T4 DNA 리가제 완충액(Boehringer-Mannh-eim Biochemicals, Indianapolis IN) 및 0.5 μ l T4 DNA 리가제(Gibco-BRL)을 혼합하고, 이 혼합물을 2.5 시간 16°C에서 배양하였다. 그 다음 결합 혼합물의 부피가 탈이온수로 100 μ l까지 되게 하고 PCI 및 클로로포름으로 추출했다. 일렉트로 포레이션(electroporation) 효율을 증가시키기 위해서, DNA 를 50 μ l 아세트산암모늄, 1 μ l글리코겐 및 151 μ l 이소프로판올로 침전 시켰다. 탈이온수 재현탁액 10 μ l중 1 μ l를 Bio-Rad 일렉트로포레이션 장치로 E. coli DH 10-B 일렉트로맥스(electromax) 세포(Gibco-BRL) 로 일렉트로포레이션시켰다. 일렉트로포레이션 다음에는 바로 큐벳에 2XYT(리터당 16g, 트립톤, 10g 효모추출물, 10g NaCl) 육즙 1ml을 첨가하고 혼합하였다. 다양한 희석물을 100 μ l / ml 암피실린을 함유하고 디메틸포름아미드내의 20mg/ ml X-Gal (5- 브로모-4-클로로-3- 인돌린-b-D- 갈락트로피라노시드; Sigma, St. Louis, MO) 100 μ l와 1M IPTG (Sigma) 20 μ l로 덮여 있는 100mm LB 플레이트(리터당 10g 트립톤, 8g 효모추출물, 5g NaCl, 14.5g 한천)위에 접종했다. 하룻밤 동안의 성장후에 다양한 청색 및 백색 콜로니를 올리고뉴클레오티드 ZC 3424 (bluescript 역 프라이머) 및 ZC 3425 (T7 프로모터 프라이머)(표 1)를 이용하여 세균을 스크리닝하기 위한 상기에서 개관된 조건에 따라 작은 삽입체에 대하여 PCR로 분석했다. 초기의 94°C에서의 1 분 45초간 변성(denaturation) 후, 45초 동안 94°C, 30초 동안 40°C 및 1분 동안 72°C의 30번의 사이클을 수행하였다. PCR 생성물의 아가로스 겔 전기영동에서, pBluescript 클로닝 부위에 있는 작은 삽입체와 일치하는 PCR 밴드를 나타내는 1개의 청색 콜로니를 DNA 정제를 위해 선택하고, 150 μ g/ml 암피실린이 함유된 100ml와 TB 액체 배양물(리터당 12g 트립톤, 24g 효모추출물, 4ml 글리세롤, 이것을 멸균한 다음 0.17M KH₂PO₄, 0.72M K₂HPO₄ 100 ml을 첨가; Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd Ed., 1989, A. 2)에서 하룻밤 동안 성장하게 했다. DNA는 알칼리 용해와 PEG 침전에 의하여 분리되었다 (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd ed., 1.38-1.41, 1989). 서열분석은 pBluescript 벡터에 존재하는 β -갈락토시다제 유전자로 프로모터와 인- 프레임 (in frame)으로 유지하는 동안 정확한 올리고뉴클레오티드가 삽입된다는 것을 보였다. DNA

제조물 50 μ g 을 EcoRI로 분해하고, PCI 및 클로로포름으로 추출하고 아세트산나트륨 및 에탄올로 침전시켰다. DNA 펠렛을 50 μ l 탈이온수에 재현탁시켰다. 분해된 pBS sk⁻를 1mg/ml 벡터 DNA 20 μ l에 40 μ l 10 × T4 DNA 종합효소 완충액 (0.33M Tris/아세트산 pH 8.0, 0.66M 아세트산 칼륨, 0.1M 아세트산마그네슘, 5mM 디티오테티올, 5mM BSA(New England Biolabs), 260 μ l 탈이온수, 40 μ l 1mM dTTP (UltrapureTM, pharmacia) 및 40 μ l T4 DNA 종합효소(1U/ μ l)(Gibco-BRL)를 첨가함으로써 T4 DNA 종합효소(Gibco-BRL)로 다시 절단하였다. 이 혼합물을 15분 동안 12°C에서 배양하고, 그 다음 10분 동안 75°C에서 배양했다. 결합반응에 이용할 DNA를 제조하기 위해, 그것을 PCI 및 클로로포름으로 추출하고 아세트산나트륨 및 에탄올로 침전시켰다. 펠렛을 200 μ l 탈이온수에 재현탁시켜서 0.1 μ g/ μ l 농도를 얻었다.

pBS sk⁻ 축소 벡터 속에 삽입하기 위한 43 kd 상동체 PCR 생성물을 제조하기 위해서, 그것들을 dTTP 대신에 dATP를 포함한 10 μ l의 반응부피에서 T4 DNA 종합효소(Gibco-BRL)로 축소시켰다. 결과적으로 생긴 DNA 용액을 PCI 및 클로로포름으로 추출하고 아세트산나트륨, 글리코겐 및 에탄올로 침전시켰다. DNA 펠렛을 15 μ l 탈이온수에 재현탁시켰다. DNA 샘플 7.5 μ l를 1 μ l 10 × 리가제 완충액(Boehringer-Mannheim) 과 0.5 μ l의 T4 DNA 리가제(Boehringer-Mannheim)로 0.1 μ l pBS sk⁻ 축소벡터(0.1 μ g/ μ l)속에 결합시켰다. 그 다음 결합 혼합물의 부피를 탈이온수로 150 μ l까지 만든 다음 PCI 및 클로로포름으로 추출했다. 일렉트로 포레이션 효율을 증가시키기 위해 DNA 를 15 μ l 아세트산나트륨, 1 μ l 글리코겐 및 166 μ l 이소프로판올로 침전시켰다. 10 μ l 탈이온수 재현탁액중 1 μ l를 Bio-Rad 일렉트로포레이션장치를 이용하여 E. coli DH 10-B 일렉트로맥스 세포(BRL) 속에 일렉트로포레이션시켰다. 일렉트로포레이션 다음 즉시, 1ml의 SOB 육즙(리터당 20g 트립톤, 5g 효모추출물, 10ml 1M NaCl, 2.5ml 1M KCl, 멸균후 10ml 1M MgCl₂ 및 10ml 1M MgSO₄를 첨가했다)을 큐벳에 첨가하고, 세포 혼합물을 100mm 튜브로 옮긴다음 37°C에서 1시간 동안 통기하면서 배양했다. 다양한 희석물을 100 μ g/ml 암피실린을 함유하고 디메틸포름아미드내의 20m/ ml X-Gal (Sigma) 100 μ l와 1M IPTG (Sigma) 20 μ l로 덮여 있는 100mm LB 플레이트에 접종하였다.

2가지의 형질전환 즉 cDNA와 게놈의 각각 3개의 백색 콜로니를 서열결정을 위해 선택했다. 서열분석은 삽입체가 Humicola 43 kD 셀룰라제에 매우 유사하다는 것을 보였다. 게놈 삽입체는 인트론의 존재를 제외하고는 cDNA와 동일하였다. 라이브러리 프로브 및 PCR 프라이머로서 이용하기 위해 그 서열로부터 2개의 42-mer 올리고 뉴클레오티드 ZC3709 와 ZC3710(표 1)을 고안했다. 올리고 뉴클레오티드는 PCR 생성물의 반대쪽 끝으로부터 DNA의 반대쪽 사슬을 혼성화 하도록 고안되었다. 그리하여 그것들은 라이브러리 스크리닝에서 잠재적인 클론을 검사하기 위한 PCR 반응의 프라이머로서 이용될수 있다.

[Fusarium Oxysporum cDNA 라이브러리의 제조]

Fusarium Oxysporum을 발효에 의해 성장시켜서 RNA 추출 및 셀룰라제 활성분석을 위해 다양한 시간마다 샘플을 취하였다. 활성분석은 전체 셀룰라제 활성에 대한 분석뿐만 아니라 색깔정화에 대한 분석도 포함했다. 최대의 색깔 정화를 나타내는 Fusarium Oxysporum 샘플의 전체 RNA를 추출하여 이것으로부터 폴리(A)+RNA를 분리했다. Fusarium Oxysporum cDNA 라이브러리를 제조하기 위해서, 첫번째 사슬 cDNA를 2가지의 반응 즉 하나는 방사성 표지된 dATP 존재하에 또다른 하나는 방사성 표지된 dATP 없는 상태에서 합성하였다. 실온에서 다음 시약을 다음 순서로 혼합하여 2.5×반응혼합물을 제조하였다: 10 μ l의 5×역전사효소 완충액(Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland) 2.5 μ l 20mM 디티오 트레itol(새로 만들거나 또는 -70°C에서 보관한 스톡(stock)용액으로부터 만든것), 그리고 각 데옥시뉴클레오티드 3인산(Pharmacia LKB Biotechnology, Alameda, CA에서 구입한 dATP, dGTP, dTTP 및 5- 메틸 dCTP)10mM 를 함유하는 혼합물 2.5 μ l.

반응혼합물을 2개의 튜브 각각에 7.5 μ l씩 나누었다. 한 튜브에는 1.3 μ l의 10 μ Ci/ μ l ³²P α -dATP(Amersham, Arlington Heights, IL)를 첨가하고 다른 튜브에는 1.3 μ l의 물을 첨가했다. 각 혼합물 7 μ l를 마지막 반응튜브로 옮겼다. 하나의 별개의 튜브에는 14 μ l의 5mM Tris-HCl pH7.4, 50 μ M EDTA에 있는 5 μ g의 Fusarium Oxysporum 폴리(A)+ RNA를 2 μ l의 1 μ g/ μ l 첫번째 사슬 프라이머(ZC 2938 GACAGAGCACAGAATTCAGTAGTGAGCTCT₁₅)와 혼합하였다. RNA-프라이머 혼합물을 4분간 65°C에서 가열하고 얼음물에서 냉각시켰다. 그리고 마이크로 퓨지에서 간단히 원심분리했다. 마지막 반응 튜브에 RNA- 프라이머 혼합물 8 μ l를 첨가하였다. 각 튜브에 200 U/ μ l SuperscriptTM 역전사효소(Gibco-BRL) 5 μ l를 첨가하였다. 약하게 교반한후에 튜브를 30 분간 45°C에서 배양했다. 각 튜브에 10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA를 80 μ l를 첨가하고, 샘플을 강하게 교반한뒤 간단히 원심분리하였다. 각 튜브에서 3 μ l를 제거하여 TCA 침전에 의해 결합된 카운트와 반응의 전체 카운트를 결정했다. 각 튜브에서 2 μ l 샘플을 겔전기영동으로 분석했다. 각 샘플의 나머지는 곰의 글리코겐 존재하에서 에탄올 침전시켰다. 원심분리에 의해 핵산을 펠렛화시키고 펠렛을 80% 에탄올로 세척했다. 에탄올 세척후 샘플을 10 분간 공기중에서 건조시켰다. 첫번째 사슬 합성에 의해 Fusarium Oxysporum cDNA 를 1.6 μ g을 얻었는데 이것은 폴리(A)+ RNA의 33%가 DNA로 전환된 것이다.

두번째 사슬 cDNA 합성은 두번째 사슬합성의 첫번째 사슬프라이머(priming)에 의해 헤어핀(hairpin)DNA로 되는 조건하에서 첫번째 사슬반응의 RNA-DNA 하이브리드에서 행해졌다. 2가지의 첫번째 사슬반응의 각각으로부터 첫번째 사슬 생성물을 71 μ l의 물에 재현탁시켰다. 반응튜브에 실온에서 다음 시약을 첨가하였다: 20 μ l의 5×두번째 사슬 완충용액(100mM Tris pH 7.4, 450 mM KCl, 23mM MgCl₂ 및 50mM(NH₄)₂SO₄), 3 μ l의 5mM β -NAD, 및 각각 10mM인 데옥시 뉴클레오티드 3인산 혼합물 1 μ l.

첫번째 사슬 합성시 표식되지 않은 dATP를 첨가한 반응혼합물에는 1 μ l의 α -³²P dATP를 첨가하고, 첫번째 사슬 합성시 표식된 dATP를 첨가한 튜브에는 1 μ l의 물을 첨가하였다. 그 다음 각 튜브에 0.6 μ l의 7U/ μ l E. coli DNA 리가제 Boehringer- Mannheim, Indianapolis, IN), 3.1 μ l의 8U/ μ l E. coli DNA 종합효소 I (Amersham), 및 1 μ l의 2U/ μ l RNase H(Gibco-BRL)를 첨가하였다. 반응물을 2시간동안 16°C에서 배양하였다. 반응후에 반응의 TCA 침전가능한 카운트와 전체 카운트를 결정하기 위해 각 반응물의 2 μ l를 이용했

고 각 반응물의 2 μ 를 겔전기영동에 의하여 분석했다. 각 샘플의 나머지에 2 μ 의 2.5 μ g/ μ l의 글리코겐, 5 μ l의 0.5 EDTA, 200 μ l의 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA를 첨가했다. 샘플을 페놀-클로로포름 추출하고 이소프로판올 침전시켰다. 원심분리후에 펠렛을 100 μ l의 80% 에탄올로 세척하고 공기건조시켰다. 반응 각각에서 이중사슬 cDNA의 수율은 대략 2.5 μ g이었다.

헤어-핀의 단일사슬 DNA의 끝을 절단하는데 녹두의 뉴클레아제 처리를 이용하였다. 각 cDNA 펠렛을 15 μ l의 물에 재현탁시키고 각 튜브에 2.5 μ l의 10 × 녹두완충액 (0.3 M NaAc pH 4.6, 3M NaCl, 및 10mM ZnSO₄), 2.5 μ l의 10mM DTT, 2.5 μ l의 50% 글리세롤, 및 2.5 μ l의 10U/ μ l 녹두 뉴클레아제(New England Biolab, Beverly, MA)를 첨가하였다. 반응물을 30 분간 30°C에서 배양하고 각 튜브에 75 μ l의 10mM Tris-HCl pH 7.4 및 1mM EDTA를 첨가했다. 2 μ l의 분취량을 알칼리 아가로스겔 분석에 의해 분석했다. 100 μ l의 1M Tris-HCl(pH7.4)을 각 튜브에 첨가하고 샘플을 두번 페놀-클로로포름 추출하였다. DNA를 이소프로판올 침전시키고 원심분리에 의해 펠렛화시켰다. 원심분리후에 DNA 펠렛을 80% 에탄올로 세척하고 공기건조시켰다. 두 반응의 각각으로부터 DNA 수율은 대략 2 μ g 였다.

T4 DNA 중합효소로 처리하여 cDNA 말단을 평체말단화시켰다. 전체부피 24 μ l의 물에 재현탁시킨후에 두 샘플의 DNA를 모았다. 그 DNA에 4 μ l의 10 × T4 완충액(330mM Tris-아세트산 pH 7.9, 670mM KAc, 100mM MgAc, 1mg/ml 젤라틴), 4 μ l의 1mM dNTP, 4 μ l의 50mM DTT, 4 μ l의 1U/ μ l T4 DNA 중합효소(Boehringer-Mannheim)를 첨가하였다. 샘플을 1시간 15°C에서 배양했다. 배양후 160 μ l의 10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA를 첨가했다. 그리고 샘플을 페놀-클로로포름 추출하였다. DNA를 이소프로판올 침전시키고 원심분리로 펠렛화시켰다. 원심분리후에 DNA를 80% 에탄올로 세척하고 공기건조시켰다.

DNA를 6.5 μ l 물에 재현탁시킨후 EcoRI 어댑터(adapter)를 평체말단 DNA에 첨가했다. DNA에 1 μ l의 1 μ g/ μ l EcoRI 어댑터(Invitrogen, San Diego, CA Cat. # N409-20), 1 μ l의 10 × 리가제 완충액(0.5M Tris pH7.8 및 50mM MgCl₂), 0.5 μ l의 10mM ATP, 0.5 μ l의 100mM DTT 및 1 μ l의 1U/ μ l T4 DNA 리가제(Boehringer-Mannheim)를 첨가하였다. 샘플을 하룻밤동안 실온에서 배양한 후에 리가제를 15분동안 65°C에서 열변성시켰다.

첫번째 사슬 프라이머에 의해 암호화된 Sst I 클로닝부위가 Sst I 엔도뉴클레아제로 분해시켜 드러내어졌다. 33 μ l의 물, 5 μ l의 10 × Sst I 완충액(0.5M Tris pH 8.0, 0.1M MgCl₂ 및 0.5 M NaCl), 2 μ l의 5U/ μ l Sst I 을 DNA에 첨가하고, 샘플을 2시간 동안 37°C에서 배양했다.

150 μ l의 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA를 첨가하고 샘플을 페놀-클로로포름 추출한후 DNA를 이소프로판올 침전시켰다.

cDNA를 크기에 의해 선택하고 유리된 어댑터를 제거하기 위해서 cDNA를 세파로스 CL 2B(Pharmacia LKB Biotechnology)컬럼상에서 크로마토그래피하였다. 세파로스 CL 2B 컬럼 1.1ml을 1ml의 플라스틱 일회용 피펫속에 붓고 컬럼을 50 컬럼 부피의 완충액(10mM Tris pH 7.4 및 1mM EDTA)으로 세척하였다. 샘플을 로딩하고 한방울씩 분획을 모아서 공극 부피(void volume)에 있는 DNA를 모았다. 분획화된 DNA를 이소프로판올 침전시켰다. 원심분리후 DNA를 80% 에탄올로 세척하고 공기건조시켰다.

Fusarium Oxysporum cDNA 라이브러리는 cDNA를 EcoRI과 Sst I으로 분해된 벡터 pYcDE8' (WO 90/10698 참조)에 결합시켜서 만들어졌다. 벡터 390ng을 8 μ l의 10 × 리가제 완충액, 4 μ l의 10mM ATP, 4 μ l의 200mM DTT, 1 단위의 T4 DNA 리가제(Boehringer-Mannheim)를 함유하는 80 μ l의 결합반응물에서 400ng의 cDNA와 결합시켰다. 실온에서 하룻밤동안 배양한 후에 5 μ g의 굴글리코겐, 120 μ l의 10mM Tris-HCl 및 1mM EDTA를 첨가하고 샘플을 페놀-클로로포름 추출했다. DNA를 에탄올 침전시키고, 원심분리하고나서 DNA 펠렛을 80% 에탄올로 세척했다. 공기 건조시킨후에 DNA를 3 μ l의 물에 재현탁시켰다. 37 μ l의 일렉트로포레이션에 적절한 DH10B 세포(Gibco-BRL)를 DNA에 첨가하고, Bio-Rad Gene Pulser(Model # 1652076) 및 Bio Rad Pulse Controller(Model # 1652098)일렉트로포레이션 유니트(Bio Rad Laboratories, Richmond, CA)로 일렉트로포레이션을 수행했다. 4ml의 SOC(Hanahan, J. Mol. Biol. 166 (1983), 557-580)를 일렉트로포레이션된 세포에 첨가하고, 400 μ l의 세포 현탁액을 10개의 150mm LB 암피실린 플레이트의 각각에 퍼지게 했다. 하룻밤동안 배양한 후에 각 플레이트에 LB amp 배지 10ml을 첨가하고 세포를 배지속으로 들어가게 했다. 각 플레이트로부터 글리세롤 스톱과 플라스미드 제조물을 만들었다. 삼입체없이 벡터를 결합시키고 일렉트로포레이션후 클론의 수를 측정함으로써 라이브러리의 백그라운드(삼입체 없는 벡터)가 대략 1%가 되도록 하였다.

43kD 상동체의 전길이 cDNA 클론을 분리하기 위해 1,100,000클론의 라이브러리를 100 μ g/ml 암피실린을 함유한 150mm LB 플레이트에 접종하였다. 100,000 클론을 글리세롤 스톱으로부터 10 개의 플레이트에 각각 접종했고 20,000 클론을 5개의 플레이트 각각에 접종하였다. 상기와 같이 복제품에서 리프트(Lift)가 취해졌다. 또한 전- 혼성화, 혼성화 및 세척을 상기와 같이 수행하였다. 혼성화에서는 2개의 말단 표식된 42-mer 올리고뉴클레오티드인 ZC3709 와 ZC3710(43kD 상동체에 대해 특이적이다)을 이용하였다. 필터를 77°C에서 TMAcL로 20 분간 한번 세척했다. 복제 필터에서 22개의 반점이 나타나는 것이 발견되었다. 플레이트 위의 대응부위를 피펫의 큰 끝으로 1ml의 1×PCR 완충액속에 집어넣었다. 각 추출물에 대해 2 세트의 올리고뉴클레오티드를 가지고 PCR 분석을 하였다. 한 세트는 혼성화 프로브로서 이용된 2개의 43kD 특이적 올리고뉴클레오티드를 포함했고 다른 세트는 하나의 43kD 특이적 올리고뉴클레오티드 ZC3709 와 하나의 벡터 특이적 올리고뉴클레오티드 ZC3634를 포함했다. PCR은 Perkin Elmer Cetus지시에 의해 전처럼 수행되었다. 50 μ l의 각 반응에서 20pmole의 각 프라이머와 5 μ l의 세포현탁액을 이용했다. 처음 1분 30 초간 94°C에서의 변성후에 94°C에서 1분 및 72°C에서 2분의 30 사이클을 수행하고, 마지막 72°C에서 연장시간 10 분간 수행하였다. 그 결과는 22 개중 17 개가 2개의 43kD 특이적 올리고뉴클레오티드 인식부위를 포함한다는 것을 보여주었다. 남아있는 5개의 클론은 그 부위중 하나인 ZC3709를 포함했다. 이것은 벡터 특이적 프라이머와의 PCR에 의하여 절두형이고 다른 부위를 포함할 만큼 충분히 길지 않다는 것을 알게되었다. 또다른 수준의 스크리닝을 통한 단일 콜로니 분리를 위해 9개의 가장 긴 클론을 선택하였다.

각각의 다섯 10배 희석물을 첫번째 세트의 리프트에 대해 상기에서 기술한 것처럼 접종하고 진행하였다. 9개 모두 이차 수준의 스크리닝의 방사능사진에서 시그널을 나타냈다. 콜로니가 너무 밀집되어 방사성 시그널 위치에 있는 몇개의 별개의 콜로니는 70 µg/ml 암피실린을 함유한 150mm LB플레이트에서 단일 콜로니로 분리되었다. 이것을 ~43kD 엔도글루칸아제의 상동체에 대해서 올리고뉴클레오티드 ZC3709 및 ZC3710으로, 콜로니를 이차시개로 마스터 혼합물 25µl에 피킹하는 것을 제외하고는 일차 수준의 스크리닝에 대해 기술한 것처럼 PCR 하여 검사했다. 9개중 7개의 클론에 대해서 기대되는 크기의 밴드를 얻었다. 150µg/ml 암피실린을 함유하는 테리픽 브로스(Terrific Broth) 20ml에서 이것의 배양을 시작했다.

상기와 같이 알칼리 용해 및 PEG 침전에 의하여 DNA를 추출했다.

[DNA 서열분석]

cDNA는 효모의 발현 벡터 pYCD8' 에서 서열결정하였다. 모든 서열결정반응에서 New England Nuclear의 @35-S dATP(M.D. Biggin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1983, pp. 3963-3965참조)를 이용하는 디데옥시 사슬종결 방법(F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1977, pp. 5463-5467)을 이용하였다. 이 반응은 Pharmacia의 변형된 T7 DNA 중합효소에 의해 촉매되었다(S. Tabor 및 C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1987, pp. 4767-4771 참조). 그리고 ADH1 프로모터(ZC996: ATT GTT CTC GTT CCC TTT CTT)에 상보적인 올리고뉴클레오티드로, CYC1 터미네이터(ZC3635: TGT ACG CAT GTA ACA TTA)에 상보적인 올리고뉴클레오티드로 또는 관심있는 DNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드로 프라임하였다. 서열 결정 올리고뉴클레오티드와 혼성화시키기전에 이중사슬주형을 NaOH로 변성시켰다(E.Y. Chen 및 P.H. Seeburg, DNA 4, 1985, pp. 165-170). 올리고뉴클레오티드는 Applied Biosystems Model 380A DNA 합성기에서 합성되었다. 서열결정반응에 사용된 올리고뉴클레오티드는 하기의 서열결정 올리고뉴클레오티드 표에 기술되어 있다.

[표 1]

43kD 상동체 PCR에 대한 올리고뉴클레오티드:	
ZC3485	TGG GA(C/T) TG(C/T) TG(C/T) AA(A/G) CC
ZC3486	AGG GAG ACC GGA ATT CTG GGA (C/T)TG (C/T)TG (C/T) AA(A/G) CC
ZC3556	CC(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GT(A/C/G/T) GG
ZC3557	AGG GAG ACC GGA ATT CCC (A/C/G/T)GG (A/C/G/T)GG (A/C/G/T)GG (A/C/G/T)GT (A/C/G/T)GG
ZC3558	AC(A/C/G/T) A(C/T)C AT(A/C/G/T) (G/T)T/C/T) TT(A/C/G/T) CC
ZC3559	GAC AGA GCA CAG AAT TCA C(A/C/G/T)A (C/T)CA T(A/C/G/T) (G/T) T(C/T)T T(A/C/G/T)C C
ZC3560	(A/C/G/T)GG (A/G)TT (A/G)TC (A/C/G/T)GC (A/C/G/T) (G/T) (C/T) (C/T)T(C/T) (A/G)AA CCA
ZC3561	GAC AGA GCA CAG AAT TC(A/C/G/T) GG(A/G) TT(A/G) TC(A/C/G/T) GC(A/C/G/T) (G/T) (C/T) (C/T) T(C/T) (A/G) AAC CA

43kD 상동체 클로닝에 대한 올리고뉴클레오티드:

.ZC3709 GGG GTA GCT ATC ACA TTC GCT TCG GGA GGA GAT ACC GCC GTA
 ZC3710 CTT CTT GCT CTT GGA GCG GAA AGG CTG CTG TCA ACG CCC CTG

pYCD8' 벡터 올리고뉴클레오티드:

ZC3635 TGT ACG CAT GTA ACA TTA CYC 1 터미네이터
 ZC3634 CTG CAC AAT ATT TCA AGC ADH 1 프로모터

43kD 상동체 특이적 서열결정 프라이머:

ZC3709 GGG GTA GCT ATC ACA TTC GCT TCG GGA GGA GAT ACC GCC GTA
 ZC3710 CTT CTT GCT CTT GGA GCG GAA AGG CTG CTG TCA ACG CCC CTG
 ZC3870 AGC TTC TCA AGG ACG GTT
 ZC3881 AAC AAG GGT CGA ACA CTT
 ZC3882 CCA GAA GAC CAA GGA TT

[실시예 4]

[색깔 정화검사]

Humicola ~43kD 엔도글루칸아제(30 번의 정제단계의 혼합물)를 US 4,435,307, 실시예 6에 기술된 H. insolens 셀룰라제 제조물과 색깔정화검사에서 비교하였다.

오래되고 낡은 흑색의 면직물 견본을 검사물질로 사용하였다. 정화 검사는 3번의 반복되는 세척을 하면서 Terg-0-tometer 에서 행해졌다. 각 세척사이에 견본을 하룻밤동안 건조시켰다.

[조건:]

30분동안 40°C에서 액체 세정제 2g/ℓ. 물의 세기 9° dH. 견본크기는 10 × 15cm, 각 비이커속에는 2개의 견본 존재.

세정제의 조성은 다음과 같다:

10% 음이온성 계면활성제(Nansa 1169/p)

15% 비- 이온성 계면활성제(Berol 160)

10% 에탄올

5% 트리에탈올아민

60% 물

pH는 HCl로 8.0으로 조정하였다.

[투여량:]

두 효소를 63 CMC-엔도아제 단위/ℓ 와 125 CMC- 엔도아제 단위/ℓ 로 투여하였다.

[결과:]

그 견본을 1포인트부터 7포인트까지 스케일로 등급을 매긴 22 명의 사람들의 패널에 의하여 결과를 평가했다. 스코어가 더 높으면 높을수록 색깔 정화가 더욱 많이 얻어졌다.

효소	CMC-엔도아제/ ℓ	단백질 mg/ℓ	PSU
효소없음			1.4 ± 1.0
H. insolens	63	14	5.8 ± 1.0
셀룰라제	125	28	6.1 ± 1.0
혼합물			
본발명	63	0.4	4.6 ± 0.9
	125	0.8	6.2 ± 0.8

* PSU = 패널 스코어단위

~43 kD 엔도글루칸아제는 공지기술인 H. insolens 셀룰라제 혼합물보다 약30배 더 잘 수행하였고, WO 89/09259에 따른 셀룰라제 제조물보다 약 6배 더 잘 수행하였다.

[실시예 5]

[프로테아제 존재하의 Humicola ~43kD 엔도글루칸아제의 안정성]

다른 프로테아제 존재하에서 ~43 kD 엔도글루칸아제의 액체 세정제에서의 저장 안정성을 다음 조건하에서 결정하였다:

[효소]

본발명의 ~43 kD 엔도글루칸아제

Glu/Asp 특이적 B. licheniformis 세린 프로테아제

트립신- 같은 Fusarium sp.DSM 2672 프로테아제

B. lentos 세린 프로테아제

Subtilisin Novo

[세정제]

어떤 유백제, 향료 또는 효소를 함유하지 않은(실험에서 첨가된 것은 별도로 함) US 상업적인 액체 세정제, 효소안정화제로서 +/- 1% (w/w) 봉산.

[투여량]

엔도글루칸아제: 12 CMCU/ 세정제의 g

프로테아제: 0.2 mg/세정제의 g

[배양]

35°C에서 7일간

[잔류활성]

각각의 프로테아제와 7일간 배양한후 엔도글루칸아제의 잔류 활성을 그것의 CMC 아제 활성(CMCU)에 의해 결정하였다. CMC 아제 활성은 다음과 같이 결정되었다:

탈이온수내의 30g/l CMC(Hercules 7 LFD)기질용액을 제조하였다. 결정할 효소샘플을 pH 7.5 0.01M 인산완충액에 녹이고, 1.0ml의 효소용액과 2.0ml의 0.1M 인산완충액(pH 7.5)을 시험관에서 혼합하였다. 그리고 시험관에 기질 용액 1.0ml을 첨가하여 효소반응을 시작했다. 혼합물을 40°C에서 20분동안 배양한후에 2.0ml의 0.125M 트리소듐 포스페이트 · 12H₂O 를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 블라인드 샘플은 배양없이 제조하였다.

2.0ml의 페리시아니드용액(1 l의 탈이온수내의 칼륨 페리시아니드 1.60g및 트리소듐 포스페이트 · 12H₂O 14.0g)을 테스트 샘플뿐만아니라 블라인드 샘플에도 첨가하고 곧바로 끓는 물에 넣어서 10분간 배양했다. 배양후 샘플을 수도물로 냉각시켰다. 420nm에서 흡광도를 측정했고 포도당 용액으로 표준곡선을 구했다. 1 CMC 아제 단위(CMCU)는 상기의 조건하에서 분당 포도당 1 μmol에 해당하는 환원 탄수화물의 양을 형성하는 효소의 양으로 정의된다.

[결과]

본발명의 엔도글루칸아제의 저장 안정성은 상기의 조건하에서 그것의 잔류활성(CMCU%) 으로서 결정되었다.

프로테아제	잔류활성(%)	
	+ 봉산	- 봉산
Glu/Asp 특이적	105	93
트립신- 같은	77	63
B. <u>lentus</u> 세린	57	24
Subtilisin Novo	63	55

이 결과는 본발명의 엔도글루칸아제의 액체세정제에서의 저장 안정성이 사비나제(Savinase)보다 더 높은 정도의 특이성을 갖는 프로테아제가 세정제 조성물속에 포함될때 개선된다는 것을 나타낸다.

[실시예 6]

[데님 직물의 부분적인 색깔 변화를 제공하기 위한 Humicola ~43kD 엔도글루칸아제의 이용]

데님 지인(Denim jean)을 “스톤와시”(“stonewashed”)모양에 가깝도록 지인의 표면색깔의 부분적인 변화를 제공할 목적으로 12kg “wascator” FL 120 수세 추출기에서 ~43kD 엔도글루칸아제로 처리하였다.

기계하중(machine load)당 네쌍의 지인을 사용하였다.

실험조건은 다음과 같다.

[발호(Desizing)]

40 l 물

100ml B. amyloliquefaciens 아밀아제*, 120L

70 g KH₂PO₄

30 g Na₂HPO₄

55°C

10분

pH 6.8

* Novo Nordisk A/S 에서 구입가능

발호 공정후 배수를 시켰다.

[마모(Abrasion)]

40 l 물

120g H. insolens 셀룰라제 혼합물 또는

xg ~ 43 kD 엔도글루칸아제

70g KH₂PO₄

30g Na₂HPO₄

55℃

75분

pH 6.6

마모공정후 배수, 행굼, 후-수세 및 행굼을 하였다.

그 결과는 지인의 눈에 보이는 모양을 판단하여 평가했다.

~ 43 kD 엔도글루칸아제의 다른 투여량을 H. insolens 셀룰라제 혼합물 120g 으로 얻어지는 것과 동등한 마모수준을 얻기위해 사용했다. 그러한 동등한 수준은 43kD 엔도글루칸아제 1.0-1.25g으로 얻어졌다. 처리한 의복의 인열강도 측정은 두 효소처리 사이에서 차이점을 보이지 않았다.

[실시예 7]

[직물표면으로부터 면모를 제거하기 위한 Humicola ~ 43 kD 엔도글루칸아제의 사용]

100% 면직물을 새직물에 더높은 정도의 유연성을 제공할수 있는 효소의 능력을 조사할 목적으로 12kg "Wascator" FL120 수세 추출기에서 43kD 엔도글루칸아제로 처리하였다. 실험조건은 다음과 같다.

[직물]

Nordisk Textil에서 구입한 100% 표백한 면직물(NT 2116-b) 또는 표백하지 않은 면직물(NT 2116-ub). 기계하중 당 400g의 직물을 사용했다.

[발호]

40 l 물

200ml B. amyloliquefaciens 아밀라제, 120L

60 g KH₂PO₄

20 g Na₂HPO₄

60℃

10분

pH 6.4

발호 공정후 배수를 시켰다.

[주수세(Main wash)]

40 l 물

0-600ml H. insolens 셀룰라제 혼합물 또는

xg ~ 43 kD 엔도글루칸아제

60g KH₂PO₄

40g Na₂HPO₄

60℃

60분

pH 6.7

마모단계후 배수를 시켰다.

[후수세(Afterwash)]

40 l 물

40g Na₂CO₃

10g Berol 08

80℃

15 분

pH 10.1

후수세후 헹굼을 하였다.

43 kD 엔도글루칸아제의 3가지의 다른 농도를 주수세시 첨가했다.

직물 샘플의 무게상실을 처리 전, 후로 측정하였다.

무게상실은 %로 표현했고 발효된 직물에 관련된다.

직물두께는 두께측정기 L & W, type 22/1에 의해 측정했다. 2개의 직물견본 (10×6cm)을 측정했고, 각 견본에 대해서 μ m로 5번의 측정이 기록되었다. 그 견본은 98.07 KPa의 압력에서 측정하였다. 잔류두께는 발효된 직물과 관련하여 %로 표현되었다.

직물강도는 인열시험기(Elmendorf 09)에 의해 측정되었다. 6개의 견본(10×6 cm)은 날실 방향으로 절단되었고 6개의 견본(10×6cm)은 씨날실 방향으로 절단되었다. 인열강도는 ASTM D 1424에 따라 mN 로 측정되었다. 효소-처리한 직물의 직물강도는 발효된 직물과 관련하여 %로 표현되었다.

직물 강연도는 King Fabric 강연도시험기로 측정하였다. 직물로부터 4개의 견본(10 × 20cm; 날실 방향으로 10cm)을 절단하였다. 그리고 각 견본을 면을 맞대고 접어서(10 × 10cm)가운데에 오픈 링이 있는 테이블에 놓았다. 그램으로 표현되는 힘을 이용해서 피스톤으로 직물이 링을 통과하도록 밀어주었다. 그 측정은 ASTM D 4032 Circular Bend Test Method에 따라 행해졌다. 잔류 직물강연도는 발효된 직물과 관련하여 %로 표현되었다.

다음표는 이 테스트의 결과를 나타낸다:

[표]

효소투여량 EUG/l	무게상실 %	잔류두께 %	잔류강도 %	잔류강연도 %
0	0	100	100	100
13	4.0	95.3	85.4	88.8
50	5.1	94.5	73.3	85.0
150	7.7	91.9	70.7	79.3

[실시에 8]

[종이 펄프 처리를 위한 Humicola ~ 43kD 엔도글루칸아제의 이용]

펄프배수에 대한 효소의 영향을 조사할 목적으로 몇가지 유형의 종이펄프처리에 ~ 43kD 엔도글루칸아제를 이용하였다.

실험조건은 다음과 같다.

[펄프]

1. 휴지혼합물: 33% 신문인쇄용지, 33% 잡지 및 33% 컴퓨터 종지로 구성. 탈잉크 화학품 존재 또는 부재(각기 WPC 또는 WP).
2. 재생 마분지 용기(RCC).
3. 표백한 크라프트지: 소나무로 만들어짐(BK).
4. 표백하지 않은 가공열지: 전나무로 만들어짐(TMP).

[셀룰라제 활성의 결정(CEVU)]

Tris- 완충용액(pH 9.0)에 33.3 g/l CMC (Hercules 7 LFD)를 함유하는 기질용액을 제조했다. 결정할 효소 샘플을 똑같은 완충액에 녹였다. 10ml의 기질용액과 0.5ml의 효소용액을 혼합하고 40°C에서 온도조절된 점성도계(Haake VT 181, NV Sensor, 181rpm)로 옮겼다.

1 셀룰라제 점성도 단위(CEVU)는 Novo Nordisk Analytical Method No. AF 253(Novo Nordisk로부터 구입 가능) 에서 정의되었다.

[펄프 배수의 결정(Schopper-Riegler)]

Schopper-Riegler 수(SR)는 2g/l의 컨시스턴시로 균질의 펄프에서의 ISO 표준 5267 (파트1)에 따라서 결정되었다. 알고 있는 부피의 펄프를 금속체를 통과하여 깔때기속으로 배수되게 했다. 이 깔때기는 축방향 구멍과 측면 구멍이 있게 하였다. 측면구멍을 통해서 지나가는 여과물의 부피를 Schopper-Riegler 단위로 눈금을 매긴 용기로 측정하였다.

[효소처리]

~ 43kD 엔도글루칸아제 제조물을 7 CEVU/ml로 희석하고 상기에서 지정한 펄프의 각각에 첨가했다(50g DS, 컨시스턴시 3%), 효소 투여량은 건조 펄프 kg 당 2400 CEVU 였다. 효소처리는 pH 7.5 및 40°C에서 60 분동안 약하게 교반하면서 수행했다. 30분후에 샘플을 취해서 반응의 진행을 모니터하였다. 60분후에

반응을 종결시키기 위해서 0.5%의 컨시스턴시로 냉각된 물(+ 4℃)로 희석했다.

젖은 펄프의 배수는 상기에서 기술한대로 결정하여 Schopper Riegler(SR) 값을 정했다. 또한 진공하에서 배수시간(DT)을 결정했다.

그 결과를 요약하면 다음표와 같다.

	휴지+ 화학품	
	컨트롤	효소
SR (3%)	61	55
배수시간(s) 150 g/m ²	18.2	17
질량 g/m ²	65.6	66.4
부피 cm ³ /g	1.65	1.66
파괴길이, m	3650	3970
파열지수	2.19	2.47

	휴지	
	컨트롤	효소
SR (3%)	59	51
배수시간(s) 150 g/m ²	18.2	12.7
질량 g/m ²	68.0	67.9
부피 cm ³ /g	1.68	1.64
파괴길이, m	3810	3790
파열지수	2.25	2.33

	재생마분지용기	
	컨트롤	효소
SR (3%)	45	33
배수시간(s) 150 g/m ²	6.8	5.3
질량 g/m ²	70.2	67.3
부피 cm ³ /g	1.91	1.99
파괴길이, m	3640	3530
파열지수	2.25	2.22

	크라프트지	
	컨트롤	효소
SR (3%)	42	31
배수시간(s) 150 g/m ²	10.7	6
질량 g/m ²	67.5	69.1
부피 cm ³ /g	1.44	1.42
파괴길이, m	7010	7190
파열지수	5.14	4.96

	TMP	
	컨트롤	효소
SR (3%)	68	60
배수시간(s) 150 g/m ²	13.8	11.3
질량 g/m ²	68.7	70.2
부피 cm ³ /g	2.13	2.04
파괴길이, m	3630	3620
파열지수	1.95	1.91

표 3: 배수 및 강도측정의 결과

컨트롤실험: 효소처리와 똑같은 조건임

표로부터 ~ 43kD 엔도글루칸아제 처리는 SR 값의 상당한 감소를 야기하고 제지공정에 사용되는 펄프의 배수를 크게 증진시킨다는 것을 알수있다.

종이가 래피드 코텐(Rapid Kothen)장치상에서 다양한 펄프로부터 만들어졌다. 그리고 다른 변수(파괴길이를 포함)에 따라서 강도를 측정했다. 효소작용에 기인한 강도성질의 감소가 관찰되지 않았다.

[서열리스트]

(1) 일반정보:

- (i) 출원인: 노보노르디스크 아크티에 셀스카브 N N
- (ii) 발명의 명칭: 셀룰라제 제조물
- (iii) 서열의 수: 4
- (iv) 통신주소
 - (A) 출원인: 노보노르디스크 아크티에 셀스카브, 특허부
 - (B) 거리: 노보 알레
 - (C) 도시: Bagsvaerd
 - (F) 우편번호: ZIP: DK-2880
- (v) 컴퓨터 해독 형태
 - (A) 미디어형태: 플로피디스크
 - (B) 컴퓨터: IBM PC 호환기종
 - (C) 작동시스템: PC-DOS/MS-DOS
 - (F) 소프트웨어: Patent In Release #1.0, Version #1.25
- (vi) 현재의 출원자료
 - (A) 출원번호:
 - (B) 출원일:

(C) 분류:

(viii) 변리사/ 대리인 정보

(A) 성명: Thalsoe-Madsen, Birgit

(B)

(C)

(ix) 전기통신정보

(A) 전화: +45 4444 8888

(B) 팩스: +45 4449 3256

(C) 텔렉스: 37304

(2) 서열 ID No:10에 대한 정보

(i) 서열특징

(A) 길이: 1060염기쌍

(B) 종류: 핵산

(C) 나선형태: 단일

(D) 형태: 선형

(ii) 분자종류: cDNA

(iii) 가정: 없음

(vi) 본래출처

(A) 생물체: *Humicola insolens*

(B) 균주: DSM 1800

(ix) 특징:

(A) 이름/ 키: mat peptide

(B) 위치: 73..927

(ix) 특징:

(A) 이름/ 키: sig peptide

(B) 위치: 10..72

(ix) 특징:

(A) 이름/ 키: CDS

(B) 위치: 10..927

(xi) 서열기술: SEQ ID NO:1:

GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GGT GTG GCC Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala -21 -20 -15 -10	48
GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr -5 1 5	96
TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val 10 15 20	144
AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp 25 30 35 40	192
TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GST GTC GCC TAC TCG TGC Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys 45 50 55	240
GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GST TTT Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe 60 65 70	288
GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala 75 80 85	336
TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met 90 95 100	384
GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC Val Val Gln Ser Thr Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe 105 110 115 120	432
GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr 125 130 135	480
CCC CAG TTC GGC GST CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GCC ATC TCG TCC Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser 140 145 150	528
CGC AAC GAG TGC GAT CCG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr 155 160 165	576
TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe 170 175 180	624
CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CCG ACC GGA TGC CGC Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg 185 190 195 200	672
CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser 205 210 215	720
ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG TCC ACC Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr 220 225 230	768
TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys 235 240 245	816
ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys 250 255 260	864
ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr 265 270 275 280	912
CAT CAG TGC CTG TAGAAGCAGG GCAGCITGAG GCOCITACTG GTGGCCGCAA His Gln Cys Leu 285	964
CGAARTGACA CTCCCAATCA CTGTATTACT TCTTGTACAT AATTTCGICA TCCCTCCAGG	1024
GATTGTGACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC	1060

(2) 서열 ID NO: 2에 대한 정보

(i) 서열특징:

- (A) 길이: 305 아미노산
- (B) 종류: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자종류: 단백질

(xi) 서열기술: SEQ IN NO:2:

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
 -21 -20 -15 -10
 Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 -5 1 5 10
 Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
 15 20 25
 Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
 30 35 40
 Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
 45 50 55
 Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
 60 65 70 75
 Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
 80 85 90
 Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 95 100 105
 Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 110 115 120
 Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 125 130 135
 Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 140 145 150 155
 Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 160 165 170
 Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
 175 180 185
 Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
 190 195 200
 Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 205 210 215
 Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
 220 225 230 235
 Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
 240 245 250
 Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
 255 260 265
 Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
 270 275 280
 Leu

(2) 서열 ID NO: 3에 대한 정보:

(i) 서열특징:

- (A) 길이: 1473 염기쌍
- (B) 종류: 핵산
- (C) 나선형태: 단일
- (D) 형태: 선형

(ii) 분자종류: cDNA:

(iii) 가정: 없음

(iv) 안티-센스: 없음

(vi) 본래 출처:

- (A) 생물체: Fusarium Oxysporum
- (B) 균 주: DSM 2672

(ix) 특징:

- (A) 이름/ 키: CDS

(B) 위 치: 97.1224

(xi) 서열기술: SEQ ID NO:3:

GAATTGGGG CCGCTCAATC ACITCAITCA TTCTTTAGAA TTACATACAC TCTCITTCAA	60
AACAGTCACT CTTTAAACAA AACAACTTTT GCAACA ATG CGA TCT TAC ACT CTT	114
Met Arg Ser Tyr Thr Leu	1
1 5	
CTC GCC CTG GCC GGC CCT CTC GCC GTG AGT GCT GCT TCT GGA AGC GGT	162
Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly	10 15 20
CAC TCT ACT CGA TAC TGG GAT TGC TGC AAG CCT TCT TGC TCT TGG AGC	210
His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Ser	25 30 35
GGA AAG GCT GCT GTC AAC GCC CCT GCT TTA ACT TGT GAT AAG AAC GAC	258
Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu Thr Cys Asp Lys Asn Asp	40 45 50
AAC CCC ATT TCC AAC ACC AAT GCT GTC AAC GGT TGT GAG GGT GGT GGT	306
Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu Gly Gly Gly	55 60 65 70
TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC AAC GAT GAG	354
Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu	75 80 85
CIT GCC TAC GGT TTC GCT GCT ACC AAG ATC TCC GGT GGC TCC GAG GCC	402
Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala	90 95 100
AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC	450
Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val	105 110 115
AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC	498
Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu	120 125 130
GCC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC	546
Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile	135 140 145 150
TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG	594
Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln	155 160 165
TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT	642
Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu	170 175 180
CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC	690
Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp	185 190 195
AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC	738
Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu	200 205 210
GAC ATC AGT GGA TGC AAG GGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC	786
Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe	215 220 225 230
AAG GAT GAT ACC TGG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG	834
Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys	235 240 245
AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT	882
Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp	250 255 260
TCC GCT CCT GAT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC	930
Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro	265 270 275
GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC	978
Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala	280 285 290
ACC AAG CCT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG	1026
Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys	295 300 305 310
ACA ACC CAG AAG GTC GGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC	1074
Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala	315 320 325

AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln 330 335 340	1122
TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TCC GCT Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala 345 350 355	1170
ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val 360 365 370	1218
CCC AAC TAAATGGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCGTC TCAGAAGGGA Pro Asn 375	1274
TCCTCTCATG AGCAGGCTTG TCATGTGATA GCATGGCATC CTTGACCAAG TGTTCGACCC	1334
TGTGTGTACA TAGTATATCT TCATGTGATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCCTGTGAC	1394
CGACAACCTGG CTACAAAAGA CTGGCAGGC TTGTTCATA TTGACACAGT TTCTCCATA	1454
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1473

(2) 서열 ID NO: 4에 대한 정보

(i) 서열특징:

- (A) 길이: 376 아미노산
- (B) 종류: 아미노산
- (C) 형태: 선형

(ii) 분자종류: 단백질

(xi) 서열기술: SEQ ID NO:4:

Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser 1 5 10 15
Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys 20 25 30
Pro Ser Cys Ser Trp Ser Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu 35 40 45
Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn 50 55 60
Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro 65 70 75 80
Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile 85 90 95
Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr 100 105 110
Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr 115 120 125
Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro 130 135 140
Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys 145 150 155 160
Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys 165 170 175
Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp 180 185 190
Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln 195 200 205
Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp 210 215 220
Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln 225 230 235 240

Pro Ser Ser Ser Ala Lys Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln
 245 250 255

Pro Gln Lys Thr Lys Asp Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr
 260 265 270

Lys Pro Ala Ala Gln Pro Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln
 275 280 285

Thr Asp Lys Pro Val Ala Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln
 290 295 300

Pro Val Asn Lys Pro Lys Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr
 305 310 315 320

Arg Gly Ser Cys Pro Ala Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val
 325 330 335

Val Pro Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn
 340 345 350

Gly Asn Leu Ala Cys Ala Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu
 355 360 365

Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
 370 375

(57) 청구의 범위

청구항 1

첨부된 서열 리스트 ID#2에 도시된 아미노산 서열을 갖고 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 효소, 및 pH 6.0 내지 10.0 사이에서 엔도글루칸아제 활성을 나타내고 *Humicola insolens* DSM 1800으로부터 유래된 매우 정제된 ~43kD 엔도글루칸아제에 대한 항체와 면역반응할수 있는 것을 특징으로 하는 그것의 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 단백질 mg당 50 CMC-엔도아제 단위의 엔도글루칸아제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 3

제1항에 있어서, 적어도 총 단백질 mg당 적어도 60 CMC-엔도아제 단위의 엔도글루칸아제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 4

제1항에 있어서, 적어도 총 단백질 mg당 적어도 90 CMC-엔도아제 단위의 엔도글루칸아제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 5

제1항에 있어서, 적어도 총 단백질 mg당 적어도 100 CMC-엔도아제 단위의 엔도글루칸아제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 6

제1항에 있어서, 본질적으로 셀로비오히드롤라제 활성을 갖지않는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 7

제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서, 약 5.1 인 등전점을 갖는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 8

제7항에 있어서, *Humicola*의 종, 예컨대 *Humicola insolens*에 의하여 생성될 수 있는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 9

첨부된 서열 리스트 ID#4에 도시된 아미노산 서열을 갖고 엔도글루칸아제 활성을 나타내는 효소, 및 pH 6.0 내지 10.0 사이에서 엔도글루칸아제 활성을 나타내고 *Humicola Insolens* DSM 1800으로부터 유래된 매우 정제된 ~43kD 엔도글루칸아제에 대한 항체와 면역반응할수 있는 것을 특징으로 하는 그것의 유도체.

청구항 10

제9항에 있어서, *Fusarium*의 종, 예컨대 *Fusarium oxysporum*에 의하여 생성될 수 있는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 11

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 따른 엔도글루칸아제 효소를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 DNA 서열이 첨부된 서열리스트 ID#1 또는 ID#3에 도시된 바와같은 것을 특징으로 하는 DNA 구조체 또는 그것의 변형.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 따른 삽입된 DNA서열을 지니는 발현 벡터.

청구항 14

제11항 또는 제12항에 따른 DNA 구조체 또는 제14항에 따른 발현 벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Hansenula* 또는 *Saccharomyces*의 균주에 속하는 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 또는 *Saccharomyces cerevisiae*의 균주인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 16

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에서 정의된 엔도글루칸아제 효소를 생성하는 방법으로서, 엔도글루칸아제 효소의 발현을 허용하는 조건하에 적당한 배양배지에서 제14항 또는 제15항에 따른 세포를 배양하고 그리고 배양물로부터 엔도글루칸아제 효소를 회수하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 따른 엔도글루칸아제 효소를, 바람직하게는 비-살포입상형태, 안정화된 액체 또는 보호된 효소형태로 함유하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

청구항 18

제17항에 있어서, 첨가물 g당 효소단백질을 1-500mg을 함유하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

청구항 19

제18항에 있어서, 프로테아제, 리파제, 퍼옥시다제 및/또는 아밀라제와 같은 다른 효소를 부가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

청구항 20

제19항에 있어서, 프로테아제가 *Bacillus lentus* 세린 프로테아제 보다 더높은 정도의 특이성을 갖는 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 프로테아제가 서브틸리신 노보(subtilisin Novo) 또는 그것의 변형, *Nocardia dassonvillei* NRRL 18133에서 유래하는 프로테아제, *Bacillus licheniformis*에 의해 생성될 수 있는 글루탐산과 아스파르트산에 특이적인 세린 프로테아제, 또는 *Fusarium sp.* DSM 2672에 의해 생성될 수 있는 트립신-같은 프로테아제인 것을 특징으로 하는 세정제 첨가물.

청구항 22

제1항 내지 제8항중 어느 한항에 따른 엔도글루칸아제 효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 프로테아제, 리파제, 퍼옥시다제 및/또는 아밀라제 같은 다른 효소를 부가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 프로테아제가 *Bacillus lentus* 세린 프로테아제 보다 더 높은 정도의 특이성을 갖는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 프로테아제가 서브틸리신 노보(subtilisin Novo) 또는 그것의 변형, *Nocardia dassonvillei* NRRL 18133에서 유래하는 프로테아제, *Bacillus licheniformis*에 의해 생성될 수 있는 글루탐산과 아스파르트산에 특이적인 세린 프로테아제, 또는 *Fusarium sp.* DSM 2672에 의해 생성될 수 있는 트립신-같은 프로테아제인 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 26

제22항에 있어서, 상기 엔도글루칸아제 효소가 세척용액 리터당 효소단백질 0.01-100mg에 해당하는 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 27

제17항에 따른 세정제 첨가물을 포함하는 것을 특징으로 하는 세정제 조성물.

청구항 28

섬유소-함유 직물이 거칠어지는 속도를 줄이거나 또는 섬유소-함유 직물의 거칠음을 줄이는 방법으로서, 섬유소-함유 직물을 제1항 내지 제8항중 어느 한항에 따른 엔도글루칸아제 효소로 처리하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 29

착색된 섬유소-함유 직물의 색깔 정화를 제공하는 방법으로서, 착색된 면-함유 직물을 제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 따른 엔도글루칸아제 효소로 처리하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 30

착색된 섬유소-함유 직물의 부분적인 색깔변화를 제공하는 방법으로서, 착색된 면-함유 직물을 제1항 내지 제8항중 어느 한항에 따른 엔도글루칸아제 효소로 처리하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 직물의 엔도글루칸아제 효소 처리가 직물의 침출(soaking), 수세 또는 행굼 동안에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

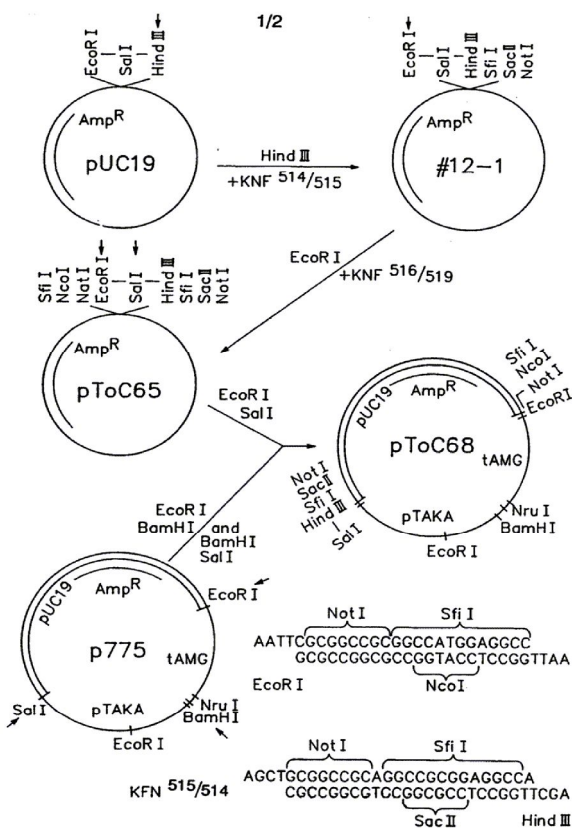
펄프의 배수성을 증진시키는 방법으로서, 종이펄프를 제1항 내지 제8항중 어느 한항에 따른 엔도글루칸아제 효소로 처리하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 33

제9항 또는 제10항에 따른 엔도글루칸아제 효소를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

도면

도면1



도면2

