



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 26 049 T2 2006.09.28

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 226 236 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 26 049.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK00/00560

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 965 857.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/029195

(86) PCT-Anmeldetag: 16.10.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 26.04.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 31.07.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 15.02.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 28.09.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

150199	20.10.1999	DK
164199	15.11.1999	DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

FUKUYAMA, Shiro, Chiba-shi, Chiba, Chiba  
211-0012, JP

(74) Vertreter:

Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler  
Wichmann Huhn, 81675 München

(54) Bezeichnung: POLYPEPTIDE MIT GLUCANOTRANSFERASE AKTIVITÄT UND DAFÜR KODIERENDE NUKLEINSÄUREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Polypeptide, die Glucanotransferase-Aktivität besitzen, und isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für die Polypeptide kodieren. Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Wirtszellen, umfassend die Nukleinsäuresequenzen und Verfahren zum Herstellen und Verwenden der Polypeptide.

**BESCHREIBUNG DES STANDS DER TECHNIK**

**[0002]** 4- $\alpha$ -Glucanotransferasen (EC. 2.4.1.25) katalysieren die Reaktion der Übertragung einer  $\alpha$ -Glucankette von einem  $\alpha$ -Glucanmolekül auf ein anderes (oder auf Glucose). Glucanotransferasen sind in Mikroorganismen (z.B. *E. coli*) und in Pflanzengeweben wie Kartoffelknollen, keimenden Gerstenkörnern, Süßkartoffel und Spinat weit verbreitet.

**[0003]** Kürzlich wurde herausgefunden, dass Glucanotransferasen die Fähigkeit besitzen, eine intramolekulare Reaktion eines  $\alpha$ -Glucans zu katalysieren. Zum Beispiel wurde berichtet, dass Glucanotransferase die Fähigkeit besitzt, eine intramolekulare Transglycosylierungsreaktion (Cyclisierungsreaktion) von Amylose zu katalysieren, wodurch Cycloamylose synthetisiert wird, die einen Polymerisationsgrad (nachstehend „DP“) von 17 oder mehr besitzt.

**[0004]** Glucanotransferasen können für verschiedene industrielle Zwecke eingesetzt werden. Beispielsweise kann eine Glucanotransferase verwendet werden, um ein  $\alpha$ -Glucan zur Herstellung eines zyklischen Glucans aufzubereiten. Im Fall der Verwendung eines Enzyms zu einem industriellen Zweck, wird die Reaktion wünschenswerter Weise bei einer möglichst hohen Temperatur durchgeführt (etwa 60°C oder höher), auf Grund der Tatsache, dass dadurch eine Retrogradation des  $\alpha$ -Glucans, d.h. des Substrats, verhindert wird, und zur selben Zeit eine Kontamination des Systems durch Mikroorganismen verhindert, oder zumindest reduziert wird.

**[0005]** Allgemein wurden nur Glucanotransferasen (Amylomaltasen), die eine hohe Aktivität in einem gemäßigten Temperaturintervall (typischerweise von etwa 30 bis 45°C) isoliert, siehe beispielsweise *Agric. Biol. Chem.* 53, 2653–2659 (1989) und *J. Chem. Soc.*, 44–53 (1956). In letzterer Zeit wurden neuartige hitzeresistente Glucanotransferasen (Amylomaltase), die auch die Fähigkeit besitzen, ein zyklisches Glucan zu erzeugen, in EP 0 884 384 A2 und Terade et al. (*Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1999, S. 910–915) beschrieben.

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0006]** In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung daher ein isoliertes Polypeptid, das Glucanotransferase-Aktivität besitzt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) einem Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die mindestens 80% Identität mit der als Aminosäuren 1 bis 501 gezeigten Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 hat;
- (b) einem Polypeptid, das von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die unter Bedingungen hoher Stringenz hybridisiert mit
  - (i) einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz, gezeigt als Nukleotide 1 bis 1503 von SEQ ID NR:1, oder
  - (ii) einer Untersequenz von (i) von mindestens 100 Nukleotiden;

**[0007]** In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für das erfindungsgemäße Polypeptid kodiert.

**[0008]** In einem dritten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Nukleinsäurekonstrukt, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, funktionell verbunden mit einer oder mehreren Kontrollsequenzen, die in der Lage sind, die Expression des Polypeptids in einem geeigneten Expressionswirt zu steuern.

**[0009]** In einem vierten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen rekombinanten Expressionsvektor, umfassend das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt, einen Promotor und Transkriptions- und Translations-Stoppsignale.

**[0010]** In einem fünften Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine rekombinante Wirtszelle, umfassend

das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum Herstellen des erfindungsgemäßen Polypeptids; Verfahren zum Herstellen von Nahrungsmitteln und die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids zum Herstellen von Nahrungsmitteln sowie Detergenszusammensetzungen, umfassend das erfindungsgemäße Polypeptid.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0012]** [Fig. 1](#) stellt das Plasmid pFUKU-Ruben dar.

**[0013]** [Fig. 2](#) zeigt das pH-Profil des erfindungsgemäßen Polypeptids, wenn es in Acetatpuffer beziehungsweise Phosphatpuffer getestet wird.

**[0014]** [Fig. 3](#) zeigt das Temperaturprofil (von 30 bis 75°C) des erfindungsgemäßen Polypeptids.

**[0015]** [Fig. 4](#) zeigt die thermische Stabilität (von 50 bis 75°C) des erfindungsgemäßen Polypeptids.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

##### Definitionen

**[0016]** Der Begriff „ $\alpha$ -Glucan“, wie hierin verwendet, betrifft auf ein  $\alpha$ -1,4-Glucan (ein Polysaccharid, das eine Kettenstruktur besitzt, die Maltose als konstitutive Disaccharideinheit enthält) oder ein  $\alpha$ -1,4-Glucan, das eine  $\alpha$ -1,6-verzweigte Struktur besitzt. Beispiele für das  $\alpha$ -Glucan schließen ein Amylose, Amylopectin, Stärken, Glycogen, Wachsstärken, Stärken mit hohem Amylosegehalt, lösliche Stärken, Dextrine, hydrolysierte Stärkeprodukte und Amylopektine, die mit Phosphorylase enzymatisch synthetisiert wurden.

**[0017]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „zyklisches Glucan“ ein zyklisches  $\alpha$ -1,4-Glucan bedeuten, das nur  $\alpha$ -1,4-glucosidische Bindungen besitzt, und ein verzweigtes zyklisches Glucan, das sowohl  $\alpha$ -1,4-glucosidische Bindungen als auch  $\alpha$ -1,6-glucosidische Bindungen besitzt. Der Begriff „verzweigt“ soll bedeuten, dass das  $\alpha$ -Glucan (ob zyklisch oder nicht) mindestens eine glukosidische Bindung besitzt, die von einer  $\alpha$ -1,4-Bindung verschieden ist. Beispiele von verzweigten zyklischen Glucanen schließen ein inneres verzweigtes zyklisches Glucan ein, das eine Verzweigungsstruktur enthält, die eine  $\alpha$ -1,6-Bindung in einer zyklischen Struktur besitzt, und ein äußeres verzweigtes zyklisches Glucan, das einen nicht-zyklischen Strukturanteil enthält, zusätzlich zu einer zyklischen Struktur.

**[0018]** Der Begriff „Glucanotransferase-Aktivität“ oder „Aktivität“, wie hierin verwendet, betrifft auf die Aktivität des Polypeptids, die durch die Glucosemenge gemessen wird, die generiert wird, wenn das Polypeptid auf eine Lösung einwirkt, die enthält: 0,86% (Gew./Vol.) Maltotriose und 20 mM Natriumphosphat (pH 7,0) bei 65°C für 10 Minuten. Eine Einheit Enzymaktivität ist definiert als die Menge an Polypeptid, die 1  $\mu$ mol Glucose pro Minute freisetzt, unter Verwendung der oben genannten Bedingungen.

**[0019]** Ein „isoliertes Polypeptid“, wie hierin definiert, ist ein Polypeptid, das im Wesentlichen frei von anderen Polypeptiden ist. Daher sollte ein „isoliertes Polypeptid“ mindestens etwa 20% rein sein, bevorzugter Weise mindestens etwa 40% rein, noch bevorzugter mindestens etwa 60% rein, und sogar noch bevorzugter mindestens 80% rein, und am meisten bevorzugt mindestens etwa 90% rein, insbesondere mindestens etwa 95% rein, wie durch SDS-PAGE bestimmt wird.

**[0020]** Der Begriff „isolierte Nukleinsäuresequenz“, wie hierin verwendet, betrifft auf eine Nukleinsäuresequenz, die im Wesentlichen frei von anderen Nukleinsäuresequenzen ist. Daher sollte eine „isolierte Nukleinsäuresequenz“ mindestens etwa 20% rein sein, bevorzugter Weise mindestens etwa 40% rein, noch bevorzugter mindestens etwa 60% rein, sogar noch bevorzugter mindestens etwa 80% rein, und am meisten bevorzugt mindestens etwa 90% rein sein, wie durch Agaroseelektrophorese bestimmt wird.

**[0021]** Im vorliegenden Kontext schließt der Begriff „Expression“ jeglichen Schritt ein, der in die Herstellung des Polypeptids einbezogen ist, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Transkription, post-transkriptionale Modifikation, Translation, post-translationale Modifikation und Sekretion.

**[0022]** „Nukleinsäurekonstrukt“ wird hierin definiert als ein Nukleinsäuremolekül, entweder einzel- oder dop-

pelsträngig, welches von einem natürlich vorkommenden Gen isoliert wird oder welches modifiziert wurde, um Abschnitte von Nukleinsäure zu enthalten, die in einer Weise kombiniert und nebeneinander gestellt wurden, die sonst nicht in der Natur vorkommen würde. Der Begriff „Nukleinsäurekonstrukt“ ist gleichbedeutend mit dem Begriff „Expressionskassette“, wenn das Nukleinsäurekonstrukt all die Kontrollsequenzen enthält, die zur Expression einer kodierenden Sequenz der vorliegenden Erfindung benötigt werden.

**[0023]** Der Begriff „kodierende Sequenz“ wird hierin definiert als eine Nukleinsäuresequenz, die die Aminosäuresequenz ihres Proteinprodukts direkt spezifiziert. Die Grenzen der kodierenden Sequenz werden generell durch eine ribosomale Bindungsstelle (Prokaryoten) oder durch das ATG-Start-Kodon (Eukaryoten), welches sich unmittelbar aufwärts des offenen Leserahmens, am 5'-Ende der mRNA befindet, und einer Transkriptionsterminatorsequenz, die sich unmittelbar abwärts des offenen Leserahmens am 3'-Ende der mRNA befindet, bestimmt. Eine kodierende Sequenz kann einschließen, ist aber nicht beschränkt auf, DNA, cDNA und rekombinante Nukleinsäuresequenzen.

**[0024]** Der Begriff „Kontrollsequenz“, wie hierin verwendet, schließt alle Komponenten ein, die nötig oder vorteilhaft sind zur Expression eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung.

**[0025]** Der Begriff „funktionell verbunden“ wird hierin definiert als eine Konfiguration, in der eine Kontrollsequenz in geeigneter Weise an eine Position gesetzt wird, die zu der kodierenden Sequenz der DNA-Sequenz in Bezug steht, so dass die Kontrollsequenz die Expression eines Polypeptids steuert.

**[0026]** Der Begriff „Wirtszelle“, wie hierin verwendet, umfasst jegliche Nachkommenschaft einer Elternzelle, die nicht identisch mit der Elternzelle ist, auf Grund von Mutationen, die während der Replikation auftreten.

Verwendung von Polypeptiden, die Glucanotransferase-Aktivität besitzen, um Nahrungsmittel zu verbessern

**[0027]** Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung katalysiert die Zylkisierungsreaktion von Stärke durch Einwirkung auf Stärke in Nahrungsmitteln. Als Ergebnis davon wird die Molekülgröße der Stärke in den Nahrungsmitteln verringert und ein zyklisches Glucan wird hergestellt. Das zyklische Glucan, das durch diese Reaktion hergestellt wird, hat geringe Viskosität, hohe Löslichkeit, die Fähigkeit, Retrogradation von Stärke zu unterdrücken und die Fähigkeit, verschiedene Substanzen einzuschließen. Daher können durch die Verwendung des Polypeptids der vorliegenden Erfindung Nahrungsmittel verbessert werden. Typischerweise wird das Polypeptid der Erfindung auf die Stärke in Nahrungsmitteln einwirken gelassen, um ein zyklisches Glucan anzureichern, wodurch die physikalischen Eigenschaften der Nahrungsmittel, wie eine verbesserte Stabilität während der Lagerung und das Gefühl im Mund verbessert werden können. Das zyklische Glucan wird im Organismus leicht zu Glucose abgebaut, und als Konsequenz hat das zyklische Glucan eine gute Verdaubarkeit und eine hohe Effizienz an Energieumwandlung.

**[0028]** Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um einen weiten Bereich von Stärke enthaltenden Nahrungsmitteln zu verbessern, einschließlich japanischen Süßspeisen (z.B. Farnreiskuchen („bracken rice cakes“), Bohnenkuchen, Reiskuchen, Reisgelee und Reisbohnenkuchen), Knabbersachen (z.B. japanische Kekse, Reiskekse, Kartoffelchips und andere Knabbersachen), Weizenprodukte (z.B. Brote, Torten, Pizzas, Kuchen, Kekse, Biskuits und Kräcker), Nudeln (z.B. Weizennudeln, Buchweizennudeln, chinesische Nudeln und Pasta, wie Spaghetti und Makkaroni, Gyoza-Teigblätter, Shumai-Teigblätter, verarbeitete Fische und Meeresfrüchte (z.B. Fischstäbchen und Fischpasten-Kuchen („fish-paste cakes“)), gefrorene oder gekühlte verarbeitete Nahrungsmittel, Nahrungsmittel zum Abstellen, Babynahrung, Haustierfutter, Tierfutter, Getränke (z.B. Sportgetränke), Sportnahrungsmittel und Nahrungsergänzungsmittel.

**[0029]** Reisprodukte, japanische Süßspeisen, Knabbereien, Weizenprodukte und Nudeln, die Stärke in großen Mengen enthalten, sind Beispiele von bevorzugten Nahrungsmitteln, auf die die vorliegende Erfindung angewendet werden kann. Andere Beispiele von bevorzugten Nahrungsmitteln sind gefrorene oder gekühlte verarbeitete Nahrungsmittel, bei denen die Stabilität während einer Lagerung bei tiefen Temperaturen von Bedeutung ist.

**[0030]** Der Begriff "Nahrungsmittelmaterial" wie hierin verwendet, betrifft auf jegliches Material, mit dem die oben beschriebenen Nahrungsmittel hergestellt werden können, und jegliche Zubereitungen, die während des Verfahrens der Nahrungsmittelherstellung bereitgestellt werden.

**[0031]** Ob ein Nahrungsmittel, das dem Polypeptid der Erfindung ausgesetzt wurde, verbessert wird, kann bestätigt werden, indem untersucht wird, ob die Molekülgröße der Stärke im Nahrungsmittel als Ergebnis der Er-

zeugung eines zyklischen Glucans reduziert wurde.

**[0032]** Nahrungsmittelmaterialien, Zusammensetzungen von Nahrungsmittelzusätzen und Nahrungsmittelverbessernde Mittel, die jeweils das Polypeptid der Erfindung umfassen, liegen auch im Schutzmumfang der vorliegenden Erfindung. Beispiele von Zusammensetzungen von Nahrungsmittelzusätzen schließen ein Würzmittel (z.B. Sojasaucen, Sojasaucendips, Worcestersaucen, Fleischbrühenbasis, Eintopfbasis, Currybasis, Suppenbasis, Mayonaise, Salatsaucen, Ketchup, und zusammengesetzte Gewürzmittel). Beispiele für Nahrungsmittelverbessernde Mittel schließen Mittel gegen Retrogradation und Verbesserungsmittel für gedämpften Reis ein.

Detergentszammensetzungen, umfassend das Polypeptid mit Glucanotransferase-Aktivität

**[0033]** Da Stärkeflecken, z.B. Amyloseflecken, mit den vorhandenen Detergentien schwierig zu entfernen sein können, wird in Erwägung gezogen, dass das erfindungsgemäße Polypeptid auf Grund der Fähigkeit, die Modifizierung von kristallinen Stärken wie Amylose zu wasserlöslicheren zyklischen Verbindungen zu katalysieren, in solchen Detergentien verwendet werden kann.

**[0034]** Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch Reinigungs- oder Deterszammensetzungen, die das erfindungsgemäße Polypeptid umfassen; die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids zur Entfernung von Stärkeflecken, insbesondere zur Entfernung von Amyloseflecken; und auf ein Verfahren zur Entfernung von Stärkeflecken, insbesondere zur Entfernung von Amyloseflecken, von einer harten Oberfläche oder von Wäsche, wobei das Verfahren das In-Kontakt-Bringen der den Amylosefleck enthaltenden Oberfläche oder der den Amylosefleck enthaltenden Wäsche mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder mit der erfindungsgemäßen Reinigungs- oder Deterszammensetzung umfasst.

**[0035]** Solche Reinigungs- und Deterszammensetzungen sind im Stand der Technik gut beschrieben und es wird auf WO 96/34946; WO 97/07202; WO 95/30011 für eine weitere Beschreibung von geeigneten Reinigungs- und Deterszammensetzungen verwiesen.

#### Deterszammensetzungen

**[0036]** Das erfindungsgemäße Polypeptid kann zu einer Deterszammensetzung hinzugefügt und damit ein Bestandteil davon werden.

**[0037]** Die erfindungsgemäße Deterszammensetzung kann z.B. als eine Hand- oder Maschinenwaschmittelzammensetzung formuliert werden, einschließlich einer Waschmittelzusatzzammensetzung, die zur Vorbehandlung von befleckten Geweben geeignet ist, und eine im Spülgang zugefügte Zusammensetzung von Gewebeweichspüler, oder kann formuliert werden als eine Deterszammensetzung zur Verwendung in allgemeinen Haushaltarbeitsgängen zum Reinigen harter Oberflächen, oder kann formuliert werden für Arbeitsgänge des Geschirrspülens von Hand oder mit der Maschine.

**[0038]** In einem speziellen Aspekt stellt die Erfindung einen Deterszusatz bereit, der das erfindungsgemäße Enzym umfasst. Der Deterszusatz und die Deterszammensetzung können eines oder mehrere andere Enzyme umfassen wie eine Protease, eine Lipase, eine Cutinase, eine Amylase, eine Carbohydrase, eine Cellulase, eine Pektinase, eine Mannanase, eine Arabinase, eine Galactanase, eine Xylanase, eine Oxidase, z.B. eine Laccase und/oder eine Peroxidase.

**[0039]** Allgemein sollten die Eigenschaften des/der ausgewählten Enzyme(s) kompatibel sein mit dem ausgewählten Deters (d.h. pH-Optimum, Kompatibilität mit anderen enzymatischen und nicht-enzymatischen Zutaten, etc.), und das/die Enzyme) sollten in wirksamen Mengen vorhanden sein.

#### Proteasen:

**[0040]** Geeignete Proteasen schließen solche mit Ursprung aus Tieren, Pflanzen oder Mikroben ein. Ein Ursprung aus Mikroben ist bevorzugt. Chemisch modifizierte oder bezüglich der Proteine technisch veränderte Mutanten sind eingeschlossen. Die Protease kann eine Serinprotease oder eine Metalloprotease sein, bevorzugt eine alkalische mikrobielle Protease oder eine trypsinartige Protease. Beispiele von alkalischen Proteasen sind Subtilisine, besonders die, die aus *Bacillus* stammen, z.B. Subtilisin Novo, Subtilisin Carlsberg, Subtilisin 309, Subtilisin 147 und Subtilisin 168 (beschrieben in WO 89/06279). Beispiele für trypsinartige Proteasen sind Trypsin (z.B. aus Schweine- oder Rinderursprung) und die Fusarium-Protease, die in WO 89/06270

und WO 94/25583 beschrieben wird.

**[0041]** Beispiele von verwendbaren Proteasen sind die Varianten, die in WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 und WO 98/34946 beschrieben werden, besonders die Varianten mit Substitutionen in einer oder mehrerer der folgenden Positionen: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 und 274.

**[0042]** Bevorzugte im Handel erhältliche Proteaseenzyme schließen ein Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, und Kannase™ (Novo Nordisk A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™, und FN3™ (Genencor International Inc.).

#### Lipasen:

**[0043]** Geeignete Lipasen schließen solche mit Ursprung aus Bakterien oder Pilzen ein. Chemisch modifizierte oder bezüglich der Proteine technisch veränderte Mutanten sind eingeschlossen. Beispiele von verwendbaren Lipasen schließen Lipasen aus Humicola (Synonym Thermomyces), z.B. von *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) wie beschrieben in EP 258 068 und EP 305 216 oder von *H. insolens* wie beschrieben in WO 96/13580, eine Pseudomonas-Lipase, z.B. von *P. alcaligenes* oder *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. Stamm SD 705 (WO 95/06720 und WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), eine *Bacillus* Lipase, z.B. von *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), Biochimica et Biophysica Acta, 1131, 253–360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) oder *B. pumilus* (WO 91/16422) ein.

**[0044]** Andere Beispiele sind Lipase-Varianten wie die, die in WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 und WO 97/07202 beschrieben werden. Bevorzugte im Handel erhältliche Lipaseenzyme schließen Lipolase™ und Lipolase ultra™ (Novo Nordisk A/S) ein.

#### Amylasen:

**[0045]** Geeignete Amylasen ( $\alpha$  und/oder  $\beta$ ) schließen solche mit Ursprung aus Bakterien oder Pilzen ein. Chemisch modifizierte oder bezüglich der Proteine technisch veränderte Mutanten sind eingeschlossen. Amylasen schließen z.B.  $\alpha$ -Amylasen erhalten aus *Bacillus*, z.B. einem speziellen Stamm von *B. licheniformis*, de-taillierter beschrieben in GB 1,296,839, ein. Beispiele von verwendbaren Amylasen sind die Varianten beschrieben in WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 und WO 97/43424, besonders die Varianten mit Substitutionen in einer oder mehrerer der folgenden Positionen: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, und 444.

**[0046]** Im Handel erhältliche Amylasen sind Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ und BAN™ (Novo Nordisk A/S), Rapidase™ und Purastar™ (von Genencor International Inc.).

#### Cellulasen:

**[0047]** Geeignete Cellulasen schließen solche mit Ursprung aus Bakterien oder Pilzen ein. Chemisch modifizierte oder bezüglich der Proteine technisch veränderte Mutanten sind eingeschlossen. Geeignete Cellulasen schließen Cellulasen der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium* ein, z.B. die Pilz-Cellulasen, die von *Humiola insolens*, *Myceliphthora thermophila* und *Fusarium oxysporum* hergestellt werden, die in US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 und WO 89/09259 offenbart werden.

**[0048]** Besonders geeignete Cellulasen sind die alkalischen oder neutralen Cellulasen, die Vorzüge bezüglich der Farbpflege haben. Beispiele solcher Cellulasen sind die Cellulasen, die in EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940 beschrieben werden. Andere Beispiele sind Cellulasevarianten wie solche beschrieben in WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307.

**[0049]** Im Handel erhältliche Cellulasen schließen ein Celluzyme™ und Carezyme™ (Novo Nordisk A/S), Clazinase™ und Puradax HA™ (Genencor International Inc.) und KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

## Peroxidasen/Oxidasen:

**[0050]** Geeignete Peroxidasen/Oxidasen schließen solche mit Ursprung aus Pflanzen, Bakterien oder Pilzen ein. Chemisch modifizierte oder bezüglich der Proteine technisch veränderte Mutanten sind eingeschlossen. Beispiele von geeigneten Peroxidasen schließen Peroxidasen von Coprinus ein, z.B. von *C. cinereus*, und Varianten davon, wie solche, die in WO 93/24618, WO 95/10602, und WO 98/15257 beschrieben werden.

**[0051]** Im Handel erhältliche Peroxidasen schließen Guardzyme™ ein (Novo Nordisk A/S). Das/die Detergensenzym(e) kann/können in eine Detergenszusammensetzung durch Hinzufügen von separaten Zusätzen eingeschlossen werden, die eines oder mehrere Enzyme enthalten, oder durch Hinzufügen eines kombinierten Zusatzes, der alle diese Enzyme umfasst. Ein erfindungsgemäßer Detergenszusatz, d.h. ein separater Zusatz oder ein kombinierter Zusatz, kann z.B. als ein Granulat, eine Flüssigkeit, ein Schlamm, etc. formuliert werden. Bevorzugte Detergenszusatzformulierungen sind Granulat, insbesondere nicht-staubende Granulat, Flüssigkeit, insbesondere stabilisierte Flüssigkeiten oder Schlämme.

**[0052]** Nicht-staubende Granulat können, z.B. wie in US 4,106,991 und 4,661,452 beschrieben hergestellt werden, und können gegebenenfalls durch im Stand der Technik bekannte Verfahren beschichtet werden. Beispiele von wachsartigen Beschichtungsmaterialien sind Poly(ethylenoxid)-Produkte (Polyethylenglycol, PEG) mit mittleren Molekulargewichten von 1000 bis 20000; ethoxylierte Nonylphenole, mit von 16 bis 50 Ethylenoxideinheiten; ethoxylierte Fettalkohole, in denen der Alkohol von 12 bis 20 Kohlenstoffatome enthält und in denen 15 bis 80 Ethylenoxideinheiten vorhanden sind; Fettalkohole; Fettsäuren; und Mono- und Di- und Triglyceride von Fettsäuren. Beispiele von filmbildenden Beschichtungsmaterialien, die zur Anwendung durch Fließbetttechniken geeignet sind, werden in GB 1483591 angegeben. Flüssige Enzymzubereitungen können z.B. durch Hinzufügen eines Polyols so wie Propylenglycol, eines Zuckers oder Zuckerkohols, Milchsäure oder Borsäure gemäß etablierter Methoden stabilisiert werden. Geschützte Enzyme können gemäß des Verfahrens, das in EP 238,216 offenbart wird, zubereitet werden.

**[0053]** Die Detergenszusammensetzung der Erfahrung kann in irgendeiner zweckmäßigen Form sein, z.B. ein Barren, eine Tablette, ein Pulver, ein Granulat, eine Paste oder eine Flüssigkeit. Ein flüssiges Detergens kann wässrig sein, und typischerweise bis zu 70 % Wasser und 0 bis 30 % organisches Lösungsmittel enthalten, oder nicht wässrig sein.

**[0054]** Die Detergenszusammensetzung umfasst eines oder mehrere Surfactants, die nicht-ionisch sein können, einschließlich semi-polar und/oder anionisch und/oder kationisch und/oder zwitterionisch. Die Surfactants sind typischerweise auf einem Spiegel von 0,1 bis 60 Gew.-% vorhanden.

**[0055]** Wenn ein Detergens eingeschlossen ist, wird es gewöhnlich von etwa 1 % bis etwa 40 % eines anionischen Surfactants enthalten, wie lineares Alkylbenzolsulfonat, Alpha-Olefinsulfonat, Alkylsulfat (Fettalkoholsulfat), Alkohol-Ethoxysulfat, sekundäres Alkansulfonat, Alpha-Sulfofettsäure-Methylester, Alkyl- oder Alkenylbernsteinsäure oder Seife.

**[0056]** Wenn ein Detergens hier eingeschlossen ist, wird es gewöhnlich von etwa 0,2 % bis etwa 40 % eines nicht-ionischen Surfactants enthalten, so wie Alkohol-Ethyoxylat, Nonylphenolethyoxylat, Alkylpolyglycosid, Alkyldimethylaminoxid, ethoxyliertes Fettsäure-Monoethanolamid, Fettsäure-Monoethanolamid, Polyhydroxyalkyl-Fettsäureamid, oder N-Acyl N-Alkyl-Derivate von Glucosamin ("Glucamide").

**[0057]** Das Detergens kann 0–65 % eines Gerüststoffs oder Komplexbildners wie Zeolith, Diphosphat, Triphosphat, Phosphonat, Carbonat, Citrat, Nitrilo-Triessigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure, Diethylentriaminpentaessigsäure, Alkyl- oder Alkenylbernsteinsäure, lösliche Silikate oder geschichtete Silikate (z.B. SKS-6 von Hoechst) enthalten.

**[0058]** Das Detergens kann eines oder mehrere Polymere umfassen. Beispiele sind Carboxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyridin-N-Oxid, Polyvinylimidazol, Polycarbonylate, wie Polyacrylate, Malein-/Acrylsäure-Copolymere und Laurylmethacrylat/Acrylsäure-Copolymere.

**[0059]** Das Detergens kann ein System zum Bleichen enthalten, das eine  $H_2O_2$ -Quelle wie Perborat oder Percarbonat enthalten kann, welche mit einem Persäure-bildenden Aktivierungsmittel zum Bleichen kombiniert werden kann, wie Tetraacetylhydrazin oder Nonanoyloxybenzolsulfonat. Alternativ kann das System zum Bleichen Peroxsäuren umfassen z.B. vom Amid-, Imid- oder Sulfotyp.

**[0060]** Das/die Enzyme) der erfindungsgemäßen Detergents-Zusammensetzung kann/können durch Verwendung von konventionellen Stabilisierungsmitteln stabilisiert werden, z.B. ein Polyol wie Propylenglycol oder Glycerol, einem Zucker oder Zuckeralkohol, Milchsäure, Borsäure, oder einem Borsäurederivat, z.B. einem aromatischen Boratester oder einem Phenylboronsäurederivat wie 4-Formylphenylboronsäure, und die Zusammensetzung kann wie z.B. in WO 92/19709 und WO 92/19708 beschrieben formuliert werden.

**[0061]** Das Detergents kann auch andere konventionelle Detergents-Zutaten enthalten wie z.B. Gewebe-Conditioner einschließlich Tonerden, Schaumverstärker, Anti-Seifenschaummittel, korrosionsverhindernde Mittel, schmutzlösende Mittel, Mittel, die das Wiederabsetzen von Schmutz verhindern, Farbstoffe, Bakterizide, optische Aufheller, hydrotrope Stoffe, Inhibitoren von Mattwerden oder Parfüme.

**[0062]** Es wird momentan in Erwägung gezogen, dass in der Detergentszusammensetzung jedes Enzym, insbesondere das erfindungsgemäße Polypeptid (Enzym), in einer Menge, die 0,01 bis 100 mg Enzymprotein pro Liter an Waschflüssigkeit entspricht, zugesetzt werden kann, bevorzugter Weise 0,05 bis 5 mg Enzymprotein pro Liter an Waschflüssigkeit, insbesondere 0,1 bis 1 mg Enzymprotein pro Liter von Waschflüssigkeit.

**[0063]** Das erfindungsgemäße Polypeptid kann zusätzlich in die Detergents-Formulierungen aufgenommen werden, die in WO 97/07202 offenbart werden, welche hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

#### Polypeptide, die Glucanotransferase-Aktivität besitzen

**[0064]** In einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besitzt das isolierte Polypeptid eine Aminosäuresequenz, die mindestens 65 % Identität mit der Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2 hat (d.h. das reife Polypeptid). In einer interessanten Ausführungsform der Erfindung hat das Polypeptid mindestens 70 %, mindestens 75 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 96 %, mindestens 97 %, mindestens 98 %, oder mindestens 99 % Identität mit der Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2 (nachfolgend "homologe Polypeptide").

**[0065]** In einer bevorzugten Ausführungsform haben die homologen Polypeptide eine Aminosäuresequenz, die sich von der Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2 durch 5 Aminosäuren, z.B. durch vier Aminosäuren, wie durch drei Aminosäuren, durch zwei Aminosäuren oder durch eine Aminosäure unterscheidet.

**[0066]** Sequenz-Alignments und die Berechnung von Identitätswerten wurden unter Benutzung eines vollen Smith-Waterman-Alignments durchgeführt, das sowohl für Protein- und DNA-Alignments verwendbar ist. Die Default-Scoring-Matrizen BLOSUM50 und die Identitäts-Matrix werden für Protein- beziehungsweise DNA-Alignments verwendet. Die „Penalty“ für den ersten Rest in einem „Gap“ ist -12 für Proteine und -16 für DNA, während die Penalty für zusätzliche Reste in einem Gap -2 für Proteine und -4 für DNA ist. Das „Align“ ist von dem Fasta-Package Version v20u6 (W. R. Pearson und D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, und W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA" Methods of Enzymology 183:63-98).

**[0067]** Wenn ein „Alignment“ mit der Glucanotransferase, die die Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 hat, mit dem nächstliegenden Stand der Technik durchgeführt wird, nämlich der Glucanotransferase, die die Sequenz hat, die in EP 0884384 offenbart wird, und wenn die oben beschriebenen Verfahren verwendet werden, werden die folgenden Identitätsprozentzahlen erhalten: % Identität zwischen Aminosäuresequenzen: 62,5 %, und % Identität zwischen Nukleinsäuresequenzen: 65,5 %.

**[0068]** Vorzugsweise umfassen die Polypeptide der vorliegenden Erfindung die Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2, eine allelische Variante davon oder ein Fragment davon mit Glucanotransferase-Aktivität. Offensichtlich kann das erfindungsgemäße Polypeptid auch aus der Aminosäuresequenz bestehen, die als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2 gezeigt werden.

**[0069]** Eine allelische Variante bezeichnet eine beliebige von zwei oder mehr alternativen Formen eines Gens, das denselben chromosomal Lokus belegen. Allelische Variationen entstehen natürlich durch Mutation, und können Polymorphismus innerhalb von Populationen zum Ergebnis haben. Genmutationen können still sein (keine Veränderung im kodierten Polypeptid), oder können für Polypeptide kodieren, die veränderte Aminosäuresequenzen besitzen. Eine allelische Variante eines Polypeptids ist ein Polypeptid, das von einer allelischen Variante eines Gens kodiert wird.

**[0070]** In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung wird das isolierte Polypeptid durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert, die unter Bedingungen hoher Stringenz hybridisiert mit (i) einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz, gezeigt als Nukleotide 1 bis 1503 von SEQ ID NR.1, oder (ii) einer Untersequenz von (i) von mindestens 100 Nukleotiden (J. Sambrook, E.F. Fritsch, und T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor, New York).

**[0071]** Die Untersequenz des komplementären Strangs der Nukleinsäuresequenz, gezeigt als Nukleotide 1 bis 1503 von SEQ ID NR.1, kann mindestens 100 Nukleotide oder bevorzugter Weise mindestens 200 Nukleotide sein. Überdies sollte die Untersequenz für ein Polypeptid-Fragment kodieren, welches Glucotransferase-Aktivität besitzt. Die Polypeptide können auch allelische Varianten oder Fragmente der Polypeptide sein, die Glucotransferase-Aktivität besitzen.

**[0072]** Die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NR. 1 oder eine Untersequenz davon, sowie die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 2 oder ein Fragment davon, können verwendet werden, um eine Nukleinsäureprobe zu entwerfen, um DNA zu identifizieren und zu klonieren, die für Polypeptide mit Glucanotransferase-Aktivität kodiert, von Stämmen oder verschiedenen Gattungen oder Arten gemäß im Stand der Technik gut bekannter Verfahren. Insbesondere können solche Proben zum Hybridisieren mit genomischer DNA oder cDNA der interessierenden Gattung oder Art nach Standard-Southern-Blotting-Verfahrensweisen verwendet werden, um das korrespondierende Gen darin zu identifizieren und isolieren. Solche Proben können beträchtlich kürzer als die gesamte Sequenz sein, aber sollten mindestens 15, bevorzugt mindestens 25 und bevorzugter mindestens 35 Nukleotide lang sein. Längere Proben können auch verwendet werden. Sowohl DNA- als auch RNA-Proben können verwendet werden. Typischerweise werden die Proben markiert, um das korrespondierende Gen nachzuweisen (z.B. mit  $^{32}\text{P}$ ,  $^{3}\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ , Biotin oder Avidin). Solche Proben sind durch die vorliegende Erfindung umfasst.

**[0073]** Daher kann mit einer genomische DNA oder cDNA-Bibliothek, die aus solchen anderen Organismen hergestellt wurde, ein „Screening“ auf DNA durchgeführt werden, die mit den oben beschriebenen Proben hybridisiert und die für ein Polypeptid kodiert, das Glucanotransferase-Aktivität besitzt. Genomische oder andere DNA von solchen anderen Organismen kann durch Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese, oder durch andere dem Fachmann bekannte Trenntechniken aufgetrennt werden. DNA aus den Bibliotheken oder die aufgetrennte DNA kann auf Nitrocellulose oder auf andere geeignete Trägermaterialien transferiert und immobilisiert werden. Um einen Klon oder DNA zu identifizieren, der/die homolog mit SEQ ID NR. 1 oder einer Untersequenz davon sind, wird das Trägermaterial in einem Southern-Blot verwendet. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bedeutet Hybridisieren, dass die Nukleinsäure mit einer markierten Nukleinsäureprobe hybridisiert, die zur Nukleinsäuresequenz gezeigt in SEQ ID NR. 1, ihrem komplementären Strang oder einer Untersequenz davon korrespondiert, unter Bedingungen geringer bis hoher Stringenz. Moleküle, an die die Nukleinsäureprobe unter diesen Bedingungen hybridisiert, werden durch Verwendung von Röntgenfilmen nachgewiesen.

**[0074]** In einer zweiten interessanten Ausführungsform ist die Nukleinsäureprobe eine Nukleinsäuresequenz, die für das (reife) Polypeptid von SEQ ID NR. 2 oder eine Untersequenz davon kodiert. In einer dritten interessanten Ausführungsform ist die Nukleinsäureprobe SEQ ID NR. 1. In einer vierten interessanten Ausführungsform ist die Nukleinsäureprobe die für das reife Polypeptid kodierende Region von SEQ ID NR. 1. In einer fünften interessanten Ausführungsform ist die Nukleinsäureprobe die Nukleinsäuresequenz, die im Plasmid pFuKu-Ruben enthalten ist, welches in Escherichia coli DSM 13049 enthalten ist, wobei die Nukleinsäuresequenz für ein Polypeptid kodiert, das Glucanotransferase-Aktivität besitzt. In einer sechsten interessanten Ausführungsform ist die Nukleinsäureprobe die für das reife Polypeptid kodierende Region, die im Plasmid pFuKu-Ruben enthalten ist, welches in Escherichia coli DSM 13049 enthalten ist.

**[0075]** Für lange Proben von mindestens 100 Nukleotiden Länge werden Bedingungen niedriger bis hoher Stringenz definiert als Prä-Hybridisierung und Hybridisierung bei 42 °C in 5 × SSPE, 0,3 % SDS, 200 µg/ml gescheerte und denaturierte Lachssperma-DNA, und entweder 25 % Formamid für niedrige Stringenz, 35 % Formamid für mittlere Stringenz, oder 50 % Formamid für hohe Stringenz, gemäß Standardverfahrensweisen für Southern-Blotting.

**[0076]** Für lange Proben von mindestens 100 Nukleotiden Länge wird das Trägermaterial schließlich dreimal jeweils 15 Minuten unter Verwendung von 2 × SSC, 0,2 % SDS, bevorzugter Weise mindestens bei 50 °C (geringe Stringenz), bevorzugter mindestens bei 55 °C (mittlere Stringenz), noch bevorzugter mindestens bei 65 °C (hohe Stringenz), gewaschen.

**[0077]** Für kurze Proben, die etwa 15 Nukleotide bis etwa 70 Nukleotide lang sind, werden Stringenzbedingungen definiert als Prä-Hybridisierung, Hybridisierung, und Waschen nach der Hybridisierung bei 5 °C bis 10 °C unter der kalkulierten  $T_m$ , unter Verwendung der Rechnung nach Bolton und McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) in 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 1 × Denhardt-Lösung, 1 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM einbasisches Natriumphosphat, 0,1 mM ATP, und 0,2 mg Hefe-RNA pro ml, gemäß Standardverfahrensweisen für Southern-Blotting.

**[0078]** Für kurze Proben von etwa 15 Nukleotiden bis etwa 70 Nukleotiden Länge, wird das Trägermaterial einmal in 6 × SCC plus 0,1 % SDS für 15 Minuten und jeweils zweimal für 15 Minuten unter Verwendung von 6 × SSC bei 5 °C bis 10 °C unter der berechneten  $T_m$  gewaschen.

**[0079]** Wie oben gezeigt kann das erfindungsgemäße Polypeptid ein Polypeptid sein, das eine Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 2 besitzt, oder das reife Polypeptid davon, wobei eine oder mehrere Aminosäure(n) durch eine (mehrere) andere Aminosäure(n) substituiert wurde(n), wobei eine oder mehrere Aminosäure(n) deletiert wurde(n), und/oder wobei eine oder mehrere Aminosäure(n) insertiert wurde(n).

**[0080]** Bevorzugter Weise sind die Aminosäureänderungen von geringfügiger Natur, d.h. konservative Aminosäuresubstitutionen, die die Faltung und/oder Aktivität des Proteins nicht signifikant beeinflussen; kleine Deletionen, typischerweise von einer bis etwa 30 Aminosäuren; kleine amino- oder carboxyl-terminale Verlängerungen, sowie ein amino-terminaler Methioninrest; ein kleines Linkerpeptid von bis zu etwa 20–25 Resten; oder eine kleine Verlängerung, die die Reinigung durch Änderung der Nettoladung oder einer anderen Funktion vereinfacht, wie ein Poly-Histidin-Teil, ein antigenisches Epitop oder eine Bindedomäne.

**[0081]** Beispiele für konservative Substitutionen sind innerhalb der Gruppe von basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin), sauren Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure), polaren Aminosäuren (Glutamin und Asparagin), hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin), aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin), und kleinen Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin, Threonin und Methionin). Aminosäuresubstitutionen, die allgemein nicht die spezifische Aktivität ändern, sind im Stand der Technik bekannt und werden z.B. durch H. Neurath und R.L. Hill, 1979, In the Proteins, Academic Press, New York, beschrieben. Die am häufigsten auftretenden Austausche sind Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, und Asp/Gly und diese in umgekehrter Reihenfolge.

**[0082]** In einer sehr interessanten Ausführungsform der Erfindung ist das Polypeptid thermostabil, d.h. das erfindungsgemäße Polypeptid behält seine enzymatische Aktivität bei erhöhten Temperaturen bei.

**[0083]** Daher haben die derzeitigen Erfinder einen geeigneten vorläufigen Test entwickelt, der vom Fachmann leicht benutzt werden kann, um einzuschätzen, ob ein isoliertes Polypeptid als thermostabil betrachtet werden kann. Daher sind besonders bevorzugte Polypeptide, wenn sie wie hierin beschrieben getestet werden, solche Polypeptide, die mindestens 75 % Aktivität, z.B. mindestens 80 % Aktivität, sowie mindestens 85 %, bevorzugt mindestens 90 %, sowie mindestens 95 %, insbesondere im Wesentlichen volle Aktivität nach Inkubation bei 67 °C beibehalten, bevorzugt nach Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten in einem 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0. In diesem Zusammenhang sollte verstanden werden, dass 100 % Aktivität sich auf die vorher beschriebene Glucanotransferase-Aktivität bezieht, d.h. die oben genannten Prozentwerte werden relativ zur Aktivität des Polypeptids nach Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten in einem 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, gemessen.

**[0084]** Das Enzym sollte bevorzugter Weise ein pH-Optimum im Bereich von 6 bis 8 haben, insbesondere im Bereich von etwa 6,5 bis etwa 7,5, sowie im Bereich von etwa 6,75 bis etwa 7,25, z.B. etwa 7.

**[0085]** Weiterhin sollte das erfindungsgemäße Polypeptid bevorzugter Weise, indem es auf ein  $\alpha$ -Glucan wie Amylose einwirkt, die Fähigkeit besitzen, ein zyklisches Glucan durch eine intramolekulare Transglycosylierungsreaktion zu erzeugen. Zusätzlich sollte das erfindungsgemäße Polypeptid bevorzugter Weise, indem es auf ein  $\alpha$ -Glucan einwirkt, das eine verzweigte Struktur umfasst, z.B. es eine  $\alpha$ -1,6-Bindung wie Amylopektin besitzt, die Fähigkeit besitzen, ein verzweigtes zyklisches Glucan zu erzeugen.

**[0086]** Darüber hinaus sind Polypeptide, die auch als vom Schutzbereich der vorliegenden Erfindung umfasst betrachtet werden, isolierte Polypeptide, bevorzugter Weise in einer gereinigten Form, die immunochemische Identität oder teilweise immunochemische Identität zum Polypeptid besitzen, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 2 oder dem reifen Polypeptid davon hat. Die immunochemischen Eigenschaften werden bestimmt durch immunologische Kreuzreaktions-Identitätstests durch das bekannte Doppel-Immunodiffusionsverfahren

nach Ouchterlony. Genauer wird ein Antiserum, das polyklonale Antikörper enthält, die immunreaktiv sind oder an Epitope des Polypeptids mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 2 oder das reife Polypeptid davon binden, zubereitet, indem Kaninchen (oder andere Nagetiere) immunisiert werden gemäß der Verfahrensweise beschrieben in Harboe und Ingild, In N.H. Axelsen, J. Krøll, und B. Weeks, Hrsg., A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 23, oder Johnstone und Thorpe, Immunoochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (genauer die Seiten 27–31). Ein Polypeptid, das immunochemische Identität besitzt, ist ein Polypeptid, das mit dem Antiserum in einer identischen Weise reagiert, wie eine totale Fusion von Präzipitaten, identischer Präzipitat-Morphologie, und/oder identischer elektrophoretischer Beweglichkeit bei Verwendung einer spezifischen immunochemischen Technik. Eine weitere Erklärung von immunochemischer Identität wird in Axelsen, Bock, und Krøll, In N.H. Axelsen, J. Krøll und B. Weeks, Hrsg., A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 10, beschrieben. Ein Polypeptid, das teilweise immunochemische Identität besitzt, ist ein Polypeptid, das mit dem Antiserum in einer teilweise identischen Weise reagiert, wie teilweiser Fusion von Präzipitaten, teilweiser identischer Morphologie des Präzipitats, und/oder teilweiser identischer elektrophoretischer Beweglichkeit bei Verwendung einer speziellen immunochemischen Technik. Eine weitere Erklärung von teilweiser immunochemischer Identität wird durch Bock Axelsen, In N.H. Axelsen, J. Krøll und B. Weeks, Hrsg., A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 11, beschrieben.

**[0087]** Der Antikörper kann auch ein monoklonaler Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können hergestellt und verwendet werden, z.B. nach den Verfahren von E. Harlow und D. Lane, Hrsg., 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

**[0088]** Allgemein wird bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide mindestens 20 % der Glucanotransferase-Aktivität des Polypeptids besitzen, das die Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2 hat.

**[0089]** Besonders bevorzugt sind Polypeptide, die mindestens 30 % sowie mindestens 40 %, z.B. mindestens 50 %, bevorzugter Weise mindestens 60 %, wie mindestens 70 %, z.B. mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 90 % oder mindestens 95 % der Glucanotransferase-Aktivität des Polypeptids besitzen, das die Aminosäuresequenz gezeigt als Aminosäuren 1 bis 501 von SEQ ID NR. 2 hat.

**[0090]** Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann aus Mikroorganismen einer beliebigen Gattung, erhalten werden. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung soll der Begriff "erhalten von", wie hierin verwendet, im Zusammenhang mit einer genannten Quelle bedeuten, dass das Polypeptid, das durch die Nukleinsäuresequenz kodiert wird, von der Quelle oder von einer Zelle hergestellt wird, in die die Nukleinsäuresequenz von der Quelle eingebracht wurde. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Polypeptid extrazellulär sezerniert.

**[0091]** In einer interessanten Ausführungsform der Erfindung kann das Polypeptid der Erfindung von der Gattung *Thermus* erhalten werden, insbesondere von *Thermus rubens*, wie *Thermus rubens* ATCC 31556.

**[0092]** Die derzeitigen Erfinder haben das Gen, das für das Polypeptid mit Glucanotransferase-Aktivität kodiert, aus *Thermus rubens* ATCC 31556 isoliert und haben es in *E. coli* DH12S eingebracht. Der *E. coli* Stamm, der das Gen beherbergt, wurde gemäß des Budapest Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren am 20. September 1999 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt und mit der Zugangsnummer DSM 13049 bezeichnet.

**[0093]** Daher ist in einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung das erfindungsgemäße Polypeptid ein Polypeptid, das durch den für die Glucanotransferase kodierenden Teil der DNA-Sequenz kodiert wird, die in ein Plasmid kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 13049 vorhanden ist, oder einer Variante davon, die mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 96 %, mindestens 97 %, mindestens 98 %, oder mindestens 99 % Identität mit dem Polypeptid besitzt, das durch den für die Glucanotransferase kodierenden Teil der DNA-Sequenz kodiert wird, die in ein Plasmid kloniert ist, das in *Escherichia coli* DSM 13049 vorhanden ist.

**[0094]** Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann ein bakterielles Polypeptid sein. Z.B. kann das Polypeptid ein Gram-positives bakterielles Polypeptid sein, wie ein Polypeptid aus *Bacillus*, z.B. ein Polypeptid aus *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus laetus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus*

subtilis, oder *Bacillus thuringiensis*; oder ein Polypeptid aus *Streptomyces*, z.B. ein Polypeptid aus *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus*; oder ein Gram-negatives bakterielles Polypeptid, z.B. ein Polypeptid aus *E. coli* oder *Pseudomonas* sp..

**[0095]** Ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann ein Pilz-Polypeptid sein, und noch bevorzugter ein Hefe-Polypeptid, wie ein Polypeptid aus *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, oder *Yarrowia*; oder noch bevorzugter ein Polypeptid eines filamentösen Pilzes, wie ein Polypeptid aus *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* oder *Trichoderma*.

**[0096]** Stämme dieser Arten sind der Öffentlichkeit in einer Reihe von Kultursammlungen leicht zugänglich, so wie in der American Type Culture Collection (ATCC), Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelkulturen (CBS) und Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

**[0097]** Weiterhin können solche Polypeptide aus anderen Quellen, einschließlich Mikroorganismen, die aus der Natur isoliert werden (z.B. Erde, Kompost, Wasser, etc.) unter Verwendung der oben genannten Proben identifiziert und erhalten werden. Verfahren zum Isolieren von Mikroorganismen aus natürlichen Habitaten sind im Stand der Technik wohl bekannt. Die Nukleinsäuresequenz kann dann abgeleitet werden, indem mit einer genomischen oder cDNA-Bibliothek eines anderen Mikroorganismus auf ähnliche Weise ein „Screening“ durchgeführt wird. Sobald eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid kodiert, mit der/den Probe(n) nachgewiesen wurde, kann die Sequenz unter Verwendung von Techniken, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, isoliert oder kloniert werden (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, *supra*).

**[0098]** Polypeptide, die durch die Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung kodiert werden, schließen auch fusionierte Polypeptide oder spaltbare Fusions-Polypeptide ein, in denen ein anderes Polypeptid an den N-Terminus oder den C-Terminus des Polypeptids oder eines Fragments davon fusioniert ist. Ein fusioniertes Polypeptid wird durch Fusionieren einer Nukleinsäuresequenz (oder eines Teils davon), die für ein anderes Polypeptid kodiert, an eine Nukleinsäuresequenz (oder einen Teil davon) der vorliegenden Erfindung hergestellt. Techniken, um Fusions-Polypeptide herzustellen, sind im Stand der Technik bekannt und schließen eine Ligation der kodierenden Sequenzen ein, die für die Polypeptide kodieren, so dass sie im Leserahmen sind, und so dass die Expression des fusionierten Polypeptids unter der Kontrolle des/der selben Promotor(en) und Terminators ist.

#### Nukleinsäuresequenzen

**[0099]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung nach den Ansprüchen 1 bis 11 kodieren.

**[0100]** Die Techniken, die verwendet werden, um eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid kodiert, zu isolieren oder klonieren, sind im Stand der Technik bekannt und schließen Isolierung von genomischer DNA, Präparation von cDNA oder eine Kombination davon ein. Das Klonieren der Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung aus einer solchen genomischen DNA kann z.B. durch die Verwendung der gut bekannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder einem Antikörper-Screening von Expressionsbibliotheken erreicht werden, um klonierte DNA-Fragmente mit gemeinsamen strukturellen Merkmalen nachzuweisen. Siehe z.B. Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Andere Verfahrensweisen zur Vervielfältigung von Nukleinsäure, wie die Ligase-Kettenreaktion (LCR), ligierte aktivierte Transkription (LAT) und Nukleinsäuresequenz-basierte Vervielfältigung (NASBA) können verwendet werden. Die Nukleinsäuresequenz kann von einem Stamm von *Thermus rubens* ATCC 31556 oder einem anderen oder verwandten Organismus kloniert werden und kann, z.B., eine allelische oder Variante einer anderen Art der Polypeptid-kodierenden Region der Nukleinsäuresequenz sein.

**[0101]** Eine isolierte Nukleinsäuresequenz kann z.B. durch Standardverfahrensweisen des Klonierens erhalten werden, die in gentechnischen Verfahren verwendet werden, um die Nukleinsäuresequenz von ihrer natürlichen Lage an einen anderen Ort zu transferieren, wo sie reproduziert werden wird. Die Verfahrensweisen zum Klonieren können das Ausschneiden und Isolieren eines gewünschten Nukleinsäurefragments, welches die für das Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz umfasst, die Insertion des Fragments in ein Vektormolekül, und das Einbringen des rekombinanten Vektors in eine Wirtszelle, wo mehrere Kopien oder Klone der Nukleinsäuresequenz repliziert werden, beinhalten. Die Nukleinsäuresequenz kann genomischen, cDNA, RNA, se-

misynthetischen, synthetischen Ursprungs oder irgendeiner Kombination davon sein.

**[0102]** Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird der Grad an Identität zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wie oben beschrieben bestimmt.

**[0103]** Das Modifizieren einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, kann für die Synthese von Polypeptiden, die im Wesentlichen dem Polypeptid ähnlich sind, nötig sein. Der Begriff "im Wesentlichen ähnlich" dem Polypeptid bezieht sich auf nicht-natürlich vorkommende Formen des Polypeptids. Diese Polypeptide können sich in irgendeiner technisch veränderten Weise vom Polypeptid unterscheiden, das aus seiner natürlichen Quelle isoliert wurde, z.B. Varianten, die sich in spezifischer Aktivität, Thermostabilität, pH-Optimum oder ähnlichem unterscheiden. Die Sequenzvariante kann auf der Basis der Nukleinsäuresequenz konstruiert werden, die als der das Polypeptid kodierende Teil von SEQ ID NR. 1 gezeigt wird, z.B. eine Untersequenz davon, und/oder durch Einführen von Nukleotidsubstitutionen, die nicht zu einer anderen Aminosäuresequenz des Polypeptids führen, welches durch die Nukleinsäuresequenz kodiert wird, aber die der Codon-Verwendung des Wirtsorganismus entsprechen, der zur Herstellung des Enzyms beabsichtigt ist, oder durch Einführen von Nukleotidsubstitutionen, die zu einer verschiedenen Aminosäuresequenz führen können. Für eine allgemeine Beschreibung von Nukleotidsubstitution siehe z.B. Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2:95–107.

**[0104]** Es wird dem Fachmann offensichtlich sein, dass solche Substitutionen außerhalb der Regionen gemacht werden können, die entscheidend für die Funktion des Moleküls sind, und dennoch ein aktives Polypeptid zum Ergebnis haben. Aminosäurereste, die für die Aktivität des Polypeptids, das durch die isolierte Nukleinsäuresequenz der Erfindung kodiert wird, wesentlich sind und daher bevorzugter Weise keiner Substitution unterzogen werden, können gemäß im Stand der Technik bekannter Verfahren identifiziert werden, wie ortspezifische Mutagenese oder Alanin-Scanning-Mutagenese (siehe z.B. Cunningham und Wells, 1989, Science 244:1081–1085). In der letzteren Technik werden Mutationen an jedem positiv geladenen Rest im Molekül eingefügt, und die resultierenden mutierten Moleküle werden auf Glucanotransferase-Aktivität getestet, um Aminosäurereste zu identifizieren, die entscheidend für die Aktivität des Moleküls sind. Orte von Substrat-Enzym-Interaktion können auch durch Analyse der dreidimensionalen Struktur bestimmt werden, wie durch solche Techniken wie Kernmagnetresonanzanalyse, Kristallographie, oder Fotoaffinitäts-Markierung bestimmt (siehe z.B. de Vos et al., 1992, Science 255:306–312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899–904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309:59–64).

#### Nukleinsäurekonstrukte

**[0105]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nukleinsäurekonstrukte, die eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung umfassen, die funktionell mit einer oder mehreren Kontrollsequenzen verbunden ist, die die Fähigkeit besitzen, die Expression des Polypeptids in einem geeigneten Expressionswirt zu steuern.

**[0106]** Eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, kann in einer Vielzahl von Weisen manipuliert werden, um die Expression des Polypeptids zu gewährleisten. Eine Manipulation der Nukleinsäuresequenz vor ihrer Insertion in einen Vektor kann abhängig vom Expressionsvektor wünschenswert oder notwendig sein. Die Techniken, um Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung von Verfahren rekombinanter DNA zu modifizieren, sind im Stand der Technik gut bekannt.

**[0107]** Die Kontrollsequenzen schließen alle Komponenten ein, die für die Expression eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung notwendig oder vorteilhaft sind. Jede Kontrollsequenz kann nativ oder fremdartig zur Nukleinsäuresequenz sein, die das Polypeptid kodiert. Solche Kontrollsequenzen schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, einen „Leader“, Polyadenylierungssequenz, Propeptidsequenz, Promotor, Signalpeptidsequenz und Transkriptions-Terminator. Als Minimum schließen die Kontrollsequenzen einen Promotor und Transkriptions- und Translations-Stoppsignale ein. Die Kontrollsequenzen können zum Zweck des Einführens spezifischer Restriktionsschnittstellen mit Linkem versehen werden, die eine Ligation der Kontrollsequenzen mit der kodierenden Region der Nukleinsäuresequenz, die das Polypeptid kodiert, erleichtern.

**[0108]** Die Kontrollsequenz kann eine geeignete Promotorsequenz sein, eine Nukleinsäuresequenz, die durch eine Wirtszelle zur Expression der Nukleinsäuresequenz erkannt wird. Die Promotorsequenz enthält transkriptionale Kontrollsequenzen, die die Expression des Polypeptids vermitteln. Der Promotor kann irgendeine Nukleinsäuresequenz sein, die transkriptionale Aktivität in der gewählten Wirtszelle zeigt, einschließlich mutierter, trunkierter, und Hybrid-Promotoren, und kann von Genen, die für extrazelluläre oder intrazelluläre Polypeptide kodieren, die entweder homolog oder heterolog zur Wirtszelle sind, erhalten werden.

**[0109]** Beispiele von geeigneten Promotoren zur Steuerung der Transkription der Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung, besonders in einer bakteriellen Wirtszelle, sind die aus dem *E. coli lac* Operon erhaltenen Promotoren, *Streptomyces coelicolor* Agarase-Gen (*daga*A), *Bacillus subtilis* Levansucrase-Gen (*sacB*), *Bacillus licheniformis* Alpha-Amylase-Gen (*amyL*), *Bacillus stearothermophilus* maltogenes Amylase-Gen (*amyM*), *Bacillus amyloliquefaciens* Alpha-Amylase-Gen (*amyQ*), *Bacillus licheniformis* Penicillinase-Gen (*penP*), *Bacillus subtilis* *xylA* und *xylB* Gene, und prokaryotisches Beta-Lactamase-Gen (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3727–3731) und der tac-Promotor (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21–25). Weitere Promotoren sind in "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74–94; und in Sambrcok et al., 1989, supra, beschrieben.

**[0110]** Beispiele für geeignete Promotoren, um die Transkription der Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung in einer Wirtszelle eines filamentösen Pilzes zu steuern, sind Promotoren, die erhalten werden aus den Genen für *Aspergillus oryzae* TAKA-Amylase, *Rhizomucor miehei* Aspartylproteinase, *Aspergillus niger* neutrale alpha-Amylase, *Aspergillus niger* saure stabile alpha-Amylase, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori* Glucoamylase (*glaA*), *Rhizomucor miehei* Lipase, *Aspergillus oryzae* alkalische Protease, *Aspergillus oryzae* Triosephosphat isomerase, *Aspergillus nidulans* Acetamidase und *Fusarium oxysporum* Trypsin-artige Protease (WO 96/00787), und der NA2-tpi-Promotor (ein Hybrid der Promotoren von den Genen für *Aspergillus niger* neutrale alpha-Amylase und *Aspergillus oryzae* Triosephosphat isomerase), und mutierte, trunkierte und Hybrid-Promotoren davon.

**[0111]** In einem Hefewirt werden verwendbare Promotoren aus den Genen erhalten für *Saccharomyces cerevisiae* Enolase (ENO-1), *Saccharomyces cerevisiae* Galactokinase (GAL1), *Saccharomyces cerevisiae* Alkoholdehydrogenase/Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (ADH2/GAP) und *Saccharomyces cerevisiae* 3-Phosphoglyceratkinase. Andere verwendbare Promotoren für Hefewirtszellen werden in Romanos et al., 1992, Yeast 8:423–488, beschrieben.

**[0112]** Die Kontrollsequenz kann auch eine geeignete Transkriptions-Terminatorsequenz sein, eine Sequenz, die durch eine Wirtszelle erkannt wird, um die Transkription zu beenden. Die Terminatorsequenz ist funktionell verbunden mit dem 3'-Terminus der Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid kodiert. Jeder Terminator, der in der gewählten Wirtszelle funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0113]** Bevorzugte Terminatoren für Wirtszellen filamentöser Pilze werden erhalten von den Genen für *Aspergillus oryzae* TAKA-Amylase, *Aspergillus niger* Glucoamylase, *Aspergillus nidulans* Anthranilatsynthase, *Aspergillus niger* Alpha-Glucosidase und *Fusarium oxysporum* Trypsin-artige Protease.

**[0114]** Bevorzugte Terminatoren für Hefewirtszellen werden erhalten von den Genen für *Saccharomyces cerevisiae* Enolase, *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrom C (CYC1), und *Saccharomyces cerevisiae* Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Andere nützliche Terminatoren für Hefewirtszellen werden in Romanos et al., 1992, supra, beschrieben.

**[0115]** Die Kontrollsequenz kann auch eine geeignete Leader-Sequenz sein, eine nicht-translatierte Region einer mRNA, die für die Translation durch die Wirtszelle wichtig ist. Die Leader-Sequenz ist funktionell verbunden mit dem 5'-Terminus der Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid kodiert. Jede Leader-Sequenz, die in der gewählten Wirtszelle funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0116]** Bevorzugte „Leader“ für Wirtszellen filamentöser Pilze werden von den Genen für *Aspergillus oryzae* TAKA-Amylase und *Aspergillus nidulans* Triosephosphat isomerase erhalten. Geeignete Leader für Hefewirtszellen werden erhalten von den Genen für *Saccharomyces cerevisiae* Enolase (ENO-1), *Saccharomyces cerevisiae* 3-Phosphoglyceratkinase, *Saccharomyces cerevisiae* alpha-Faktor, und *Saccharomyces cerevisiae* Alkoholdehydrogenase/Glycinraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (ADH2/GAP).

**[0117]** Die Kontrollsequenz kann auch eine Polyadenylierungssequenz sein, eine Sequenz, die mit dem 3'-Terminus der Nukleinsäuresequenz funktionell verbunden ist und die, wenn sie transkribiert wird, von der Wirtszelle als ein Signal erkannt wird, Polyadenosinreste zur transkribierten mRNA hinzuzufügen. Jede Polyadenylierungssequenz, die in der gewählten Wirtszelle funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0118]** Bevorzugte Polyadenylierungssequenzen für Wirtszellen filamentöser Pilze werden erhalten von den Genen für *Aspergillus oryzae* TAKA-Amylase, *Aspergillus niger* Glucoamylase, *Aspergillus nidulans* Anthranil-

latsynthase, *Fusarium oxysporum* Trypsin-artige Protease, und *Aspergillus niger* alpha-Glucosidase.

**[0119]** Verwendbare Polyadenylierungssequenzen für Hefewirtszellen werden durch Guo und Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15:5983–5990, beschrieben.

**[0120]** Die Kontrollsequenz kann auch eine Signalpeptid kodierende Region sein, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die mit dem Amino-Terminus eines Polypeptids verbunden ist und das kodierte Polypeptid in den sekretorischen Weg der Zelle steuert. Das 5'-Ende der kodierenden Sequenz der Nukleinsäuresequenz kann inhärent eine Signalpeptid kodierende Region enthalten, die auf natürliche Weise im Leserahmen der Translation mit dem Segment der kodierenden Region verbunden ist, die das sezernierte Polypeptid kodiert. Alternativ kann das 5'-Ende der kodierenden Sequenz eine Signalpeptid-kodierende Region enthalten, die fremdartig zur kodierenden Sequenz ist. Die fremdartige Signalpeptid kodierende Region kann notwendig sein, wo die kodierende Sequenz nicht natürlicherweise eine Signalpeptid kodierende Region enthält. Alternativ kann die fremdartige Signalpeptid-kodierende Region einfach die natürliche Signalpeptid-kodierende Region ersetzen, um die Sekretion des Polypeptids zu erhöhen. Jedoch kann irgendeine Signalpeptid-kodierende Region, die das exprimierte Polypeptid in den sekretorischen Weg einer gewählten Wirtszelle steuert, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0121]** Wirksame Signalpeptid-kodierende Regionen für bakterielle Wirtszellen sind die Signalpeptid-kodierenden Regionen, die aus den Genen erhalten werden für *Bacillus NCIB 11837* maltogener Amylase, *Bacillus stearothermophilus alpha*.Amylase, *Bacillus licheniformis* Subtilisin, *Bacillus licheniformis* beta-Lactamase, *Bacillus stearothermophilus* neutrale Proteasen (nprT, nprS, nprM, und *Bacillus subtilis* prsA). Weitere Signalpeptide werden in Simonen und Palva, 1993, Microbiological Reviews 57:109–137, beschrieben.

**[0122]** Wirksame Signalpeptid-kodierende Regionen für Wirtszellen filamentöser Pilze sind die Signalpeptid-kodierenden Regionen erhalten aus den Genen für *Aspergillus oryzae* TAKA Amylase, *Aspergillus niger* neutrale Amylase, *Aspergillus niger* Glucoamylase, *Rhizomucor miehei* Aspartylproteinase, *Humicola insolens* Cellulase, und *Humicola lanuginosa* Lipase.

**[0123]** Verwendbare Signalpeptide für Hefewirtszellen werden aus den Genen für *Saccharomyces cerevisiae* alpha-Faktor und *Saccharomyces cerevisiae* Invertase erhalten. Andere verwendbare Signalpeptid-kodierende Regionen werden in Romanos et al., 1992, supra, beschrieben.

**[0124]** Die Kontrollsequenz kann auch eine Propeptid-kodierende Region sein, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, die sich am Amino-Terminus eines Polypeptids befindet. Das sich ergebende Polypeptid ist als ein Proenzym oder Propolypeptid (oder ein Zymogen in manchen Fällen) bekannt. Ein Propolypeptid ist generell inaktiv und kann in ein reifes aktives Polypeptid durch katalytische oder autokatalytische Spaltung des Propeptids vom Propolypeptid umgewandelt werden. Die Propeptid-kodierende Region kann erhalten werden aus den Genen für *Bacillus subtilis* alkaliner Protease (aprE), *Bacillus subtilis* neutrale Protease (nprT), *Saccharomyces cerevisiae* alpha-Faktor, *Rhizomucor miehei* Aspartylproteinase, und *Myceliophthora thermophila* Laccase (WO 95/33836).

**[0125]** Dort wo sowohl Signalpeptid- und Propeptid-Regionen am Amino-Terminus eines Polypeptids vorhanden sind, wird die Propeptid-Region neben den Amino-Terminus eines Polypeptids positioniert und die Signalpeptid-Region wird neben den Amino-Terminus der Propeptid-Region positioniert.

**[0126]** Es kann auch wünschenswert sein, regulatorische Sequenzen hinzuzufügen, die die Regulation der Expression des Polypeptids in Abhängigkeit vom Wachstum der Wirtszelle erlauben. Beispiele für regulatorische Systeme sind solche, die die Expression des Gens bewirken, das als Antwort auf einen chemischen oder physikalischen Reiz an- oder abzuschalten ist, einschließlich der Anwesenheit einer regulatorischen Substanz. Regulatorische Systeme in prokaryotischen Systemen schließen die lac, tac und trp Operatorsysteme ein. In Hefe kann das ADH2-System oder GAL1-System verwendet werden. In filamentösen Pilzen können der TAKA alpha-Amylase-Promotor, *Aspergillus niger* Glucoamylase-Promotor, und *Aspergillus oryzae* Glucoamylase-Promotor als regulatorische Sequenzen verwendet werden. Andere Beispiele von regulatorischen Sequenzen sind die, die eine Genvervielfältigung erlauben. In eukaryotischen Systemen schließen diese das Dihydrofolat-Reduktase-Gen ein, welches in Gegenwart von Methotrexat vervielfältigt wird, und die Metallothionein-Gene, die mit Schwermetallen vervielfältigt werden. In diesen Fällen wäre die Nukleinsäuresequenz, die das Polypeptid kodiert, mit der regulatorischen Sequenz funktionell verbunden.

## Expressionsvektoren

**[0127]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung, einen Promotor, und Transkriptions- und Translations-Stoppsignale umfassen. Die verschiedenen oben beschriebenen Nukleinsäure- und Kontrollsequenzen können zusammengefügt werden, um einen rekombinanten Expressionsvektor herzustellen, der eine oder mehrere zweckmäßige Restriktionsschnittstellen einschließen kann, um die Insertion oder Substitution der Nukleinsäuresequenz, die das Polypeptid kodiert, an solchen Stellen zu ermöglichen. Alternativ kann die Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung durch Insertion der Nukleinsäuresequenz oder eines Nukleinsäurekonstrukts, das die Sequenz enthält, in einen zur Expression geeigneten Vektor exprimiert werden. Beim Erschaffen des Expressionsvektors befindet sich die kodierende Sequenz im Vektor so, dass die kodierende Sequenz funktionell mit den geeigneten Kontrollsequenzen zur Expression verbunden ist.

**[0128]** Der rekombinante Expressionsvektor kann irgendein Vektor sein (z.B. ein Plasmid oder Virus), der zweckmäßigerweise rekombinanten DNA-Verfahrensweisen unterworfen werden kann, und die Expression der Nukleinsäuresequenz bewirken kann. Die Wahl des Vektors hängt typischerweise von der Kompatibilität des Vektors mit der Wirtszelle, in die der Vektor eingeführt werden soll, ab. Die Vektoren können lineare oder geschlossen zirkuläre Plasmide sein.

**[0129]** Der Vektor kann ein autonom replizierender Vektor sein, d.h. ein Vektor, der als extrachromosomalie Einheit existiert, dessen Replikation unabhängig von chromosomaler Replikation ist, z.B. ein Plasmid, ein extrachromosomalies Element, ein Minichromosom, oder ein künstliches Chromosom. Der Vektor kann jedes beliebige Mittel enthalten, um Selbst-Replikation sicherzustellen. Alternativ kann der Vektor ein solcher sein, der, wenn er in die Wirtszelle eingeführt wird, in das Genom integriert wird und zusammen mit dem/den Chromosom(en), in das/die er integriert wurde, repliziert wird. Weiterhin können ein einzelner Vektor oder Plasmid oder zwei oder mehrere Vektoren oder Plasmide, die zusammen die gesamte DNA enthalten, die in das Genom der Wirtszelle eingeführt werden soll, oder ein Transposon, verwendet werden.

**[0130]** Die Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise einen oder mehrere selektierbare Marker, die eine leichte Selektion von transformierten Zellen erlauben. Ein selektierbarer Marker ist ein Gen, dessen Produkt eine Biozid- oder Virenresistenz, Resistenz gegen Schwermetalle, Prototrophie für Auxotrophie, und ähnliches ermöglicht. Beispiele für bakterielle selektierbare Marker sind die dal Gene von *Bacillus subtilis* oder *Bacillus licheniformis*, oder Marker, die Antibiotika-Resistenz so wie Ampicillin-, Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyclin-Resistenz verleihen. Geeignete Marker für Hefewirtszellen sind ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, und URA3. Selektierbare Marker zur Verwendung in einer Wirtszelle eines filamentösen Pilzes schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf, amdS (Acetamidase), argB (Ornithin-Carbamoyltransferase), bar (Phosphinothricin-Acetyltransferase), hygB (Hygromycin-Phosphotransferase), niaD (Nitrat-reduktase), pyrG (Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase), sC (Sulfat-Adenyltransferase), trpC (Anthraniatsynthase), sowie Äquivalente davon. Bevorzugt für die Verwendung in einer *Aspergillus*-Zelle sind die amdS- und pyrG-Gene von *Aspergillus nidulans* oder *Aspergillus oryzae* und das bar-Gen von *Streptomyces hygroscopicus*.

**[0131]** Die Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten bevorzugter Weise ein Element(e), das eine stabile Integration des Vektors in das Genom der Wirtszelle erlaubt oder autonome Replikation des Vektors in der Zelle unabhängig vom Genom.

**[0132]** Zur Integration in das Wirtszellgenom kann der Vektor auf die Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid kodiert, oder auf irgendein anderes Element des Vektors zur stabilen Integration des Vektors in das Genom durch homologe oder nicht-homologe Rekombination angewiesen sein. Alternativ kann der Vektor zusätzliche Nukleinsäuresequenzen enthalten, um die Integration durch homologe Rekombination in das Genom der Wirtszelle zu steuern. Die zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen ermöglichen es dem Vektor, in das Wirtszellgenom an einer genauen Stelle(n) in dem/den Chromosomen) integriert zu werden. Um die Wahrscheinlichkeit einer Integration an einer genauen Stelle zu erhöhen, sollten die zur Integration gehörigen Elemente bevorzugter Weise eine ausreichende Zahl von Nukleinsäuren enthalten, wie 100 bis 1500 Basenpaare, bevorzugter Weise 400 bis 1500 Basenpaare und am meisten bevorzugt 800 bis 1500 Basenpaare, die stark homolog mit der korrespondierenden Zielsequenz sind, um die Wahrscheinlichkeit homologer Rekombination zu erhöhen. Die zur Integration gehörigen Elemente können eine beliebige Sequenz sein, die zur Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homolog ist.

**[0133]** Weiterhin können die zur Integration gehörigen Elemente nicht-kodierende oder kodierende Nuklein-

säuresequenzen sein. Auf der anderen Seite kann der Vektor in das Genom der Wirtszelle durch nicht-homologe Rekombination integriert werden.

**[0134]** Für autonome Replikation kann der Vektor weiterhin einen Replikationsursprung umfassen, der den Vektor befähigt, autonom in der fraglichen Wirtszelle zu replizieren. Beispiele von bakteriellen Replikationsursprüngen sind die Replikationsursprünge der Plasmide pBR322, pUC19, pACYC177, und pACYC184, die eine Replikation in *E. coli* erlauben, und pUB110, pE194, pTA1060, und pAMβ1, die eine Replikation in *Bacillus* erlauben. Beispiele für Replikationsursprünge zur Verwendung in einer Hefewirtszelle sind der 2 Micron-Replikationsursprung, ARS1, ARS4, die Kombination von ARS1 und CEN3, und die Kombination von ARS4 und CEN6. Der Replikationsursprung kann einer sein, der eine Mutation besitzt, die sein Funktionieren in der Wirtszelle temperatursensitiv macht (siehe z.B. Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1433).

**[0135]** Mehr als eine Kopie einer Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung kann in die Wirtszelle inseriert werden, um die Herstellung des Genprodukts zu erhöhen. Ein Erhöhen der Kopienzahl der Nukleinsäuresequenz kann erreicht werden, indem mindestens eine zusätzliche Kopie der Sequenz in das Wirtszellgenom integriert wird, oder indem ein vermehrbares selektierbares Markergen mit der Nukleinsäuresequenz eingeschlossen wird, wo Zellen, die vermehrte Kopien des selektierbaren Markergens und dadurch zusätzliche Kopien der Nukleinsäuresequenz enthalten, durch Kultivieren der Zellen in Gegenwart des geeigneten Selektionsmittels selektiert werden können.

**[0136]** Die Verfahrensweisen, die verwendet werden, um die oben beschriebenen Elemente zu ligieren, um die rekombinanten Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung zu konstruieren, sind dem Fachmann gut bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, supra).

#### Wirtszellen

**[0137]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz umfassen, die in vorteilhafter Weise zur rekombinanten Herstellung der Polypeptide benutzt werden.

**[0138]** Ein Vektor, der eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung umfasst, wird in eine Wirtszelle so eingeführt, dass der Vektor als ein chromosomales Integrationsteil oder als ein selbst-replizierender extrachromosomaler Vektor wie vorhin beschrieben erhalten wird. Die Wahl einer Wirtszelle wird zu einem großen Teil vom Gen, welches das Polypeptid kodiert, und seiner Quelle abhängen.

**[0139]** Die Wirtszelle kann ein einzelliger Mikroorganismus sein, z.B. ein Prokaryot, oder ein nicht-einzelliger Mikroorganismus, z.B. ein Eukaryot.

**[0140]** Verwendbare einzellige Zellen sind Bakterienzellen, wie Gram-positive Bakterien, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, eine Zelle von *Bacillus*, z.B. *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus laetus*, *Bacillus lenthus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus thuringiensis*; oder eine Zelle von *Streptomyces*, z.B. *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus*, oder Gram-negative Bakterien, wie *E. coli* und *Pseudomonas* sp. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die bakterielle Wirtszelle eine Zelle von *Bacillus lenthus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, oder *Bacillus subtilis*. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die *Bacillus*-Zelle ein alkalophiler *Bacillus*.

**[0141]** Das Einführen eines Vektors in eine bakterielle Wirtszelle kann z.B. durch Protoplastentransformation ausgeführt werden (siehe z.B. Chang und Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168:111–115), unter Verwendung kompetenter Zellen (siehe z.B. Young und Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81:823–829, oder Dubnau und Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56:209–221), Elektroporation (siehe z.B. Shigekawa und Dower, 1988, Biotechniques 6:742–751) oder Konjugation (siehe z.B. Koehler und Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169:5771–5278).

**[0142]** Die Wirtszelle kann ein Eukaryot sein, wie eine Säuger-, Insekten-, Pflanzen- oder Pilzzelle. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle eine Pilzzelle. "Pilz", wie hierin verwendet, schließt die Stämme, Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, und Zygomycota (wie definiert durch Hawksworth et al., In: Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8. Ausgabe, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) sowie die Oomycota (wie zitiert in Hawksworth et al., 1995, supra, Seite 171) und alle Mitospo-

ren-Pilze (Hawksworth et al., 1995, *supra*) ein.

**[0143]** Pilzzellen können durch ein Verfahren, das eine Bildung von Protoplasten, eine Transformation der Protoplasten und Regeneration der Zellwand beinhaltet, in einer an sich bekannten Weise transformiert werden. Geeignete Verfahrensweisen für die Transformation von *Aspergillus*-Wirtszellen werden in EP 238 023 und Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470–1474 beschrieben. Geeignete Verfahren, um *Fusarium*-Arten zu transformieren, werden von Malardier et al., 1989, *Gene* 78:147–156 und WO 96/00787 beschrieben. Hefe kann transformiert werden unter Verwendung der Verfahrensweisen beschrieben von Becker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., Hrsg., *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Band 194, Seiten 182–187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; und Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

#### Verfahren zur Herstellung

**[0144]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung, wobei das Verfahren umfasst (a) Kultivieren eines Stammes der Gattung *Thermus*, um einen Überstand herzustellen, der das Polypeptid umfasst; und (b) Gewinnen des Polypeptids. Bevorzugterweise gehört der Stamm zur Art *Thermus rubens*, und noch bevorzugter *Thermus rubens* ATCC 31556.

**[0145]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei das Verfahren umfasst (a) Kultivieren einer rekombinanten Wirtszelle wie oben beschrieben unter Bedingungen, die der Herstellung des Polypeptids förderlich sind, und (b) Gewinnen des Polypeptids aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium.

**[0146]** In den Herstellungsverfahren der vorliegenden Erfindung werden die Zellen in einem Nährmedium kultiviert, das geeignet für die Herstellung des Polypeptids ist, unter Verwendung von Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind. Zum Beispiel kann die Zelle in Schüttelflaschenkultur, Fermentation in kleinem oder großem Maßstab (einschließlich kontinuierlicher, „Batch-“, „Fed-Batch-“ oder Festphasenfermentationen) in Labor- oder Industriefermentatoren kultiviert werden, durchgeführt in einem geeigneten Medium und unter Bedingungen, die es erlauben, dass das Polypeptid exprimiert und/oder isoliert wird. Das Kultivieren wird in einem geeigneten Nährmedium durchgeführt, das Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze umfasst, unter Verwendung von Verfahrensweisen, die im Stand der Technik bekannt sind. Geeignete Medien sind von gewerblichen Lieferanten erhältlich oder können gemäß veröffentlichter Zusammensetzungen zubereitet werden (z.B. in Katalogen der American Type Culture Collection). Wenn das Polypeptid in das Nährmedium sezerniert wird, kann das Polypeptid direkt aus dem Medium gewonnen werden. Wenn das Polypeptid nicht sezerniert wird, kann es aus Zellsäften gewonnen werden.

**[0147]** Die Polypeptide können unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren nachgewiesen werden, die für die Polypeptide spezifisch sind. Diese Nachweisverfahren können die Verwendung von spezifischen Antikörpern, die Bildung eines Enzymprodukts, oder Verschwinden eines Enzymsubstrats einschließen. Zum Beispiel kann ein Enzym-Assay verwendet werden, um die Aktivität des Polypeptids wie hierin beschrieben zu bestimmen.

**[0148]** Das resultierende Polypeptid kann durch im Stand der Technik bekannte Verfahren gewonnen werden. Zum Beispiel kann das Polypeptid aus dem Nährmedium durch konventionelle Verfahrensweisen gewonnen werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Zentrifugation, Filtration, Extraktion, Sprühtrocknen, Verdampfen, oder Fällung.

**[0149]** Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können durch eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahrensweisen gereinigt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Chromatographie (z.B. Ionenaustauscher, Affinität, hydrophob, Chromatofokussierung und Größenausschluß), elektrophoretische Verfahrensweisen (z.B. präparatives isoelektrisches Fokussieren), unterschiedliche Löslichkeit (z.B. Ammoniumsulfatfällung), SDS-PAGE, oder Extraktion (siehe, z.B. *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, Herausgeber, VCH Publishers, New York, 1989).

#### Pflanzen

**[0150]** Das Polypeptid kann aus der Pflanze oder dem Pflanzenteil gewonnen werden. Alternativ können die Pflanze oder der Pflanzenteil, die das rekombinante Polypeptid enthalten, als solche verwendet werden, um

die Qualität eines Nahrungsmittels oder Futtermittels zu verbessern, z.B. um den Nährwert, Schmackhaftigkeit und rheologische Eigenschaften zu verbessern, oder um einen der Nahrhaftigkeit schadenden („antinutritive“) Faktor zu zerstören.

**[0151]** Die transgene Pflanze kann zweikeimblättrig (ein Dikotyledon) oder einkeimblättrig (ein Monokotyledon) sein. Beispiele für einkeimblättrige Pflanzen sind Gräser wie Wiesengras (Rispengras, *Poa*), Futtergras wie *Festuca*, *Lolium*, Gras temperater Regionen wie *Agrostis*, and Getreide, z.B. Weizen, Hafer, Roggen, Gerste, Reis, Hirse, and Mais (corn).

**[0152]** Beispiele für zweikeimblättrige Pflanzen sind Tabak, Leguminosen wie Lupinen, Kartoffel, Zuckerrübe, Erbse, Bohne und Sojabohne, und Kreuzblütler (Familie Brassicaceae), wie Blumenkohl, Rapssamen, und der eng verwandte Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*.

**[0153]** Beispiele für Pflanzenteile sind Stamm, Callus, Blätter, Wurzel, Früchte, Samen, und Knollen. Auch spezifische Pflanzengewebe wie Chloroplast, Apoplast, Mitochondrien, Vakuole, Peroxisomen, und Cytoplasma werden als ein Pflanzenteil betrachtet. Weiterhin wird jede Pflanzenzelle, egal welchen Gewebeursprungs, als ein Pflanzenteil betrachtet. Die transgene Pflanze oder Pflanzenzelle, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimiert, kann gemäß im Stand der Technik bekannter Verfahren hergestellt werden. Kurz gesagt wird die Pflanze oder Pflanzenzelle durch Inkorporation eines oder mehrerer Expressionskonstrukte, die für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodieren, in das Wirtsgenom der Pflanze, und durch Vermehrung der resultierenden modifizierten Pflanze oder Pflanzenzelle zu einer transgenen Pflanze oder Pflanzenzelle hergestellt. Zweckmäßigerweise ist das Expressionskonstrukt ein Nukleinsäurekonstrukt, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, funktionell verbunden mit geeigneten regulatorischen Sequenzen, die für die Expression der Nukleinsäuresequenz in der Pflanze oder dem Pflanzenteil der Wahl benötigt werden. Weiterhin kann das Expressionskonstrukt einen selektierbaren Marker enthalten, der verwendbar zur Identifikation von Wirtszellen ist, in die das Expressionskonstrukt integriert wurde, und DNA-Sequenzen, die zur Einführung des Konstrukt in die fragliche Pflanze notwendig sind (Letzteres hängt vom zu verwendenden DNA-Einführungsverfahren ab). Die Wahl der regulatorischen Sequenzen, wie Promotor- und Terminatorsequenzen und gegebenenfalls Signal- oder Transitsequenzen wird zum Beispiel auf der Basis davon bestimmt, wann, wo, and wie das Polypeptid zu exprimieren gewünscht wird. Zum Beispiel kann die Expression des Gens, das für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, konstitutiv oder induzierbar sein, oder kann entwicklungs-, stadiums- oder gewebespezifisch sein, und das Genprodukt kann gezielt auf ein spezifisches Gewebe oder Pflanzenteil wie Samen oder Blätter gerichtet werden. Regulatorische Sequenzen werden zum Beispiel von Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86:506 beschrieben.

**[0154]** Für konstitutive Expression kann der 35S-CaMV Promotor benutzt werden (Franck et al., 1980, *Cell* 21:285–294). Organspezifische Promotoren können zum Beispiel Promotoren von „Sink“-Speichergeweben wie Samen, Kartoffelknollen und Früchten sein (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24:275–303), oder von „Sink“-Stoffwechselgeweben wie Meristeme (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24:863–878); ein samenspezifischer Promotor so wie der Glutelin, Prolamin, Globulin, or Albumin-Promotor aus Reis (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39:885–889), ein *Vicia faba*-Promotor aus dem Legumin B4 und das unbekannte Samenprotein-Gen aus *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152:708–711), ein Promotor eines Samen-Ölkörperproteins (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39:935–941), der Speicherprotein-napA-Promotor von *Brassica napus*, oder irgendein anderer im Stand der Technik bekannter samenspezifischer Promotor, z.B. wie beschrieben in WO 91/14772. Weiterhin kann der Promotor ein blattspezifischer Promotor so wie der rbcs-Promotor aus Reis oder Tomate (Kyozuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991–1000), der Chlorellavirus Adeninmethyltransferase-Gen Promotor (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85–93), oder der aldP-Gen Promotor aus Reis (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668–674), oder ein wundinduzierbarer Promotor so wie der pin2-Promotor aus Kartoffel (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573–588) sein.

**[0155]** Ein Promotor-Verstärkerelement kann auch benutzt werden, um eine höhere Expression des Enzyms in der Pflanze zu erreichen. Zum Beispiel kann das Promotor-Verstärkerelement ein Intron sein, das zwischen den Promotor und die Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung kodiert, platziert wird. Zum Beispiel offenbaren Xu et al., 1993, supra die Verwendung des ersten Introns des Reis-Actin 1-Gens, um die Expression zu verstärken.

**[0156]** Das selektierbare Markergen und jede beliebigen anderen Teile des Expressionskonstrukt können aus denen ausgewählt werden, die im Stand der Technik bekannt sind.

**[0157]** Das Nukleinsurekonstrukt wird in das Pflanzengenom inkorporiert gemäß konventioneller im Stand der Technik bekannter Techniken, einschließlich Agrobacterium-vermittelter Transformation, Virus-vermittelter Transformation, Mikroinjektion, Partikelbeschuss, biolistischer Transformation und Elektroporation (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

**[0158]** Zur Zeit ist Agrobacterium tumefaciens-vermittelter Gentransfer das Verfahren der Wahl, um transgene Dikotyledonen herzustellen (als Review, siehe Hooykaas und Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15–38). Es kann jedoch auch benutzt werden, um Monokotyledonen zu transformieren, obwohl andere Transformationsverfahren für diese Pflanzen generell bevorzugt werden. Zur Zeit ist Partikelbeschuss von embryonischen Calli oder sich entwickelnden Embryos das Verfahren der Wahl, um transgene Monokotyledonen zu generieren (mikroskopische Gold- oder Wolframpartikel, beschichtet mit der transformierenden DNA) (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275–281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158–162; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667–674). Ein alternatives Verfahren, um Monokotyledonen zu transformieren, basiert auf Protoplasten-Transformation wie durch Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415–428 beschrieben.

**[0159]** Auf die Transformation folgend werden die Transformanden, die das Expressionskonstrukt darin inkorporiert haben, ausgewählt zu ganzen Pflanzen regeneriert gemäß im Stand der Technik gut bekannter Verfahren.

**[0160]** Die vorliegenden Erfindung wird weiterhin durch die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele erläutert.

#### MATERIAL UND METHODEN

**[0161]** Molekulare Klonierungstechniken werden in J. Sambrook, E.F. Fritsch, und T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben.

**[0162]** Die folgenden im Handel erhältlichen Plasmide/Vektoren wurden verwendet: pT7 Blue (Invitrogen, Niederlande) und pBAD/Myc-HisB (Invitrogen, Niederlande).

**[0163]** Die folgenden Stämme wurden zur Transformation und Proteinexpression verwendet: *E. coli* DH12S (GIBCO BRL, Life Technologies, U.S.A.).

**[0164]** Chemikalien, die als Puffer und Substrate verwendet wurden, waren im Handel erhältliche Produkte von mindestens Reagenzgrad.

#### Bestimmung der Glucanotransferase-Aktivität

**[0165]** Glucanotransferase-Aktivität wurde nach einer modifizierten Version des Verfahrens bestimmt, das von Takaha et al. in *J. Biol. Chem.* 268, 1391–1396 (1993) beschrieben wird:

Substratlösung:

1 % (Gew./Vol.) altotriose gelöst in 20 mM Natriumphosphat, eingestellt auf pH 7.0.

Aktivitätsmessung:

- (1) Vorinkubieren von 300 ml Substratlösung bei 65°C.
- (2) 50 ml der Enzymlösung zufügen und bei 65°C für 10 Minuten inkubieren.
- (3) 50 ml 0.04 N NaOH zufügen, um die Reaktion zu beenden.
- (4) Die Lösung bei Raumtemperatur für 10 Minuten stehenlassen, um die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucoseanomere ein Gleichgewicht erreichen zu lassen.
- (5) Die Menge an freigesetzter Glucose mit dem Glucose B-Testkit bestimmen (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan).

**[0166]** Eine Einheit Enzymaktivität wird als die Menge an Enzym definiert, die 1  $\mu$ mol Glukose pro Minute unter den oben genannten Bedingungen freisetzt.

## BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung einer *Thermus rubens* Glucanotransferase-Genprobe

**[0167]** Die Primer gt-1 and gt-5 wurden basierend auf den anderen publizierten Glucanotransferase-Genen entworfen und in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA von *Thermus rubens* verwendet. Die oben genannten Glucanotransferase-Gene wurden identifiziert in Glucanotransferasen aus: *Solanum tuberosum*, Zugangsnummer (AC) q06801: *J. Biol. Chem.* 268, 1391–1396 (1993); *Clostridium butyricum* NCIMB7423, AC 137384: *Microbiology* 143(10), 3287–3294 (1997); *Escherichia coli* K-12, AC p15977: *Mol. Microbiol.* 2, 473–479 (1988); *Homo sapiens*, AC p35573: *J. Biol. Chem.* 267, 9294–9299 (1992); *Haemophilus influenzae*, AC p45176: *Science* 269, 496–512 (1995); *Streptococcus pneumoniae*, AC p29851: *Cell* 31, 327–336 (1982); *Synechocystis* SP. AC p72785: *DNA Res.* 3, 109–136 (1996); *Thermus aquaticus*, AC AB016244: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 910–915 (1999); und *Borrelia burgdorferi*, AC AE001127: *Nature* 390, 580–586 (1997).

## PCR-Primer:

gt-1: 5'-GGI GAY ATI CCI ATH TAY RTI GS-3'  
gt-5: 5'-RTT RTC RTG IGT ICC IGT RTA-3'

I = Inosin  
R = A oder G  
Y = C oder T  
H = A oder T oder C  
H = G oder C

**[0168]** Die PCR wurde durchgeführt unter den folgenden Bedingungen:

70 µl H<sub>2</sub>O  
10 µl 10 × Reaktionspuffer  
15 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 µl Taq-Polymerase (Boehringer)  
2 µl 25 mM dNTPs  
1 µl Template (> 1 µg)

Schritt 1:	94°C, 75 sec.
Schritt 2:	94°C, 45 sec.
Schritt 3:	52°C, 45 sec.
Schritt 4:	72°C, 90 sec.
(Schritt 2–4: 31 Zyklen)	
Schritt 5:	72°C, 180 sec.

**[0169]** Das PCR-Reaktionsgemisch wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, und die erwartete Größe der amplifizierten PCR-Fragmente wurde aus den anderen publizierten Sequenzdaten berechnet (siehe die obigen Referenzen), was etwa 600 bp zum Ergebnis hatte. Diese Fragmente wurden mit SuprecTM-01(TAKARA) auf einem Gel gereinigt, dann in einen pT7Blue-Vektor unter Verwendung des Takara-Ligationskits ver. 2 ligiert. Das Ligationsgemisch wurde durch Elektroporation in *E. coli* DH12S transformiert. Das Plasmid aus dem erhaltenen Transformanden wurde durch Restriktionsenzymverdau kontrolliert, um die Größe des *Thermus rubens* Glucanotransferase-Inserts zu bestätigen.

Beispiel 2: Klonieren des *Thermus rubens* Glucanotransferase Gens

**[0170]** Unter Verwendung des insertierten Fragments als eine *Thermus rubens* Glucanotransferase-Probe wurde eine Southern-Hybridisierung mit verdauter genomischer DNA von *Thermus rubens* durchgeführt, um geeignete Restriktionsenzyme zum Erstellen von Subklonen auszuwählen. Ein hybridisiertes Kpn I- und Sac II-Fragment von 1.8 kb und ein hybridisiertes Sca I and Kpn-Fragment von 1.6 kb wurden für Glucanotransferase-Gen Subklone ausgewählt. Genomische DNA von *Thermus rubens* wurde jeweils einzeln mit Kpn I- Sac II and Sca I-Kpn I verdaut. Dann wurden diese zwei fraktionierten Fragmente aus Agarosegelen ausgeschnitten und in pBluescript SK(-) kloniert. Diese zwei Bibliotheken wurden durch Transformieren der ligierten Klone in *E. coli* DH12S-Zellen gemacht. Ein "Colony Lift" wurde mit diesen Transformanden dieser zwei Bibliotheken unter Verwendung von Hybond-N+-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech, Japan) durchgeführt, und dann mit der DIG-markierten Probe hybridisiert. Positive Kolonien wurden gepickt und die Inserts mit PCR ge-

prüft. Plasmide aus den ausgewählten Kolonien wurden hergestellt und mit einem ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer sequenziert.

#### Beispiel 3: Konstruktion eines Expressionsvektors

**[0171]** Durch Verwendung der Primer ruben-Nco and ruben-Xba, die eine Nco I- beziehungsweise Xba I- Restriktionsenzym-Schnittstelle einschließen, wurde das gesamte Glucanotransferasegen aus genomischer DNA von *Thermus rubens* amplifiziert. Das Schneiden des PCR-amplifizierten Fragments mit Nco I und Xba I erlaubte ein gerichtetes Klonieren in einen mit Nco I und Xba I verdaulichen pBAD/Myc-His A-Vektor. Der resultierende Vektor pFuku-ruben (gezeigt in [Fig. 1](#)) stellte das Polypeptid der Erfindung nach Transformation in TOP10 E. coli und Induktion mit Arabinose her.

Primer:

**[0172]** ruben-Nco: PCR-Primer (vorwärts) zur Amplifizierung des *Thermus rubens* Glucanotransferasegens. Unterstrichene Nukleotide führen die Nco I-Schnittstelle ein:

5'-GCGCCATGGACTCCAACGCGCTTTG-3'

**[0173]** ruben-Xba: PCR-Primer (rückwärts) zur Amplifizierung des *Thermus rubens* Glucanotransferasegens. Unterstrichene Nucleotides führen die Xba I-Schnittstelle ein:

5'-GCGTCTAGATCAAGCGCGCTGGCTGGCCTC-3'

**[0174]** BAD/Myc-HisB mit der vollständigen für *Thermus rubens*-Glucanotransferase kodierenden Nucleotidsequenz wurde auch in E. coli DH12S transformiert, welcher bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als DSM13049 hinterlegt wurde (siehe unten).

#### Beispiel 4: Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids

**[0175]** *Thermus rubens* Glucanotransferase wurde im mit pFuku-ruben transformierten TOP10 E. coli-Stamm heterolog exprimiert. Die E. coli-Zellen wurden in SB medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 28°C über Nacht inkubiert. 0.1 % Arabinose wurde dann zur Induktion der Expression zugefügt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation herunter zentrifugiert und in 20 mM Phosphatpuffer (pH 6.0) resuspendiert. Die Menge an Puffer entsprach 1/20 des Wachstumsmediums. Die Zellen wurden dann mit Ultraschall behandelt und die Debris durch Zentrifugation entfernt.

#### Beispiel 5: pH-Profil

**[0176]** Die Zellextrakte wurden bei 70°C für 10 Minuten vorerhitzt, die Debris wurde entfernt und das vorbehandelte Zellextrakt wurde dann wie oben beschrieben auf Glucanotransferaseaktivität bei 65°C analysiert. Zwei verschiedene Puffer wurden in der Zubereitung der Substratlösungen verwendet:

4,5 ≤ pH ≤ 6,0:	Natriumacetatpuffer
5,5 ≤ pH ≤ 8,5:	Natriumphosphatpuffer

**[0177]** Wie in dem in [Fig. 2](#) gezeigten Graphen erscheint, liegt das pH-Optimum des Polypeptids der Erfindung im Bereich von 6,5 bis 7,5.

#### Beispiel 6: Temperaturprofil

**[0178]** Um das Temperaturprofil des Enzyms zu bestimmen, wurden die Zellextrakte auf 70°C für 10 Minuten vorerhitzt, Debris wurde entfernt und das vorbehandelte Zellextrakt wurde dann wie oben beschrieben auf Glucanotransferaseaktivität im Temperaturintervall von 30–75°C, pH 7,0, analysiert. Wie in dem in [Fig. 3](#) gezeigten Graphen erscheint, liegt das Temperaturoptimum des Enzyms im Bereich von 50°C bis 70°C.

#### Beispiel 7: Thermische Stabilität

**[0179]** Um die Hitzestabilität des Enzyms zu bestimmen, wurden die Zellextrakte bei verschiedenen Temperaturen im Intervall von 50–75°C für 10 Minuten vorerhitzt, Debris wurde entfernt und das vorbehandelte Zellextrakt wurde dann wie oben beschrieben auf Glucanotransferaseaktivität bei 65°C analysiert. Wie in dem in [Fig. 4](#) gezeigten Graphen erscheint, ist das Enzym bei 70°C stabil, danach ist die Stabilität des Enzyms dras-

tisch verringert.

Hinterlegung von biologischem Material

**[0180]** Das folgende biologische Material wurde unter den Bedingungen des Budapester Vertrags bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Deutschland, hinterlegt und mit der folgenden Zugangsnummer versehen:

<u>Hinterlegung</u>	<u>Zugangsnummer</u>	<u>Datum der Hinterlegung</u>
<u><i>E. coli</i> DH12S pFuku-Ruben</u>	<u>DSM 13049</u>	<u>20. September 1999</u>

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Novozymes A/S

<120> Polypeptide mit Glucanotransferase Aktivität und  
dafür kodierende Nukleinsäuren

&lt;130&gt; 6012.204-WO

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1503

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Thermus rubens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(1503)

&lt;400&gt; 1

atg caa ctc caa cgc gct ttt gga att ttg ctc cac ccc acc agt ttt 48  
Met Gln Leu Gln Arg Ala Phe Gly Ile Leu Leu His Pro Thr Ser Phe

1 5 10 15

ccg ggt cgc tgg ggg att ggg gct ctg ggc cgc gag gcc gag cgg ttt 96  
Pro Gly Arg Trp Gly Ile Gly Ala Leu Gly Arg Glu Ala Glu Arg Phe

20 25 30

ttg gac tgg ctg gcc gat gcg gga gcc cgc tgg tgg cag gtc tta ccg 144  
Leu Asp Trp Leu Ala Asp Ala Gly Ala Arg Trp Trp Gln Val Leu Pro

35 40 45

ctg ggc cct acc agt tac ggc gac tcg ccg tac cag tcc ttc tcg gct 192  
Leu Gly Pro Thr Ser Tyr Gly Asp Ser Pro Tyr Gln Ser Phe Ser Ala

50 55 60

ttt gcc ggt aac ccg tat ttg gtt gac ccc gag atg ctg att gaa aaa 240  
Phe Ala Gly Asn Pro Tyr Leu Val Asp Pro Glu Met Leu Ile Glu Lys

65 70 75 80

ggc tgg ctg gaa caa agc gaa gcg ccc ccg ccg tat ccg acc cag cgc 288  
Gly Trp Leu Glu Gln Ser Glu Ala Pro Pro Tyr Pro Thr Gln Arg

85 90 95

gtg gat tat ggc tgg ctt tac cag acc cgc tgg ccc ctg ttg cgg cgg 336  
Val Asp Tyr Gly Trp Leu Tyr Gln Thr Arg Trp Pro Leu Leu Arg Arg

100 105 110

gct ttc gcg ggg ttt cgg gca agg gct tcg gcc cag gat aag acc cga 384  
Ala Phe Ala Gly Phe Arg Ala Arg Ser Ala Gln Asp Lys Thr Arg

115 120 125

ctg gaa gcc ttt atc gag gcc gag cgc ttc tgg ctg gaa gac tat gcg 432  
Leu Glu Ala Phe Ile Glu Ala Glu Arg Phe Trp Leu Glu Asp Tyr Ala

130 135 140

ctc ttt atg gcc ctc aag acc cgg ttt gac ggc aag ccc tgg aac gag 480  
Leu Phe Met Ala Leu Lys Thr Arg Phe Asp Gly Lys Pro Trp Asn Glu

145 150 155 160

tgg agc ccc gag ctg cgc gac cgt gaa ccg gct gcc ctg gcc agg gcc 528  
Trp Ser Pro Glu Leu Arg Asp Arg Glu Pro Ala Ala Leu Ala Arg Ala

165 170 175

cgt gag gag ctg gcc gag gag gtg gcc ctt tac gag tgg att cag tgg 576  
Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Val Ala Leu Tyr Glu Trp Ile Gln Trp

180 185 190

ctt ttt tat ctg gaa tgg ggc cag acc aag gcc tat gcc gaa tcc aag 624  
Leu Phe Tyr Leu Glu Trp Gly Gln Thr Lys Ala Tyr Ala Glu Ser Lys

195 200 205

ggg att cag att atc ggc gat atg ccc atc ttt gtg gcc ttc gat tcc 672  
Gly Ile Gln Ile Ile Gly Asp Met Pro Ile Phe Val Ala Phe Asp Ser

210 215 220

tca gat gtc tgg gcc aac ccg cag tac ttc tac ctc gag gcc gat ggc	720
Ser Asp Val Trp Ala Asn Pro Gln Tyr Phe Tyr Leu Glu Ala Asp Gly	
225 230 235 240	
aac ccc acg gtg gtg gcg ggc gtt ccg cgg gac tac ttc tcc gaa acc	768
Asn Pro Thr Val Val Ala Gly Val Pro Arg Asp Tyr Phe Ser Glu Thr	
245 250 255	
ggc cag ctc tgg ggc aat ccg ctc tat cgc tgg gat gtg atg gaa agg	816
Gly Gln Leu Trp Gly Asn Pro Leu Tyr Arg Trp Asp Val Met Glu Arg	
260 265 270	
gac aac ttt gcc tgg tgc att gcc cgc ata agg cag tcg ctc aag cag	864
Asp Asn Phe Ala Trp Cys Ile Ala Arg Ile Arg Gln Ser Leu Lys Gln	
275 280 285	
tgc cac ctg gtg cgc atc gac cac ttc cgc ggg ttt gaa gcc tac tgg	912
Cys His Leu Val Arg Ile Asp His Phe Arg Gly Phe Glu Ala Tyr Trp	
290 295 300	
gag gtt ccg ttt ggc cgg ccc aat gct gtg gag ggg cgc tgg gtc aaa	960
Glu Val Pro Phe Gly Arg Pro Asn Ala Val Glu Gly Arg Trp Val Lys	
305 310 315 320	
gcc cca ggg gag aag ctg ttt gct gcg gtg cgg gcc caa ctg agc gat	1008
Ala Pro Gly Glu Lys Leu Phe Ala Ala Val Arg Ala Gln Leu Ser Asp	
325 330 335	
gcg ccc atc att gcc gaa gac ctg ggg gtg atc acc ccc gag gtg gag	1056
Ala Pro Ile Ile Ala Glu Asp Leu Gly Val Ile Thr Pro Glu Val Glu	
340 345 350	
gct ttg cgc gat ggc ttc ggg ttc ccc ggc atg aag att ttg cag ttt	1104
Ala Leu Arg Asp Gly Phe Gly Pro Gly Met Lys Ile Leu Gln Phe	
355 360 365	
gct ttt tcc ggt gag gac aac gcc ttt ttg ccc cac aac tac ccc gcg	1152
Ala Phe Ser Gly Glu Asp Asn Ala Phe Leu Pro His Asn Tyr Pro Ala	
370 375 380	
cac ggc aat gtg gtg tac agc gga acc cac gac aac gac acc acc	1200
His Gly Asn Val Val Tyr Ser Gly Thr His Asp Asn Asp Thr Thr	
385 390 395 400	
ctg gga tgg ttc cgc acc gcg ccg gag gcc gag cgg gcc ttc atg cgg	1248
Leu Gly Trp Phe Arg Thr Ala Pro Glu Ala Glu Arg Ala Phe Met Arg	
405 410 415	
gcc tac ctg gcc cgc tat ggc atc cgt tgt ttg tcg gaa tac gag gtc	1296
Ala Tyr Leu Ala Arg Tyr Gly Ile Arg Cys Leu Ser Glu Tyr Glu Val	
420 425 430	
gcg ggc gct ttg atc gag ctg gcc ttc aaa agc ccg gcc aag ctg gct	1344
Ala Gly Ala Leu Ile Glu Leu Ala Phe Lys Ser Pro Ala Lys Leu Ala	
435 440 445	
att gtg cct ttg cag gac gtg ctg ggg ctg ggc ccc gag gcc cgc atg	1392
Ile Val Pro Leu Gln Asp Val Leu Gly Leu Gly Pro Glu Ala Arg Met	
450 455 460	
aac ttc ccc gga cgg ctg ggg gac aac tgg gcg tgg cgc tac gcc gaa	1440
Asn Phe Pro Gly Arg Leu Gly Asp Asn Trp Ala Trp Arg Tyr Ala Glu	
465 470 475 480	
ggc gac ctc gag ccc ggt ctg gcc gcg gga ctg cgg gcc ctg gcc gag	1488
Gly Asp Leu Glu Pro Gly Leu Ala Ala Gly Leu Arg Ala Leu Ala Glu	
485 490 495	
gcc agc cag cgc gct	1503
Ala Ser Gln Arg Ala	
500	

<210> 2  
<211> 501  
<212> PRT  
<213> Thermus rubens

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

50	55	60													
Phe	Gly	Asn	Pro	Tyr	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Met	Leu	Ile	Glu	Lys	
65	70	75	80												
Gly	Trp	Leu	Glu	Gln	Ser	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro	Tyr	Pro	Thr	Gln	Arg
85	90	95													
Val	Asp	Tyr	Gly	Trp	Leu	Tyr	Gln	Thr	Arg	Trp	Pro	Leu	Leu	Arg	Arg
100	105	110													
Ala	Phe	Ala	Gly	Phe	Arg	Ala	Arg	Ala	Ser	Ala	Gln	Asp	Lys	Thr	Arg
115	120	125													
Leu	Glu	Ala	Phe	Ile	Glu	Ala	Glu	Arg	Phe	Trp	Leu	Glu	Asp	Tyr	Ala
130	135	140													
Leu	Phe	Met	Ala	Leu	Lys	Thr	Arg	Phe	Asp	Gly	Lys	Pro	Trp	Asn	Glu
145	150	155	160												
Trp	Ser	Pro	Glu	Leu	Arg	Asp	Arg	Glu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Ala
165	170	175													
Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Tyr	Glu	Trp	Ile	Gln	Trp
180	185	190													
Leu	Phe	Tyr	Leu	Glu	Trp	Gly	Gln	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ser	Lys
195	200	205													
Gly	Ile	Gln	Ile	Ile	Gly	Asp	Met	Pro	Ile	Phe	Val	Ala	Phe	Asp	Ser
210	215	220													
Ser	Asp	Val	Trp	Ala	Asn	Pro	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Glu	Ala	Asp	Gly
225	230	235	240												
Asn	Pro	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Val	Pro	Arg	Asp	Tyr	Phe	Ser	Glu	Thr
245	250	255													
Gly	Gln	Leu	Trp	Gly	Asn	Pro	Leu	Tyr	Arg	Trp	Asp	Val	Met	Glu	Arg
260	265	270													
Asp	Asn	Phe	Ala	Trp	Cys	Ile	Ala	Arg	Ile	Arg	Gln	Ser	Leu	Lys	Gln
275	280	285													
Cys	His	Leu	Val	Arg	Ile	Asp	His	Phe	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Tyr	Trp
290	295	300													
Glu	Val	Pro	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Val	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Lys
305	310	315	320												
Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	Ala	Ala	Val	Arg	Ala	Gln	Leu	Ser	Asp
325	330	335													
Ala	Pro	Ile	Ile	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Glu	Val	Glu
340	345	350													
Ala	Leu	Arg	Asp	Gly	Phe	Gly	Phe	Pro	Gly	Met	Lys	Ile	Leu	Gln	Phe
355	360	365													
Ala	Phe	Ser	Gly	Glu	Asp	Asn	Ala	Phe	Leu	Pro	His	Asn	Tyr	Pro	Ala
370	375	380													
His	Gly	Asn	Val	Val	Val	Tyr	Ser	Gly	Thr	His	Asp	Asn	Asp	Thr	Thr
385	390	395	400												
Leu	Gly	Trp	Phe	Arg	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Arg	Ala	Phe	Met	Arg
405	410	415													
Ala	Tyr	Leu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Ile	Arg	Cys	Leu	Ser	Glu	Tyr	Glu	Val
420	425	430													
Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	Glu	Leu	Ala	Phe	Lys	Ser	Pro	Ala	Lys	Leu	Ala
435	440	445													
Ile	Val	Pro	Leu	Gln	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Arg	Met
450	455	460													
Asn	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Ala	Trp	Arg	Tyr	Ala	Glu
465	470	475	480												
Gly	Asp	Leu	Glu	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu
485	490	495													
Ala	Ser	Gln	Arg	Ala											
500															

### Patentansprüche

1. Isoliertes Polypeptid, das Glucanotransferaseaktivität besitzt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - (a) einem Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die mindestens 80% Identität mit der als Aminosäuren 1 bis 501 gezeigten Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2, hat; oder
  - (b) einem Polypeptid, das von einer Nukleinsäuresequenz kodiert wird, die unter Bedingungen hoher Stringenz hybridisiert mit
    - (i) einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz, gezeigt als Nukleotide 1 bis 1503 von SEQ ID

NR:1, oder

(ii) einer Untersequenz von (i) von mindestens 100 Nukleotiden;

2. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die mindestens 85% Identität mit der als Aminosäuren 1 bis 501 gezeigten Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 hat.

3. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, das eine Aminosäuresequenz besitzt, die mindestens 90% Identität mit der als Aminosäuren 1 bis 501 gezeigten Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 hat.

4. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, umfassend die als Aminosäuren 1 bis 501 gezeigte Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2.

5. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid mindestens 80% Identität mit dem Polypeptid besitzt, das durch den für die Glucantransferase-kodierenden Teil der DNA-Sequenz, kloniert in ein in *Escherichia coli* DSM 13049 vorhandenes Plasmid, kodiert wird.

6. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid eine Variante des Polypeptids ist, das eine als Aminosäuren 1 bis 501 gezeigte Aminosäuresequenz von SEQ ID NR:2 besitzt, umfassend eine Substitution, Deletion und/oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren.

7. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, das mindestens 75% Aktivität nach Inkubation bei 67°C für 10 min in einem 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, beibehält, wobei die Aktivität relativ zur Aktivität des Polypeptids nach Inkubation bei 65°C für 10 min in einem 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, gemessen wird.

8. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, das in der Lage ist, ein cyclisches Glucan durch eine intramolekulare Transglycosylierungsreaktion herzustellen, wobei das Substrat ein alpha-Glucan ist.

9. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 8, das von der Gattung *Thermus* erhalten wird.

10. Isoliertes Polypeptid nach den Ansprüchen 8 oder 9, das von der Art *Thermus rubens* erhalten wird.

11. Isoliertes Polypeptid nach den Ansprüchen 8–10, das von *Thermus rubens* ATCC 31556 erhalten wird.

12. Isolierte Nukleinsäuresequenz, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die für das in einem beliebigen der Ansprüche 1–11 definierte Polypeptid kodiert.

13. Nukleinsäurekonstrukt, umfassend die Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 12, funktionell verbunden mit einer oder mehreren Kontrollsequenzen, die in der Lage sind, die Expression des Polypeptids in einem geeigneten Expressionswirt zu steuern.

14. Rekombinanter Expressionsvektor, umfassend das Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13, einen Promotor und Transkriptions- und Translations-Stoppsignale.

15. Rekombinante Wirtszelle, umfassend das Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13.

16. Verfahren zur Herstellung eines wie in einem beliebigen der Ansprüche 1–11 definierten isolierten Polypeptids, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Kultivieren einer wie in Anspruch 15 definierten rekombinanten Wirtszelle unter Bedingungen, die der Herstellung des Polypeptids förderlich sind; und

(b) Gewinnen des Polypeptids.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Wirtszelle ausgewählt wird aus der Gattung *Thermus*.

18. Verwendung des Polypeptids wie in einem beliebigen der Ansprüche 1–11 definiert, um Nahrungsmittel herzustellen.

19. Reinigungs- oder Waschmittelzusammensetzung, umfassend das wie in einem beliebigen der Ansprüche 1–11 definierte Polypeptid.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

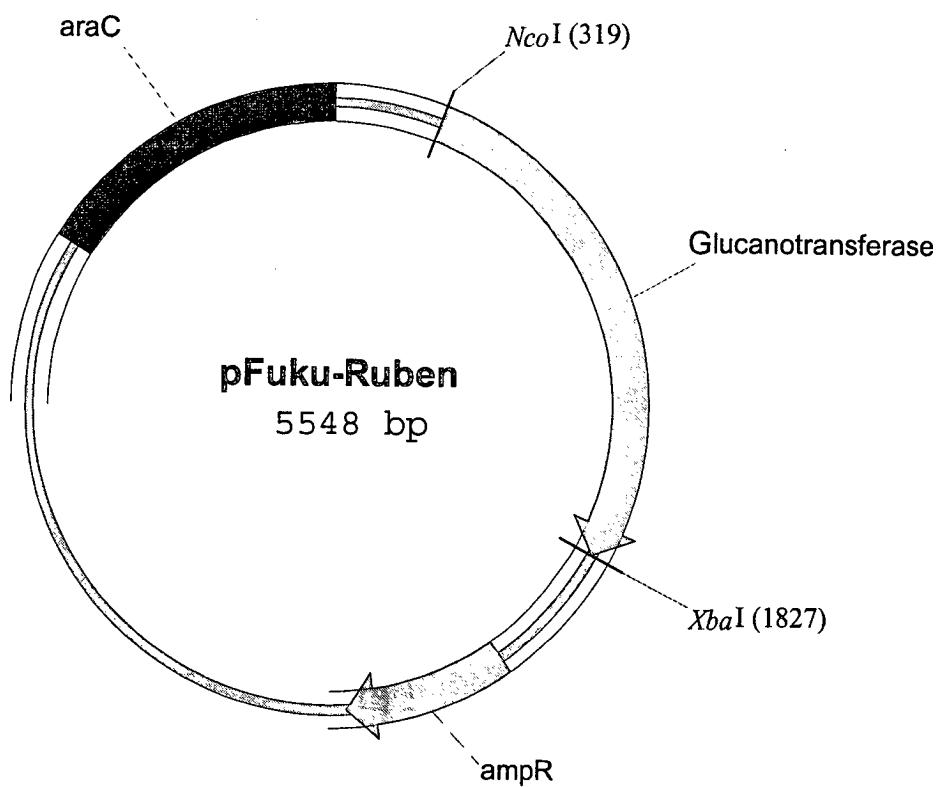


Fig. 1

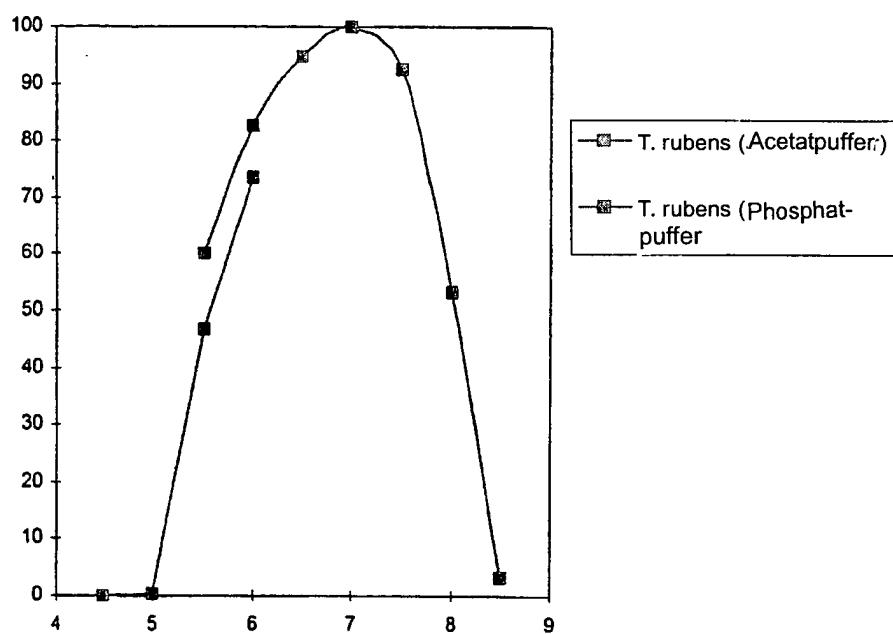


Fig. 2

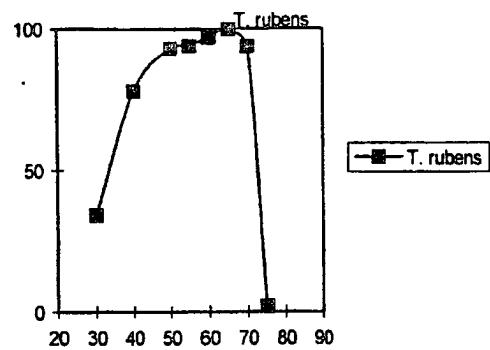


Fig. 3

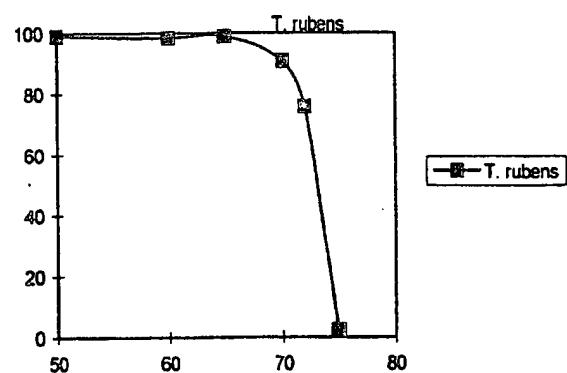


Fig. 4