



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 32 538 T2** 2005.05.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 851 913 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 32 538.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK96/00341**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 926 323.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/007202**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.08.1996**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **27.02.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.07.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **19.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.05.2005**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 9/20**  
**C11D 3/386**

(30) Unionspriorität:

<b>90595</b>	<b>11.08.1995</b>	<b>DK</b>
<b>109695</b>	<b>29.09.1995</b>	<b>DK</b>
<b>11627 P</b>	<b>14.02.1996</b>	<b>US</b>
<b>37496</b>	<b>01.04.1996</b>	<b>DK</b>
<b>16754 P</b>	<b>07.05.1996</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,  
Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**OKKELS, Sigurd, Jens, DK-2880 Bagsvaerd, DK;  
SVENDSEN, Allan, DK-2880 Bagsvaerd, DK;  
BORCH, Kim, DK-2880 Bagsvaerd, DK;  
THELLERSEN, Marianne, DK-2880 Bagsvaerd, DK;  
PATKAR, Anant, Shamkant, DK-2880 Bagsvaerd,  
DK; PETERSEN, Aaby, Dorte, DK-2880 Bagsvaerd,  
DK; ROYER, C., John, Davis, US; KRETZSCHMAR,  
Titus, DK-2880 Bagsvaerd, DK**

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE LIPOLYTISCHE ENZYME**

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 eingelegt, 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****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft neue lipolytische Enzyme, die eine wesentliche Menge an Fettbestandteil während einer Ein-Zyklus-Waschung entfernen können.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** Viele Jahre lang wurden lipolytische Enzyme als Detergenzenzyme, d. h. zum Entfernen von Lipid- oder Fettflecken von Geweben und/oder Textilien verwendet. Zum Beispiel wurden verschiedene mikrobielle Lipasen als Detergenzenzyme vorgeschlagen. Beispiele für solche Lipasen schließen eine Lipase von *Humicola lanuginosa*, z. B. beschrieben in EP 258 068 und EP 305 216, eine Lipase von *Rhizomucor miehei*, wie z. B. beschrieben in EP 238 023 und Boel, et al., *Lipids* 23, 701–706, 1988, lipolytische Enzyme von *Absidia* sp. (WO 96/13578), eine Lipase von *Candida*, wie eine Lipase von *C. antarctica*, z. B. die in EP 214 761 beschriebene Lipase A oder B von *C. antarctica*, beschrieben, eine Lipase von *Pseudomonas* wie eine Lipase von *Ps. Alcaligenes* und *Ps. Pseudoalcaligenes*, wie z. B. beschrieben in EP 218 272, eine Lipase von *Ps. Cepacia*, wie z. B. beschrieben in EP 331 376, eine Lipase von *Pseudomonas* sp., wie offenbart in WO 95/14783, eine Lipase von *Bacillus*, z. B. eine Lipase von *B. subtilis* (Dartois et al., 1993), eine Lipase von *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) und eine Lipase von *B. pumilus* (EP 91 0064) ein.

**[0003]** Weiterhin wurde eine Anzahl von geklonten Lipasen beschrieben, einschließlich die Lipase von *Penicillium camembertii*, beschrieben von Yamaguchi, S. et al., 1991, die Lipase von *Geotricum candidum* (Schimada, Y. et al., 1989, Schrag, J. D. et al. (1991) *Nature* 351, S. 761) und verschiedene Lipasen von *Rhizopus* wie eine Lipase von *R. delemar* (R. D. Joerger und M. J. Hass (1993), *Lipids* 28, S. 81–88), eine Lipase von *R. niveus* (W. Kugimiya et al. (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.* 5, S. 716–719), *R. javanicus* (W. Uyttenbroeck et al. (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, S. 245–254) und eine *R. oryzae* (Haas, M. J., Allen, J. und Berka, T. R. (1991) *Gene* 109, S. 107–113), die mit den anderen Lipasen von *Rhizopus* eine im Wesentlichen identische Sequenz aufweisen.

**[0004]** Andere Arten von lipolytischen Enzymen wurden als Detergenzenzyme vorgeschlagen, einschließlich so genannte Cutinasen, z. B. abgeleitet von *Pseudomonas mendocina*, wie beschrieben in WO 88/09367, oder eine Cutinase, abgeleitet von *Fusarium solani pisi* (z. B. beschrieben in WO 90/09446).

**[0005]** In den letzten Jahren wurden Versuche durchgeführt, Lipasevarianten mit verbesserten Eigenschaften für Detergenzzwecke herzustellen. Zum Beispiel offenbart WO 92/05249 Lipasevarianten mit verbesserten Eigenschaften, in welchen bestimmte Merkmale von Lipaseenzymen vom Wildtyp durch spezifische, d. h. zielgerichtete Modifikationen ihrer Aminosäuresequenzen verändert wurden. Spezifischer sind Lipasevarianten beschrieben, in welchen ein oder mehrere Aminosäurereste der so genannten Lipidkontaktzone der Stammlipase modifiziert wurden.

**[0006]** WO 94/01541 beschreibt Lipasevarianten mit verbesserten Eigenschaften, in welchen ein Aminosäurerest, der eine entscheidende Position gegenüber der aktiven Stelle der Lipase belegt, modifiziert wurde.

**[0007]** EP 407 225 offenbart Lipasevarianten mit verbesserter Resistenz gegen proteolytische Enzyme, die durch spezifisch definierte Aminosäuremodifikationen hergestellt wurden.

**[0008]** EP 260 105 beschreibt Hydrolasen, in welchen ein Aminosäurerest mit 15 Å von der aktiven Stelle substituiert wurde.

**[0009]** WO 95/35381 offenbart Lipasevariante von *Pseudomonas* sp., insbesondere Lipasevarianten von *P. glumae* und *P. pseudoalcaligenes*, die so modifiziert wurden, dass die hydrophobe Eigenschaft an der Oberfläche des Enzyms erhöht wird.

**[0010]** WO 96/00292 offenbart Lipasevarianten von *Pseudomonas* sp., insbesondere Lipasevarianten von *P. glumae* und *P. pseudoalcaligenes*, die so modifiziert wurden, dass die Kompatibilität des Enzyms gegenüber anionischen oberflächenaktiven Stoffen verbessert wird.

**[0011]** WO 95/30744 offenbart mutierte Lipasen wie Lipasen von *Pseudomonas* sp., die zu einer erhöhten Resistenz gegen ein oberflächenaktiven Stoff modifiziert wurden.

**[0012]** WO 94/25578 offenbart mutierte Lipasen, die mindestens eine Position 21 in der Lipase von *P. pseudocaligenes* entsprechende Substitution des Methionins, insbesondere Leucin, Serin oder Alanin umfassen.

**[0013]** Alle der vorstehend erwähnten Lipasevarianten wurden durch Verwendung von zielgerichteter Mutagenese konstruiert, was zu einer Modifikation von spezifischen Aminosäureresten führte, die entweder auf der Basis ihres Typs oder auf der Basis ihrer Lokalisierung in der sekundären oder tertiären Struktur des Stammlipids ausgewählt wurde.

**[0014]** Ein Zugang einer anderen Ausführungsform zur Konstruktion von Mutanten oder Varianten eines vorgegebenen Proteins basiert auf Zufallsmutagenese. Zum Beispiel offenbaren US 4,898,331 und WO 93/01285 solche Techniken.

**[0015]** WO 95/22615 offenbart Varianten von lipolytischen Enzymen mit verbesserter Waschleistung, wobei die Varianten durch ein Verfahren hergestellt wurden, das das Unterziehen einer lipolytischen Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz einer Zufallsmutagenese und Screenen nach Varianten mit einer herabgesetzten Abhängigkeit von Calcium und/oder einer verbesserten Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer oder mehreren Detergenzkomponenten, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, einschließt.

**[0016]** WO 95/09909 offenbart unter anderem chemisch modifizierte Lipasen oder Lipasemutanten, die einen höheren *pI* als das entsprechende modifizierte Enzym aufweist.

**[0017]** Ein Nachteil aller bis heute beschriebenen lipolytischen Detergenzenzyme ist, dass sie die beste Wirkung der Fettentfernung nach mehr als einem Waschzyklus ausüben, wahrscheinlich da die bekannten lipolytischen Enzyme, nach dem Aufbringen auf den zu entfernenden Fettfleck während einer bestimmten Dauer des Trocknungsvorgangs aktiver sind, als während des Waschvorgangs selbst (Gormsen et al., in Proceedings of the 3<sup>rd</sup> World Conference on Detergents, AOCS press, 1993, S. 198–203). Dies hat praktisch zur Folge, dass mindestens zwei Waschzyklen (getrennt durch eine ausreichende Trocknungsdauer) erforderlich sind, um eine wesentliche Entfernung von Fettflecken zu erhalten.

**[0018]** Es wurde beschrieben, dass angeblich einige lipolytische Enzyme Fettbestandteile während des ersten Waschzyklus entfernen können. So offenbart WO 94/03578 eine Detergenzzusammensetzung, die zusätzlich zu verschiedenen Detergenzkomponenten ein Enzym umfassen, das angeblich eine wesentliche lipolytische Aktivität während des Hauptzyklus eines Waschvorgangs zeigen kann. Beispiele für lipolytische Enzyme, die angeblich die vorstehende Aktivität zeigen, schließen stammspezifische Cutinasen wie die Cutinase von *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, *Rhizoctonia solani* und *Alternaria brassicicola* ein. Jedoch kann beim Testen unter realistischen Waschbedingungen keines dieser Enzyme eine wesentliche Menge eines Fettflecks während eines Ein-Zyklus-Waschvorgangs entfernen (vgl. die nachstehenden Beispiele).

**[0019]** Folglich besteht Bedarf nach lipolytischen Enzymen, die unter realistischen Waschbedingungen wesentliche Fettbestandteilmengen während eines Waschzyklus entfernen können.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0020]** Die Erfinder identifizierten und konstruierten nun überraschend eine neue Klasse an lipolytischen Enzymen, die wesentliche Fettbestandteilmengen während einer unter realistischen Waschbedingungen durchgeführten Ein-Zyklus-Wäsche entfernen können. Die vorliegende Erfindung basiert auf diesem Fund.

**[0021]** Demzufolge betrifft die Erfindung in einem ersten Aspekt ein lipolytisches Enzym, das, wenn es in der hier definierten Detergenzzusammensetzung A und/oder B vorliegt, mindestens 15% mehr Fett aus einem fettbesetzten Textilmuster (swatch) als dieselbe Detergenzzusammensetzung ohne das Enzym in einem Ein-Zyklus-Waschtest entfernen kann, umfassend das Unterziehen von 7 Fettbesetzten Baumwoll-Textilmustern (9 × 9 cm) pro Becher einer Ein-Zyklus-Waschung in einem Temperatur-geregelten Terg-O-to-Meter (TOM), wobei jeder Becher 1000 ml Wasser, umfassend 3,2 mM  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (in einem Verhältnis von 5 : 1) und 5 g/l der Detergenzzusammensetzung, pH 10, und umfassend 12.500 LU/l des lipolytischen Enzyms, enthält, wobei die Waschbehandlung für eine Dauer von 20 Minuten bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt wird, gefolgt von Spülen für eine Dauer von 15 Minuten in fließendem Leitungswasser und einem ausgebreiteten Trocknen („linedrying“) über Nacht bei Raumtemperatur, nachfolgende Extraktion und Quantifizierung des Fettbestands auf den Textilmustern durch Soxhlet-Extraktion.

**[0022]** Die Detergenzzusammensetzung A und/oder B in einem Ein-Zyklus-Waschtest ist hier weiter im Ab-

schnitt Materialien und Verfahren beschrieben.

**[0023]** Die vorliegende Erfindung bildet die erste tatsächliche Demonstration der überraschenden Tatsache, dass es möglich ist, lipolytische Erstwaschenzyme zu entwickeln (identifizieren und/oder bilden). Folglich zeigte sich, dass das, was bisher als unmöglich betrachtet wurde (auf der Basis von mehreren Jahren intensiver Forschung durch eine Anzahl von Forschungsteams auf der ganzen Welt (wie durch die Anzahl an hoffnungsvollen Patentanmeldungen, die auf dem vorstehend erwähnten Gebiet eingereicht wurden, wiedergegeben)) sich nun als möglich erwiesen.

**[0024]** Die Erfinder entwickelten sehr günstige und erfolgreiche Verfahren zum Bilden von lipolytischen Erstwaschenzymen.

**[0025]** Demzufolge betrifft die Erfindung in einem zweiten wichtigen Aspekt ein Verfahren zur Herstellung eines mutierten lipolytischen Erstwaschenzyms, wobei das Verfahren mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Unterziehen einer ein lipolytisches Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz einer Mutagenese, günstigerweise einer Zufallsmutagenese, zur Bildung einer Vielfalt an mutierten DNA-Sequenzen;
- (b) Exprimieren der mutierten DNA-Sequenzen in Wirtszellen;
- (c) Screenen nach Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym exprimieren, das eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, aufweist; und
- (d) Selektieren eines mutierten lipolytischen Enzyms unter denjenigen, die aus Schritt (c) resultieren, das, wenn es in der Detergenzzusammensetzung A und/oder B in einer Konzentration von 12.500 LU/l vorliegt, mindestens 50% mehr Fett aus einem fettbeschmutzten Textilmuster als dieselbe Detergenzzusammensetzung ohne das Enzym in der vorstehend beschriebenen Ein-Zyklus-Waschung entfernen kann.

**[0026]** In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines ersten mutierten lipolytischen Waschenzyms, wobei das Verfahren mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Konstruieren von mutierten DNA-Sequenzen durch Kombinieren einer ein erstes lipolytisches Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz und einer ein zweites lipolytisches Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz und gegebenenfalls von weiteren ein drittes (und gegebenenfalls weitere) lipolytisches Stammenzym kodierenden DNA-Sequenzen, wobei die DNA-Sequenzen ausreichend homolog sind, um das Stattfinden von Rekombination zwischen Teilen der oder der gesamten DNA-Sequenzen zu gewähren,
- (b) Exprimieren der enthaltenen mutierten DNA-Sequenzen in Wirtszellen, und
- (c) Selektieren eines mutierten lipolytischen Enzyms, das durch eine mutierte DNA-Sequenz kodiert wird, das, wenn es in der Detergenzzusammensetzung A oder B in einer Konzentration von 12.500 LU/l vorliegt, mindestens 15% mehr Fett aus einem fettbeschmutzten Textilmuster als dieselbe Detergenzzusammensetzung ohne das Enzym in der vorstehend beschriebenen Ein-Zyklus-Waschung entfernen kann.

**[0027]** In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Verfahren gemäß dem zweiten und dritten Aspekt der Erfindung kombiniert, d. h. ein mutiertes lipolytisches Enzym, das aus dem Verfahren des zweiten Aspekts resultiert, wird als Stammenzym im Verfahren gemäß dem dritten Aspekt verwendet.

**[0028]** In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz umfasst, die ein wie vorstehend beschriebenes lipolytisches Erstwaschenzym kodiert.

**[0029]** In noch einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung einen das DNA-Konstrukt tragenden rekombinanten Expressionsvektor, eine mit dem DNA-Konstrukt oder dem Vektor transformierte Zelle sowie ein Verfahren zur Herstellung eines ersten lipolytischen Erstwaschenzyms durch Züchten der Zelle unter Bedingungen, die die Herstellung des Enzyms fördern, wonach das Enzym aus der Kultur entfernt wird.

**[0030]** In abschließenden Aspekten betrifft die Erfindung die Verwendung eines lipolytischen Erstwaschenzyms als Detergenzenzym, insbesondere zum Waschen oder Geschirrspülen, und einen Detergenzzusatz und eine Detergenzzusammensetzung, der/die das Enzym umfasst.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

**[0031]** [Abb. 1](#) zeigt das Plasmid pYESHL,

**[0032]** [Abb. 2](#) das Plasmid pAO1,

- [0033] [Abb. 3](#) das Plasmid pAHL,
- [0034] [Abb. 4](#) und [Abb. 5](#) eine grafische Veranschaulichung eines PCR-Mutageneseverfahrens,
- [0035] [Abb. 6](#) das Plasmid pJSO37,
- [0036] [Abb. 7](#) die Konstruktion des Plasmids pDM177,
- [0037] [Abb. 8](#) die Konstruktion des Aspergillus-Vektors pCaHj485,
- [0038] [Abb. 9](#) zeigt die ursprüngliche Sequenz der Lipase von *Absidia reflexa* ATTC 44896. Das Triplet, das die erste Aminosäure Serin des reifen NL127 sowie das Stopkodon kodiert, ist unterstrichen.
- [0039] [Abb. 10](#) zeigt die Sequenz von *Absidia reflexa* ATTC 44896 in Zusammenhang mit dem Hefeexpressionsvektor pTiK05.
- [0040] [Abb. 11](#) zeigt die Signalsequenz des Paarungsfaktors al.

## DEFINITIONEN UND HINTERGRUND DER LIPASESTRUKTUR

### Definitionen von in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Begriffen

[0041] Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „lipolytisches Enzym“ auf ein Enzym hinweisen, das unter der Enzym-Klassifizierungsnummer E.C.3.1.1 (Carboxylesterhydrolasen) gemäß den Empfehlungen (1992) der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) klassifiziert ist. Lipolytische Enzyme zeigen folglich lipolytische Aktivität gegen mindestens einen der Esterbindungstypen, die in mindestens einem der folgenden Lipide vorliegen: Mono-, Di- und Triglyceride, Phospholipide (alle Klassen), Thioester, Cholesterinester, Wachsester, Cutin, Suberin, synthetische Ester usw. (vgl. die verschiedenen im Kontext von E.C.3.1.1 erwähnten Esterbindungstypen).

[0042] Folglich kann es sich bei dem lipolytischen Enzym z. B. um dasjenige handeln, das herkömmlich als Lipase, Phospholipase, Esterase oder Cutinase bezeichnet wird. Der Begriff „lipolytisches Enzym“ soll natürlich vorkommende Enzyme sowie Enzyme, die verglichen mit einem natürlich vorkommenden Enzym z. B. durch Modifikation eines Aminosäurerests oder mehrerer Aminosäurereste des Enzyms oder durch chemische Modifikation modifiziert wurden, umfassen. Im vorliegenden Kontext wird letzterer Typ eines lipolytischen Enzyms als Variante bezeichnet.

[0043] Im vorliegenden Kontext ist die Fähigkeit des Enzyms beim Entfernen einer wesentlichen Fettbestandteilsmenge während einer Ein-Zyklus-Waschung auch als Erstwascheffekt, Ein-Zyklus-Wascheffekt, Durchwaschungseffekt und dergleichen bezeichnet. Analog dazu werden lipolytische Enzyme der Erfindung, die die Entfernung einer wesentlichen Menge an Fettbestandteilen während einer Ein-Zyklus-Waschung ermöglichen können, lipolytische Erstwaschenzyme, lipolytische Durchwaschenzyme, lipolytische Ein-Zyklus-Waschungs-Enzyme und dergleichen genannt.

[0044] Im vorliegenden Kontext soll der wie zum Definieren der Fett-entfernenden Fähigkeit eines vorgegebenen lipolytischen Enzyms der Erfindung verwendete Begriff „Detergenzzusammensetzung A und/oder B“, darauf hinweisen, dass das lipolytische Enzym die angegebene Fett-entfernende Fähigkeit aufweist, wenn es in einer oder in beiden der Detergenzzusammensetzungen A und B vorliegt.

[0045] Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „Stammenzym“ ein natürlich vorkommendes Enzym sowie eine Variante eines solchen Enzyms einschließen. Demzufolge wird der Begriff verwendet, um das Ausgangsmaterial zu identifizieren, das gemäß einem Verfahren der Erfindung zur Herstellung von lipolytischen Erstwaschenzymen modifiziert werden soll, ohne Berücksichtigung dessen, ob es sich bei dem Ausgangsmaterial um ein natürlich vorkommendes Enzym oder eine Variante eines solchen Enzyms handelt.

[0046] Der wie beim Verfahren gemäß dem zweiten Aspekt verwendete Begriff „eine Vielfalt an mutierten Sequenzen“, ist so zu verstehen, dass er auf mindestens zwei, jedoch vorzugsweise eine viel höhere Anzahl an verschiedenen Sequenzen, wie mindestens 10, mindestens 50, mindestens 100, mindestens 1000 Sequenzen hinweist, die aus der Mutagenese resultierten.

**[0047]** Der Begriff „Zufallsmutagenese“ ist in herkömmlicher Weise zu verstehen, d. h. so, dass er auf eine Einbringung von einer oder mehreren Mutationen an zufälligen Positionen des Stammenzyms oder eine Einbringung von zufälligen Aminosäureresten in ausgewählten Positionen oder Regionen des Stammenzyms hinweist. Die Zufallsmutagenese ist gewöhnlich von einem Screenen begleitet, das die Selektion von mutierten lipolytischen Enzymen gewährt, die, verglichen mit dem Stammenzym, verbesserte Eigenschaften aufweisen. Geeignete Techniken zum Einbringen von zufälligen Mutationen und Screenen nach verbesserten Eigenschaften sind nachstehend im Detail erörtert.

**[0048]** Der wie bei den hier offenbarten lipolytischen Enzymen verwendete Begriff „zufrieden stellende Waschleistung“, soll darauf hinweisen, dass das Enzym beim Testen in einem geeigneten Waschtest oder einem mit dem Waschen verbundenen Test (wie dem Test, der in Materialien und Verfahren und nachstehendem Beispiel 5 beschrieben ist) verglichen mit den im Handel erhältlichen lipolytischen Enzymen (Lumafast und Lipomax von Genencor, Lipolase und Lipolase Ultra von Novo Nordisk und Liposam (von Showa Denko)) eine verbesserte Waschleistung aufweist. Die verbesserte Waschleistung kann in Bezug auf die Entfernungsfähigkeit für Lipidflecken und/oder eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium, eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenz-Komponente, erhöhte hydrophobe Eigenschaften, eine interessante Substratspezifität oder dergleichen vorliegen.

**[0049]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium“, wie in Verbindung mit dem Screenen nach mutierten lipolytischen Enzymen, insbesondere lipolytischen Enzymen, die enzymatische Aktivität gegenüber Lipasesubstraten mit Kohlenwasserstoff-Ketten (ffa-Teil) mit einer Länge über etwa 6–8 Kohlenstoffatomen zeigen, verwendet, soll bedeuten, dass das mutierte lipolytische Enzym geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen erfordert, wobei es denselben Aktivitäts- und/oder Stabilitätsgrad wie das Stammenzym beim Testen unter ähnlichen Bedingungen aufzeigt. Mit anderen Worten ist/sind die Stabilität und/oder Aktivität des Enzyms in Abwesenheit von Calcium verglichen mit derjenigen/denjenigen des Stammenzyms erhöht. Die Stabilität kann z. B. durch Bestimmung der Restaktivität durch Vorinkubation unter Ca-freien Bedingungen und/oder DSC (Differential Scanning Calorimetry) in Abwesenheit/Gegenwart von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  getestet werden. Vorzugsweise ist das mutierte lipolytische Enzym der Erfindung im Wesentlichen von der Gegenwart von Calcium zum Aufzeigen von enzymatischer Aktivität, insbesondere bei einem pH-Wert von höher als 8, unabhängig.

**[0050]** Der wie in Verbindung mit dem Screenen nach mutierten lipolytischen Enzymen verwendete Begriff „verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente“, soll bedeuten, dass das mutierte lipolytische Enzym bei höheren Konzentrationen des Detergenz oder der Detergenzkomponente aktiver als das lipolytische Stammenzym ist.

**[0051]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „Detergenz“ auf ein Gemisch aus Detergenzzusätzen hinweisen, das gewöhnlich zum Waschen oder Geschirrspülen verwendet wird. Analog dazu soll eine „Detergenzkomponente“ auf eine Komponente oder einen Zusatz hinweisen, die/der gewöhnlich in Waschmittel- oder Geschirrspülzusammensetzungen zu finden ist, wobei spezifische Beispiele dafür im nachstehenden Abschnitt mit dem Titel „Detergenzzusammensetzungen“ angegeben sind.

#### Hintergrund der lipolytischen Enzymstruktur und Definition der Strukturterminologie

**[0052]** Die 3D-Struktur einer Anzahl an lipolytischen Enzymen wurde bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Strukturen im Kern des Proteins ein allgemeines Motiv aufweisen, das aus einem mittleren  $\beta$ -Faltblatt besteht, wobei einer der Stränge in einem nukleophilen Bogen endet, der die aktiven Serinreste einschließt (Ollis et al., 1992). Lipolytische Enzyme umfassen eine Lipidkontaktzone, bei welcher es sich um eine Oberfläche mit erhöhter Oberflächenhydrophobizität handelt, die mit dem Lipidsubstrat bei oder während der Hydrolyse wechselwirkt. Bei einer Abdeckung enthaltenden lipolytischen Enzymen wird die Lipidkontaktzone typischerweise gebildet, wenn das Enzym durch das Substrat aktiviert wird (und die Abdeckung dabei abgelöst wird). Bei einer Abdeckung enthaltenden lipolytischen Enzymen liegt im Allgemeinen eine geringe oder keine entsprechende wesentliche Bewegung vor, die zur Bildung der Lipidkontaktzone führt. Das Lipidsubstrat ist ein Zusammenschluss aus einzelnen Lipidsubstratmolekülen. Die Lipidkontaktzone enthält eine Bindungsfläche, an welcher vor der Hydrolyse ein einzelnes Lipidsubstratmolekül bindet. Diese Bindungsfläche enthält einen Acyl-bindenden hydrophoben Spalt und eine so genannte Hydrolysetasche, die um der aktiven Stelle Ser angeordnet ist, wobei angenommen wird, dass darin die Hydrolyse des Lipidsubstrats stattfindet. Die Lipidkontaktzone schließt ein oder mehrere sekundäre Proteinstrukturelemente, d. h. Schleifensequenzen, ein, wobei die Aminosäurereste davon mit dem Substrat während der Hydrolyse bei der Aktivierung des lipolytischen Enzyms in Kontakt kommt, bindet und/oder wechselwirkt.

**[0053]** Die Lipidkontaktzone kann z. B. aus einer durch geeignete Computerprogramme gebildeten dreidimensionalen Struktur des fraglichen lipolytischen Enzyms kenntlich sein. Die Lipidkontaktzone kann durch Durchsuchen der Struktur nach den die Zone definierenden relevanten Merkmalen, einschließlich einer Zone, die auf dem oberen Teil der aktiven Stellenreste positioniert ist und eine Abdeckstruktur (für lipolytische Enzyme, die eine Abdeckung enthalten), die beim Öffnen eine enge hydrophobe Bindungstasche enthaltende hydrophobe Oberfläche bilden, identifiziert werden. Die Konformation des inaktiven bzw. aktivierten lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* ist in den [Abb. 1](#) und [Abb. 2](#) von WO 92/05249 dargestellt.

**[0054]** In Bezug auf Aminosäurereste ist die Lipidkontaktzone des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* durch die Aminosäurereste 21–25, 36–38, 56–62, 81–98, 110–116, 144–147, 172–174, 199–213 und 248–269 definiert. Die Reste wurden auf der Basis von Computermodellsimulationen der Wechselwirkung zwischen dem lipolytischen Enzym und einem Lipidsubstrat identifiziert. Bei lipolytischen Enzymen, die im Wesentlichen dieselbe Struktur wie das lipolytische Enzym von *H. lanuginosa*, z. B. lipolytische Enzyme, die durch *Rhizomucor miehei*, durch *Rhizopus oryzae*, durch *Penicillium camembertii* und durch *Absidia* sp. hergestellt werden (vgl. den vorstehenden Abschnitt „Hintergrund der Erfindung“), aufweisen, wird die Lipidkontaktzone durch Aminosäurereste gebildet, die homologe Positionen zu denjenigen, die vorstehend für das Enzym von *H. lanuginosa* angegeben sind, belegen. Die homologen Positionen können durch eine Anordnung der relevanten Aminosäuresequenzen (z. B. unter Verwendung des UWGCG-GAP-Programms) auf der Suche nach Gruppen mit Sequenzähnlichkeit identifiziert werden, wobei dies jedoch durch Vergleichen der Strukturen oder Strukturmodelle der relevanten Enzyme günstiger durchgeführt werden kann. Spezifischer ist die Lipidkontaktzone dieser Enzyme aus den folgenden Resten zusammengesetzt (die verwendete Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäurereste im reifen Enzym, wobei die Sequenz davon, wenn nicht anders angegeben, aus den im vorstehenden Abschnitt „Hintergrund der Erfindung“ offenbarten Literaturangaben ersichtlich ist):  
*Penicillium camembertii*: 21–25, 36–38, 56–62, 81–98, 109–115, 143–146, 172–174, 198–212, 247–280;  
*Rhizopus oryzae*: 29–33, 39–41, 57–62, 81–98, 109–115, 143–146, 175–177, 202–216, 245–269;  
*Rhizomucor miehei*: 29–33, 39–41, 56–61, 80–97, 108–114, 142–145, 174–176, 201–215, 245–269;  
Lipase von *Absidia* sp.: 29–33, 39–41, 56–61, 80–97, 108–114, 142–145, 171–173, 198–212, und 239–263, wobei die Nummerierung auf der Basis des reifen Enzyms die folgende N-terminale Sequenz aufweist: SSKQ-DYR. Die vollständige Sequenz ist aus (SEQ ID Nr. 98) ersichtlich.

**[0055]** Als Alternative oder zusätzlich zu der Identifikation auf der Basis von Homologie der Lipidkontaktzone kann die Lipidkontaktzone identifiziert werden durch:

- (a) Berechnen des hydrophoben Vektors der 3D-Molekularstruktur des aktivierten Enzyms;
- (a) Herstellen eines Schnitts senkrecht zu dem Vektor durch das CA-Atom (C $\alpha$ -Atom) des zweiten Aminosäuresests nach der aktiven Stelle Serin in der linearen Sequenz;
- (c) Einschließen aller Reste mit mindestens einem Atom an der Seite des Schnitts, auf welches der Vektor deutet; und
- (d) Selektieren aus den Resten diejenigen, die mindestens ein Atom innerhalb von 5 Ångström der Oberfläche des Proteins aufweisen.

**[0056]** Der hydrophobe Vektor wird aus der Proteinstruktur durch Summieren aller Restvektoren für Reste mit einer Oberflächenzugänglichkeit (Lee et al., Mol. Biol. 55, S. 379–400 (1991)) von mindestens 15% berechnet. Der Ausgangspunkt des Restvektors ist als das CA-Atom des Rests definiert, und seine Richtung verläuft durch das Massenzentrum der Seitenkette. Die Größenordnung jedes Testvektors ist als die Reste in Bezug auf die freie Energie des Übergangs zwischen Wasser und einem hydrophoberen Lösungsmittel definiert (siehe z. B. Creighton, Protein, W. Freeman & Co., S. 151 (1984)). Die Oberflächenzugänglichkeit jedes Rests wird unter Verwendung des Connolly-Programms (Lee et al., vorstehend zitiert) berechnet.

**[0057]** Unter Verwendung des vorstehenden Verfahrens und/oder der Ausrichtung der verschiedenen Sequenzen, die aus Svendsen et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1259 (1995) 9–17 ersichtlich sind, wurden die folgenden Lipidkontaktzonen von lipolytischen Enzymen, die von verschiedenen *Pseudomonas* sp. isoliert waren, identifiziert (die verwendete Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäurereste des reifen Enzyms, wie es in der vorstehend erwähnten Veröffentlichung (Svendsen et al. (1995)) dargelegt ist):

Lipase von *Pseudomonas cepacia*: 15–36, 110–167, 209–266, 281–304;  
Lipase von *Pseudomonas pseudoalcaligenes*: 15–35, 106–163, 200–232, 250–271;  
*Pseudomonas glumae*: 15–36, 110–167, 209–266, 281–304;  
Lipase von *Pseudomonas mendocina* (SD 702): 19–39, 111–166, 213–244, 258–279 (die Sequenz ist aus WO 95/14783 ersichtlich);  
Lipase von *Pseudomonas* sp. (Liposam®): 17–37, 109–161, 208–239, 253–274 (SEQ ID Nr. 99);  
Lipase von *Pseudomonas wisconsinensis*: 13–34, 106–161, 200–242, 250–270 (die Sequenz ist aus WO



96/12012 ersichtlich).

**[0058]** Die Lipidkontaktzone für keine Abdeckungsstruktur enthaltenden lipolytischen Enzyme können aus der wie in einer Struktur oder in einem Modell der dreidimensionalen Struktur des lipolytischen Enzyms bewerteten Topologie des Kerns bestimmt werden. Auf diese Weise wurde die Lipidkontaktzone des lipolytischen Enzyms von *Fusarium solani* pisi auf die Aminosäurereste 40–50, 78–91, 119–121, 147–154, 171–193 (wie auf der Basis des reifen Enzyms bewertet) bestimmt.

**[0059]** Einige lipolytische Enzyme umfassen auch eine Oberflächenschleifenstruktur, d. h. eine Abdeckung, die Teil der Lipidkontaktzone ist. Die Oberflächenschleifenstruktur bedeckt das aktive Serin, wenn das lipolytische Enzym in inaktiver Form vorliegt. Ist das Enzym aktiviert, verschiebt sich die Schleifenstruktur unter Freilegung des aktiven Serinrests. Die Oberflächenschleifenstruktur weist eine vorwiegend hydrophobe Innenfläche, die der Bindungstasche zugeneigt ist, und eine vorwiegend hydrophile Außenfläche auf.

**[0060]** Beispiele für eine Oberflächenschleifenstruktur aufweisende, lipolytische Enzyme sind diejenigen, die durch *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus* sp., *Penicillium camembertii* und *Absidia* sp., eine Anzahl von *Pseudomonas* sp., wie *Ps. Cepacia*, *Ps. Aeroginosa*, *Ps. Fragi* (vgl. den vorstehenden Abschnitt „Hintergrund der Erfindung“), *Candida rugosa* (Grochulski P. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, S. 12843) und die menschliche Bauchspeicheldrüsenlipase, die in Winkler et al., Nature 343, S. 771–74 (1990) beschrieben ist, hergestellt werden.

**[0061]** Die Oberflächenschleifenstruktur des lipolytischen Enzyms, das durch *Humicola lanuginosa* DSM 4109 hergestellt wird, ist durch Aminosäurereste an den Positionen 82–96 definiert. Die Oberflächenschleifenstruktur von lipolytischen Enzymen mit im Wesentlichen derselben dreidimensionalen Struktur (vgl. vorstehend) ist durch die Aminosäurereste definiert, die homologe Positionen zu denjenigen des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa*, d. h. 81–98 (für die Lipase von *Penicillium camembertii*), 82–99 (für *Rhizopus oryzae*), 80–97 (für *Rhizomucor miehei*), 80–97 (für die Lipase von *Absidia* sp.) belegen.

**[0062]** Die Oberflächenschleifenstruktur einer repräsentativen Anzahl an lipolytischen Enzymen, die durch *Pseudomonas* sp. hergestellt werden, sind: *Ps. glumae*: 135–155, *Ps. cepacia* 135–155, *Ps. pseudoalcaligenes* 132–152, Lipase von *Pseudomonas* sp. (SD705) (Liposam®) 129–149, dargestellt in SEQ ID Nr. 99.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

### Das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung

**[0063]** Vorzugsweise kann das lipolytische Enzym der Erfindung eine noch höhere Fettentfernungsfähigkeit als vorstehend angegeben bewirken. Demzufolge kann in einer bevorzugten Ausführungsform die das lipolytische Enzym der Erfindung umfassende Detergenzzusammensetzung A und/oder B mindestens 15%, wie mindestens 20% mehr Fett als die kein lipolytisches Enzym umfassende Detergenzzusammensetzung A bzw. B, beim Testen in einem hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest in einer Konzentration von 12.500 LU/l entfernen. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem lipolytischen Enzym um eines, das, wenn es in Detergenzzusammensetzung A und/oder B vorliegt, gewährt, dass die Detergenzzusammensetzung mindestens 25%, wie mindestens 30% oder 35% oder 40% oder 50% mehr Fett als Detergenzzusammensetzung A und/oder B ohne das lipolytische Enzym beim Testen in einem wie hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest entfernt.

**[0064]** Die Konzentration des lipolytischen Enzyms, das in dem vorstehend beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest (d. h. 12.500 LU/l) verwendet wird, kann für praktische Anwendungen als hoch betrachtet werden, wurde jedoch für Testzwecke ausgewählt, um die analytische Variation zu minimieren. Eine realistischere Konzentration beträgt 1.250 LU/l, die in einer alternativen Ausführungsform zum Definieren der fettentfernenden Fähigkeit eines lipolytischen Enzyms der Erfindung verwendet werden kann. Demzufolge handelt es sich in einer weiteren Ausführungsform bei dem lipolytischen Enzym um eines, das mindestens 15%, wie mindestens 20% mehr Fett als die das lipolytische Enzym nicht umfassende Detergenzzusammensetzung A und/oder Detergenzzusammensetzung B bei Verwendung in einem hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest in einer Konzentration von 1.250 LU/l entfernen kann. In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform gewährt das lipolytische Enzym, wenn es in der Detergenzzusammensetzung A und/oder B in einer Konzentration von 1.250 LU/l vorliegt, dass die Detergenzzusammensetzung mindestens 25%, wie mindestens 30% oder 35% mehr Fett als die Detergenzzusammensetzung A und/oder B ohne das lipolytische Enzym bei Verwendung in einem wie hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest entfernt.



**[0065]** In bevorzugten Ausführungsformen kann das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung Folgendes entfernen:

- beim Vorliegen in einer Detergenzzusammensetzung A in einer Konzentration von 1.250 LU/l mindestens 15% mehr Fett von einem fettbeschmutzten Textilmuster als Detergenzzusammensetzung A ohne Enzym,
- beim Vorliegen in Detergenz A in einer Konzentration von 12.500 LU/l mindestens 40% mehr Fett von einem fettbeschmutzten Textilmuster als Detergenzzusammensetzung A ohne das Enzym,
- beim Vorliegen in Detergenzzusammensetzung B in einer Konzentration von 1.250 LU/l mindestens 15% Fett von einem fettbeschmutzten Textilmuster als Detergenzzusammensetzung B ohne das Enzym,
- beim Vorliegen in Detergenz B in einer Konzentration von 12.500 LU/l mindestens 15% mehr Fett von einem fettbeschmutzten Textilmuster als Detergenzzusammensetzung B ohne das Enzym

beim Testen in einem wie hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest.

**[0066]** In Beispiel 5 hier ist ein Vergleich zwischen der Fettentfernungsfähigkeit von lipolytischen Enzymen der Erfindung und derjenigen von lipolytischen Enzymen, die in WO 94/03578 beschrieben sind und von welchen behauptet wird, dass sie einen Durchwaschungseffekt aufweisen, dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Enzyme der Erfindung wesentlich mehr Fett in einer Ein-Zyklus-Waschung als die Enzyme des Fachgebiets entfernten. Der Vergleich zwischen den Enzymen wurde durch Verwendung desselben Tests durchgeführt.

**[0067]** Während es sich bei dem lipolytischen Enzym der Erfindung um ein beliebiges der vorstehend erwähnten lipolytischen Enzymtypen wie eine Aktivität gegenüber Ester- und/oder Phospholipid-Bindungen aufzeigende Hydrolase handeln kann, ist es bevorzugt, dass das Enzym ein lipolytisches Enzym ist, das Aktivität gegenüber Esterbindungen in Mono-, Di- und/oder Triglyceriden und/oder Aktivität gegenüber Cutin aufzeigt. Es wird im Allgemeinen erwogen, dass solche Enzyme als Detergenzenzyme von hohem Interesse sind.

**[0068]** Im Abschnitt Materialien und Verfahren und in Beispiel 5 sind weniger geeignete Tests zum Identifizieren von lipolytischen Erstwaschenzymen bereitgestellt. Diese Tests können zum Identifizieren von natürlich vorkommenden lipolytischen Erstwaschenzymen verwendet werden. Spezieller werden zum Identifizieren eines natürlich vorkommenden erfindungsgemäßen lipolytischen Erstwaschenzyms Enzymkandidaten von geeigneten Organismen, von welchen erwartet wird, dass sie lipolytische Enzyme herstellen, wie Organismen, die taxonomisch mit denjenigen verwandt sind, die im vorstehenden Abschnitt „Hintergrund der Erfindung“ angegeben oder später im Abschnitt „Lipolytische Stammenzyme“ beschrieben sind, oder Organismen, welche in einer Umgebung zu finden sind, die erfordert, dass der Organismus vorherrschende lipolytische Enzyme herstellt, gewonnen. Anschließend werden die gewonnenen Enzyme den hier offenbarten Tests für lipolytische Erstwaschenzyme unterzogen.

**[0069]** Obwohl das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung ein neues natürlich vorkommendes Enzym sein kann (identifiziert auf der Basis seiner Erstwaschleistung), ist es gegenwärtig bevorzugt, dass es sich bei dem Enzym um ein modifiziertes Enzym, d. h. ein Enzym, das durch Unterziehen eines lipolytischen Stammzyms einer Mutagenese und/oder einer chemischen Modifikation so hergestellt wird, dass ein modifiziertes lipolytisches Enzym resultiert, das Erstwaschaktivität aufweist, handelt. Bei dem lipolytischen Stammenzym kann es sich um eines handeln, das Erstwaschaktivität (die folglich durch die Mutagenese oder chemische Modifikation verbessert werden kann) aufweist, oder es kann ohne jegliche wie hier definierte Erstwaschaktivität vorliegen. In einer Ausführungsform wird vorteilhaft erwogen, dass das Stammenzym selbst eine zufriedenstellende Waschleistung oder sogar eine Erstwaschungsleistung aufweist, wobei die letztere Eigenschaften dann durch die Mutationen) verbessert wird. Stammenzyme mit einer zufriedenstellenden Waschleistung (jedoch nicht unbedingt einer Erstwaschungsleistung) können unter Verwendung des hier nachstehend in Beispiel 6 beschriebenen Tests ausgewählt werden.

**[0070]** Die chemische Modifikation von Aminosäureresten des Stammzyms kann z. B. gemäß den in WO 95/09909 offenbarten Prinzipien durchgeführt werden, wobei der Inhalt davon hier unter Bezugnahme eingebracht ist. Zum Beispiel kann die chemische Modifikation durch Kupplung eines Aminliganden (wie eines aminierten Zuckers, aminierten Alkohols oder aminierten Glucosamins oder von isomeren Formen davon) an die Carboxylgruppe von Glutaminsäure- oder Asparaginsäureresten im Enzym erzielt werden. Die chemische Modifikation kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren wie diejenigen, beschrieben in WO 95/09909, durchgeführt werden. Die chemische Modifikation kann an Säuregruppen so durchgeführt werden, dass negative Ladungen entfernt werden.

**[0071]** Die Mutagenese des lipolytischen Stammzyms wird vorzugsweise so durchgeführt, dass die Substratbindungsaktivität des Stammzyms verbessert wird. Spezieller wurde gefunden, dass eine verbesserte

Substratbindungsaffinität zum Erhalt einer Erstwaschaktivität führen kann. Es wird gegenwärtig in Erwägung gezogen, dass eine verbesserte Substratbindungsaffinität erzielt werden kann, indem die Oberfläche des Stammenzym weniger negativ gemacht wird. Demzufolge kann die Mutagenese so durchgeführt werden, dass mindestens ein an der Oberfläche des Stammenzym lokalisierter neutraler Aminosäurerest durch einen positiv geladenen Aminosäurerest ersetzt wird, wodurch ein an der Oberfläche des Stammenzym lokalisierter negativ geladener Aminosäurerest deletiert oder ein durch einen an der Oberfläche des Stammenzym lokalisierter negativ geladener Aminosäurerest mit einem neutral (einschließlich hydrophob) oder positiv geladenen Aminosäurerest ersetzt wird. An der Oberfläche des Enzyms lokalisierte Aminosäurereste können durch Verwendung des Conolly-Programms, auf welches in dem vorstehenden Abschnitt Definitionen Bezug genommen wurde, identifiziert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Mutagenese so durchgeführt, dass der Aminosäurerest D und/oder E entfernt und/oder günstigerweise durch Ersatz von R, K, W, F, Y, I, L eingefügt wird. Ein geeigneter Test für eine verbesserte Substratbindungsaffinität ist hier nachstehend in Beispiel 11 beschrieben.

**[0072]** Der Erstwascheffekt der vorstehenden Änderungen von einer negativen zu einer positiven Oberfläche kann durch Einbringung von die Struktur oder Stabilität optimierenden Veränderungen verbessert und/oder stabilisiert werden. Folglich kann z. B. die Einbringung eines Prolinrests in die Enzymoberfläche zu einer erhöhten proteolytischen und/oder thermischen Stabilität führen, die Einbringung von hydrophilen Aminosäureresten, z. B. Glu und/oder Asp zur Erhöhung der anionischen Detergenzstabilität führen und die Einbringung von hydrophoben Aminosäureresten die Absorption/Affinität des Enzyms erhöhen. Die Einbringung des vorstehenden Aminosäureresttyps kann entweder durch einfaches Einfügen der Aminosäurereste in eine geeignete Lokalisierung an der Oberfläche des Enzyms oder durch Ersetzen eines (von) Aminosäure(s)(en), der (die) an (einer) solchen Positionen) lokalisiert ist, erzielt werden.

**[0073]** Es wird gegenwärtig angenommen, dass es sich bei einem lipolytischen Erstwaschenzym der Erfindung um eine Variante eines lipolytischen Stammenzym handelt, das mindestens eine Mutation; jedoch typischerweise mehrere Mutationen umfasst, die vorzugsweise an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert ist oder sind. Die Variante kann mehrere Mutationen, die mindestens 2, 3, 4 oder 5 Mutationen, z. B. im Bereich von 1–20, 1–15, 1–12, 1–10, 1–9, 1–8, 1–7, 1–6, 1–5 oder 1–4 Mutationen, oder eine beliebige die enzymatische Aktivität des Enzyms nicht beeinträchtigende Anzahl an Mutationen umfassen.

**[0074]** Es wurde gefunden, dass Mutationen innerhalb sowie außerhalb der Lipidkontaktzone der hier offenbarten Stammlipase von *H. lanuginosa* zum Erzielen einer Erstwaschaktivität von Wichtigkeit sein kann. Demzufolge kann das eine Mutation tragende lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung aus einem lipolytischen Stammenzym durch Modifikation mindestens eines Aminosäurerests außerhalb der Lipidkontaktzone des Stammenzym und/oder durch Zugabe mindestens eines Aminosäurerests außerhalb der Zone und/oder durch Modifikation mindestens eines Aminosäurerests in der Lipidkontaktzone des Stammenzym und/oder durch Addition mindestens eines Aminosäurerests an die Kontaktzone konstruiert werden.

**[0075]** Demzufolge handelt es sich in einer anderen Ausführungsform bei dem lipolytischen Enzym der Erfindung um eines, das aus dem Stammenzym durch Modifikation, Deletion oder Substitution mindestens eines Aminosäurerests in die oder aus der Lipidkontaktzone des Stammenzym oder durch Addition mindestens eines Aminosäurerests an die Zone hergestellt ist. In noch einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem lipolytischen Enzym um eines, das aus dem Stammenzym durch Modifikation, Deletion oder Substitution mindestens eines Aminosäurerests außerhalb der Kontaktzone oder Addition mindestens eines Aminosäurerests an die Zone hergestellt ist, wobei der Aminosäurerest vorzugsweise an der Oberfläche des Stammenzym lokalisiert ist. Die Mutationen innerhalb und außerhalb der Lipidkontaktzone werden vorzugsweise so durchgeführt, dass die Substratbindungsaffinität des resultierenden modifizierenden Enzyms günstigerweise durch wie vorstehend beschriebene Entfernungen von negativen Entladungen verbessert wird.

**[0076]** Obwohl eine zielgerichtete Mutagenese nach den vorstehenden Prinzipien (und kombiniertem Test der resultierenden Enzymvarianten auf Erstwaschaktivität) zur Bildung von lipolytischen Erstwaschenzymen verwendet werden kann, ist es gegenwärtig bevorzugt, andere Verfahren zum Bilden von lipolytischen Erstwaschenzymen zu verwenden. Eine Zufallsmutagenese, insbesondere eine lokalisierte Zufallsmutagenese sowie Rekombination von homologen Genen in vivo wurden für diese Zwecke als besonders interessant befunden – diese Verfahren sind im Detail nachstehend beschrieben.

Lipolytisches Erstwaschenzym, das in einem nichtstrukturellen Teil seines C- oder N-Terminus modifiziert wurde

**[0077]** Es wurde überraschend gefunden, dass es möglich ist, einem lipolytischen Stammenzym einen Erstwascheffekt zu verleihen oder den Erstwascheffekt eines lipolytischen Stammenzym zu verbessern, indem mindestens eine N-terminale und/oder C-terminale Peptidaddition an oder in einen nichtstrukturellen Teil des Stammenzym in seiner reifen Form angebracht wird oder andere Änderungen in einen nichtstrukturellen Teil des C-terminalen und/oder N-terminalen Endes des reifen Stammenzym eingebracht werden.

**[0078]** Demzufolge handelt es sich in einer weiteren stark bevorzugten Ausführungsform bei dem lipolytischen Erstwaschenzym der Erfindung um eine Variante eines lipolytischen Stammenzym, die verglichen mit dem Stammenzym an oder in einem nichtstrukturellen Teil des N- und/oder C-terminalen Endes des Stammenzym modifiziert wurde.

**[0079]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „modifiziert“ darauf hinweisen, dass i) eine geeignete Peptidaddition an dem Stammenzym angebracht wurde oder ii) ein oder mehrere Aminosäurereste im nichtstrukturellen Teil des C-terminalen und/oder N-terminalen Endes des reifen Stammenzym deletiert oder durch andere Aminosäurereste ersetzt wird/wurde oder iii) das Stammenzym durch eine Kombination aus i) oder ii) modifiziert wurde. Im vorliegenden Kontext können die auf diese Weise modifizierten, lipolytischen Erstwaschenzyme der Erfindung als modifiziertes Enzym der Erfindung bezeichnet werden.

**[0080]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „Peptidaddition“ darauf hinweisen, dass eine Erweiterung eines oder mehrerer aufeinander folgender Aminosäurereste entweder an eine oder an beide der N- und/oder C-terminalen Enden des Stammenzym addiert (d. h. an den ersten und/oder letzten Aminosäurerest des Stammenzym kondensiert) oder in den nichtstrukturellen Teil des N- und/oder C-terminalen Endes oder der N- und/oder C-terminalen Enden des Stammenzym eingefügt wurde. Das modifizierte Enzym kann eine Peptidaddition an entweder dem N-terminalen oder dem C-terminalen Ende oder sowohl dem N- als auch dem C-terminalen Ende des lipolytischen Stammenzym umfassen. Wird eine Peptidaddition sowohl am N- als auch am C-Terminus des Stammenzym angebracht, kann es sich bei der Peptidaddition an jedem Terminus entweder um dieselbe Aminosäuresequenz oder um eine andere Aminosäuresequenz handeln. Mehrfache Kopien derselben oder von anderen Peptidadditionen können eingefügt oder addiert werden.

**[0081]** Der Begriff „eine geeignete Peptidaddition“ wird verwendet, um darauf hinzuweisen, dass es sich bei der zu verwendenden Peptidaddition um eine handelt, die eine Erstwaschleistung oder eine verbesserte Erstwaschleistung bewirken kann. Die „Eignung“ der Peptidaddition kann durch eine vergleichbare Analyse der Erstwaschleistung eines modifizierten Enzym, an welchem die Peptidaddition angebracht wurde bzw. des entsprechenden Stammenzym überprüft werden. Die Waschleistung kann z. B. durch den im Abschnitt Materialien und Verfahren beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest bestimmt werden.

**[0082]** Es wird gegenwärtig erwogen, dass die verbesserte Erstwaschleistung durch die Peptidaddition teilweise aufgrund einer erhöhten Affinität des modifizierten lipolytischen Enzym gegenüber seinem Lipidsubstrat erfolgt (obwohl dies nicht der einzige Grund sein mag). Demzufolge handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform bei der Peptidaddition um eine, die dem modifizierten Enzym gegenüber seinem Lipidsubstrat eine erhöhte Affinität verleiht.

**[0083]** Der Begriff „reifes Enzym“ wird in seiner herkömmlichen Bedeutung, d. h. zum Hinweis auf die aktive Form des Enzym verwendet, die nach Expression und nachtranslationaler Verarbeitung (zum Entfernen von Pro- und/oder Präsequenzen) durch den fraglichen Hersteller-Organismus resultiert. Ist das Enzym ein sekretiertes Enzym, liegt das reife Enzym gewöhnlich in der Form des Enzym vor, die nach Sekretion resultiert. Spezifischer bedeutet dies, dass die Prä- und Propeptidsequenzen, falls sie vorliegen, von dem anfänglich translatierten Enzym, d. h. dem unverarbeiteten Enzym, entfernt wurden.

**[0084]** Der Begriff „nichtstruktureller Teil“ soll auf den Teil des N- bzw. C-terminalen Endes hinweisen, der außerhalb des ersten bzw. letzten Strukturelements liegt, wie ein  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblatt des gefalteten reifen Enzym hinweisen. Der nichtstrukturelle Teil kann leicht in einer dreidimensionalen Struktur oder einem dreidimensionalen Modell des fraglichen Enzym identifiziert werden. Typischerweise umfasst der nichtstrukturelle Teil die ersten oder letzten etwa 1 bis 20 Aminosäurereste der das Enzym bildenden Aminosäuresequenz. Für Enzyme mit einer zu derjenigen des lipolytischen Enzym von *H. lanuginosa* ähnlichen dreidimensionalen Struktur kann die Einfügung in dem Teil des Enzym durchgeführt werden, der einem „nichtstrukturellen Teil“ des lipolytischen Enzym von *H. lanuginosa* entspricht.

**[0085]** Der nichtstrukturelle Teil des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* umfasst gewöhnlich die ersten oder letzten etwa 1 bis 20 Aminosäureresten des reifen Enzyms.

**[0086]** Es wird gegenwärtig angenommen, dass die Fähigkeit der Peptidaddition zum Bereitstellen des gewünschten Erstwascheffekts z. B. von der Identität des zu modifizierenden Stammenzym, der Struktur (einschließlich der Länge) der Peptidaddition, dem Einfluss der Peptidaddition auf die Struktur des gesamten lipolytischen Enzyms, der Natur oder Funktionalität von Aminosäureresten der Peptidaddition usw. abhängt. Eine Voraussetzung dafür, dass die Peptidaddition den gewünschten Effekt bereitstellen kann, liegt natürlich darin, dass das die Peptidaddition enthaltende, modifizierte Enzym in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimierbar ist. Die folgenden allgemeinen Erwägungen können für den Aufbau einer geeigneten Peptidaddition von Relevanz sein:

**[0087]** Länge der Peptidaddition: Es wurde gefunden, dass variierende Anzahlen an Aminosäureresten enthaltende Peptidadditionen den gewünschten Erstwascheffekt bereitstellen können, und folglich ist es nicht möglich, eine genaue Anzahl an Aminosäureresten zu identifizieren, die in der erfindungsgemäß zu verwendenden Peptidaddition vorliegen müssen. Es wird erwogen, dass die obere Grenze der Anzahl an Aminosäureresten unter anderem durch den Einfluss der Peptidaddition auf die Expression, die Struktur und/oder die Aktivität des resultierenden modifizierten Enzyms bestimmt wird. Es wird angenommen, dass die Peptidaddition eine wesentliche Anzahl an Aminosäureresten umfassen kann, jedoch ohne dass diese Aminosäurereste zu dem gewünschten Erstwascheffekt beitragen müssen (sogar wenn die Peptidaddition eine wesentliche Anzahl an Aminosäureresten enthält, muss nur eine geringe Anzahl davon die gewünschte Funktion bereitstellen, wobei diese geringe Anzahl den funktionellen Teil der Peptidaddition bezeichnen kann). Bei der Haupterwägung in Bezug auf die untere Grenze der Anzahl an Aminosäureresten der Peptidaddition handelt es sich gewöhnlich darum, dass die Anzahl ausreichend sein sollte, um den gewünschten Erstwascheffekt bereitzustellen.

**[0088]** Die Peptidaddition kann folglich einen einzigen Aminosäurerest oder eine Aminosäurekette mit 2 bis 500 Aminosäuren wie 1 bis 200 oder 2 bis 100, vorzugsweise 2 bis 50 wie 3 bis 50, noch stärker bevorzugt 7 bis 55 und noch stärker bevorzugt zwischen 1 und 15 wie zwischen 1 und 10 oder 1 und 7, insbesondere zwischen 4 und 10 wie 4 und 7 Aminosäuren umfassen.

**[0089]** Stabilität: Die Peptidaddition sollte vorzugsweise so ausgewählt sein, dass ein modifiziertes lipolytisches Enzym mit einer stabilen Peptidaddition und einer akzeptablen strukturellen Stabilität des Stammenzym bereitgestellt wird. Zum Beispiel kann eine Peptidaddition, die selbst ein Strukturelement wie ein  $\alpha$ -Helix oder ein  $\beta$ -Faltblatt bildet, das resultierende modifizierte Enzym stabilisieren und folglich im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Peptidsequenzen, die solche Strukturen bilden können, sind auf dem Fachgebiet bekannt. In einer anderen Ausführungsform kann eine verbesserte strukturelle Stabilität durch Einbringen von Cysteinbrücken in das modifizierte lipolytische Enzym der Erfindung bereitgestellt werden. Zum Beispiel kann eine Cysteinbrücke zwischen der Peptidaddition und dem reifen Teil des Enzyms aufgebaut werden, wenn mindestens einer der Aminosäurereste der Peptidaddition ein Cysteinrest ist, der so lokalisiert ist, dass er eine kovalente Bindung an einen Cysteinrest im reifen Teil des Enzyms bilden kann. Liegt kein geeignetes Cystein im reifen Enzym vor, kann ein Cystein an einer geeigneten Lokalisierung des Stammenzym günstigerweise durch Ersetzen eines Aminosäurerests des Stammenzym, von welchem erwogen wird, dass er für die Aktivität unwichtig ist, eingefügt werden.

**[0090]** Zusätzlich kann es erwünscht sein, dass mindestens einer der Aminosäurereste der Peptidaddition so ausgewählt ist, dass er die Peptidaddition für proteolytische Zersetzung durch proteolytische Enzyme der zur Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms verwendeten Wirtszelle unempfindlich ist. Zum Beispiel kann die Peptidaddition mindestens einen und vorzugsweise mindestens zwei Prolinreste umfassen. Vorzugsweise umfasst die Peptidaddition 1–5, wie 1–4 oder 1–3 oder zwei oder einen Prolinrest(e). Der (die) Prolinrest(e) ist (sind) vorzugsweise an der proteolytischen Spaltungsstelle oder in ihrer Nähe platziert. In einer anderen Ausführungsform kann es sich bei der Peptidaddition um eine handeln, die der modifizierten Lipase eine stabile Proteaseschleife verleiht, z. B. wie in EP 407 225 oder WO 93/11254 beschrieben.

**[0091]** Die Natur von Aminosäureresten der Peptidaddition: Wie vorstehend angegeben und ohne an jegliche Theorie gebunden zu sein, wird gegenwärtig angenommen, dass die verbesserte Leistung teilweise aufgrund einer erhöhten Affinität des modifizierten lipolytischen Enzyms gegenüber dem durch die Peptidaddition bereitgestellten Substrat erfolgen kann. Insbesondere wird angenommen, dass vorteilhafte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Lipidoberfläche und den im modifizierten Enzym vorliegenden positiv geladenen und/oder hydrophoben Aminosäureresten erhalten werden können. Demzufolge ist es be-

sonders bevorzugt, dass das modifizierte Enzym der Erfindung eine Peptidaddition mit mindestens einer positiven Ladung wie mindestens 2, 3, 4 oder mehreren positiven Ladungen umfasst oder unterschiedlich exprimiert ist, wobei eine wesentliche Anzahl der Aminosäurereste der Peptidaddition positiv geladen und/oder hydrophob ist.

**[0092]** Analog dazu und zum Reduzieren der negativen Ladung in einem nichtstrukturellen Ende des Stammenzym ist es bevorzugt, mindestens einen wie zwei oder mehrere negativ geladene Aminosäurereste aus einem nichtstrukturellen N-terminalen oder C-terminalen Teil des Stammenzym der Wahl, insbesondere aus dem Teil der Stammlipase zu entfernen, die aus den 1–5 ersten oder letzten N-terminalen oder C-terminalen Aminosäureresten wie 1–4 oder 1–3 oder 1–2 konstruiert ist. Der negativ geladene Aminosäurerest kann entweder durch einen neutralen, einen positiv geladenen oder einen hydrophoben Aminosäurerest entfernt oder ersetzt werden. Zum Beispiel kann es sich bei dem zu entfernenden negativ geladenen Aminosäurerest um E oder D handeln, der mit entweder den positiv geladenen Aminosäureresten R, K oder H, den neutralen Aminosäureresten S, T, G oder Q oder den hydrophoben Aminosäureresten A, I, W, F oder L ersetzt werden kann. Gleichmaßen kann ein neutraler Aminosäurerest eines nichtstrukturellen N-terminalen oder C-terminalen Teils des Stammenzym mit einem wie vorstehend definierten positiv geladenen oder hydrophoben Aminosäurerest ersetzt werden.

**[0093]** Demzufolge kann das modifizierte lipolytische Enzym der Erfindung zusätzlich oder als Alternative zu einer N-terminalen und/oder C-terminalen Verlängerung eine Mutation in dem nichtstrukturellen C-terminalen und/oder N-terminalen Ende des Stammenzym umfassen, wobei die Mutation das Deletieren oder Ersetzen eines negativ geladenen Aminosäurerests des nichtstrukturellen Teils mit einem positiv geladenen oder neutralen Aminosäurerest oder mit einem hydrophoben Aminosäurerest einschließt.

**[0094]** Liegt eine Peptidaddition sowohl im N- als auch im C-terminalen Teil des Stammenzym vor, kann die Peptidaddition an oder in jedem der terminalen Enden dieselbe oder eine andere Aminosäuresequenz aufweisen.

**[0095]** Eignungstest der Peptidaddition: Die Wirkung der Verwendung einer vorgegebenen Peptidaddition, die z. B. auf der Basis der vorstehenden Prinzipien aufgebaut ist, kann durch Konstruieren eines die Peptidaddition enthaltenden modifizierten lipolytischen Enzym und Testen der Eigenschaften des resultierenden Enzym auf Erstwaschaktivität getestet werden.

**[0096]** Die Peptidaddition kann in folgender Weise verallgemeinert werden.

**[0097]** Der erste Rest (ab den äußeren Resten gezählt) wird als „a“, der zweite als „b“, der dritte als „c“ bezeichnet, usw. Folglich wird im Falle einer N-terminalen Addition der erste Aminosäurerest als „a“ bezeichnet und im Falle einer C-terminalen Addition der letzte Aminosäurerest als „a“ bezeichnet.

**[0098]** In einer wichtigen Ausführungsform der Erfindung besteht die Peptidaddition aus 1–7 Aminosäuren. Eine solche Peptidaddition, die sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende des Stammenzym angebracht werden kann, kann bezeichnet werden als:

- a (Peptidaddition mit einer Aminosäure)
- a-b (Peptidaddition mit zwei Aminosäuren)
- a-b-c (Peptidaddition mit drei Aminosäuren)
- a-b-c-d (Peptidaddition mit vier Aminosäuren)
- a-b-c-d-e (Peptidaddition mit fünf Aminosäuren)
- a-b-c-d-e-f (Peptidaddition mit sechs Aminosäuren)
- a-b-c-d-e-f-g (Peptidaddition mit sieben Aminosäuren)

**[0099]** Jeder Buchstabe definiert einen Aminosäurerest.

**[0100]** a, b, c, d, e, f und g unabhängig eine beliebige Aminosäure, einschließlich Alanin (A), Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I), Prolin (P), Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Methionin (M), Glycin (G), Serin (S), Threonin (T), Cystein (C), Tyrosin (Y), Asparagin (N), Glutamin (Q), Aspartamsäure (D), Glutaminsäure (E), Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H) darstellen.

**[0101]** In spezifischen Ausführungsformen stellen a, b, c, d, e, f und g unabhängig eine der folgenden Aminosäuren dar:

a: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Arg, Cys oder Lys,

b: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Pro, Arg, Lys, Cys oder His,  
 c: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Pro, Arg, Cys oder Lys,  
 d: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Ser, Pro, Arg, Cys oder Lys,  
 e: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Ala, Glu, Cys oder Asp,  
 f: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Ala, Glu, Cys oder Asp,  
 g: Leu, Ile, Val, Trp, Phe, Pro, Arg, Lys, Cys oder Met.

**[0102]** In einer bevorzugten Ausführungsform stellt mindestens einer wie ein, zwei, drei oder vier von a, b, c, d, e, f oder g eine positiv geladene Aminosäure, d. h. Arg (R) oder Lys (K) oder eine hydrophobe Aminosäure, d. h. Leu, Ile, Val, Trp oder Phe dar.

**[0103]** Wie vorstehend angegeben und abhängig von der Wirtszelle der Wahl wird im Allgemeinen angenommen, dass es wichtig ist, dass die Peptidaddition mindestens einen Prolinrest umfasst, um das modifizierte lipolytische Enzym während der Verarbeitung des Enzyms durch die Wirtszelle der Wahl gegen proteolytische Zersetzung zu schützen. Es kann erwünscht sein, dass der Prolinrest Position zwei (d. h. b) und/oder drei (d. h. c) der Peptidaddition oder eine Position nahe an den gewünschten Spaltungspunkten (d. h. den Punkt, an welchen angenommen wird, dass die Verarbeitung durch die fragliche Wirtszelle stattfindet) belegt. Demzufolge stellt in einer Ausführungsform b und gegebenenfalls c der Peptidaddition Pro dar.

**[0104]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung stellt a-b SP (Ser-Pro), A-P oder Q-P dar. Enthält die Peptidaddition mehrere Aminosäurereste, z. B. zwischen 4 und 7 Aminosäurereste, weist die Peptidaddition die allgemeine Formel SPcd, SPcde, SPcdef, SPcdefg oder APcd, APcde, APcdef, APcdefg oder QPcd, QPcde, QPcdef, QPcdefg auf. In jeder dieser Formeln können c, d, e, f und g eine beliebige Aminosäure darstellen. Jedoch sind die vorstehend erwähnten Aminosäuregruppen bevorzugt.

**[0105]** In einer anderen Ausführungsform umfasst a-b mindestens einen positiven Aminosäurerest (d. h. Arg und Lys) oder hydrophoben Aminosäurerest (d. h. Leu, Ile, Val, Trp und Phe).

**[0106]** Spezifischerweise kann es sich bei der auf das lipolytische Stammenzym angewandten Peptidaddition vorteilhaft um eine der folgenden Aminosäurereste oder Peptide handeln:

Arg (R) oder Lys (K) oder Leu (L) oder Ile (I) oder  
 Val (V) oder Trp (W) oder Phe (F) oder

Arg-Pro (RP) oder

Lys-Lys (KK) oder

Arg-Lys (RK) oder

Lys-Arg (KR) oder

Arg-Arg (RR) oder

Arg-Arg-Pro (RRP) oder

Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp (RPVSQD)

Ser-Pro-Ile-Arg-Met (SPIRM) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg (SPIRAR) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg (SPIRPR) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg (SPIRER) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys (SPIRK), oder

Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SPIKK) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro (SPIRRP) oder

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg (SPPRR) oder

Ser-Pro-Iso-Pro-Arg (SPIPR) oder

Ser-Pro-Arg-Pro-Arg (SPRPR) oder

Ser-Pro-Ile-Arg (SPIR) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg (SPIRR) oder

Ser-Cys-Ile-Arg-Arg (SCIRR) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SPIRPRP) oder

Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SCPIRPRP) oder

Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr (SPRRPR) oder

Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu (SPFRPKL) oder

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro (SPPRRP) oder

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu (SPIRRE) oder

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro (SPPRPP) oder

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg (SPPRPR) oder

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro (SPPWWP) oder  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro (SPPWRP) oder  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro (SPPRWP) oder  
 Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp (SHWRRW) oder  
 Ser-His-Trp-Arg-Lys (SHWRK) oder  
 Ser-His-Trp-Arg-Arg (SHWRR) oder  
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK),  
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP)  
 Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (GPIRPRP) oder  
 Leu-Pro-Phe-Arg-Gln-Srg-Pro (LPFRQRP) oder  
 Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asn-Ala (SRSRHNA) oder  
 Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg (IPIRPRR) oder  
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP) oder  
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK) oder  
 Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg (WRWRWR) oder  
 Gln-Pro-Ile-Arg-Arg (QPIRR) oder  
 Ser-His-Trp-Gln-Gln (SHWQQ) oder  
 Ser-Ala-Leu-Arg-Pro-Arg-Lys (SALRPRK).

**[0107]** Auch erfindungsgemäß erwogen sind Additionen, die mehr als 7 Aminosäuren wie 8 bis 15 Aminosäuren umfassen.

**[0108]** Solche Peptide können verallgemeinert werden als:

a-b-c-d-e-f-g-h (Peptid mit 8 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i (Peptid mit 9 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j (Peptid mit 10 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k (Peptid mit 11 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l (Peptid mit 12 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m (Peptid mit 13 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n (Peptid mit 14 Aminosäuren)  
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n-o (Peptid mit 15 Aminosäuren).

**[0109]** a bis o können beliebige der vorstehend erwähnten zwanzig Aminosäuren darstellen.

**[0110]** Die a-g-Erweiterung kann wie vorstehend in Bezug auf eine 1 bis 7 Aminosäurereste umfassende Peptidaddition definiert werden.

**[0111]** h, i, j, k, l, m, n, o können wie vorstehend erwähnt eine beliebige Aminosäure, vorzugsweise eine der folgenden Aminosäuren darstellen: Arg, Lys, Ala, Val, Trp, Ile, Phe, Ser oder Pro.

**[0112]** Spezifische Beispiele für solche Additionen sind nachstehend aufgezählt:

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (RPRPRPRP) oder  
 Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SSTRASPIKK) oder  
 Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (AWWPSPRPRP) oder  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP) oder  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS) oder  
 Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro (SPKRKPRP) oder  
 Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys (SQRIKQRIK) oder  
 Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPPRPRP) oder  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg (SPIRPRPRPR) oder  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro (SPIRKAWWP) oder  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPPKASPRQRP) oder  
 Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg (SPIRPRPSPIRPRP) oder  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg (SPPRWPRR) oder  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPRWPRW) oder  
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPRWPW) oder  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg (SPPWRPRR) oder  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPWWPRW) oder  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPWWPW) oder  
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp (SPPWWPWW) oder



Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPWPRPRP) oder  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser (APPPRPRLLPIS) oder  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro (APPPTRRQSP) oder  
 Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro (APPPRTIPRSSP).

**[0113]** In jeder beliebigen der vorstehend spezifizierten Peptidadditionen (ob umfassend 1 bis 7 oder 1 bis 15 Aminosäurereste), wobei die Position „a“ ein Ser, Ala, Arg, Lys oder Pro darstellt, kann das Ser mit Ala, Arg, Lys oder Pro, das Ala mit Ser, Arg, Lys oder Pro und das Arg, Lys oder Pro mit Ala oder Ser ersetzt werden.

**[0114]** Es ist zu betonen, dass die vorstehende Peptidaddition entweder N-terminal und/oder C-terminal ist. Beispiele für modifizierte lipolytische Enzyme mit sowohl einer N- als auch einer C-terminalen Peptidaddition schließen alle Kombinationen der Peptidadditionen, speziell die vorstehend erwähnten ein. Zwei spezifische Beispiele dafür sind die N-terminale Addition SPIRRP zusammen mit der C-terminalen Addition RRP oder RR.

**[0115]** Zusätzlich zu den vorstehend spezifizierten Peptidadditionen wurde gefunden, dass eine geeignete Peptidaddition einfach durch einen Teil der oder die gesamte Propeptidsequenz gebildet sein oder diese umfassen kann, die gewöhnlich mit dem fraglichen lipolytischen Stammenzym verbunden ist. Folglich können z. B. in Bezug auf lipolytische Erstwaschenzymvarianten von *H. lanuginosa*, die eine geeignete Peptidaddition umfassen, SPIRR, d. h. einen Teil der normalen Propeptidsequenz der lipolytischen Enzymsequenz von *H. lanuginosa* umfassen oder aus dieser gebildet sein.

**[0116]** Ist die Peptidaddition in den nichtstrukturellen Teil des Stammenzym eingefügt, kann sie einen oder mehrere der Aminosäurereste des nichtstrukturellen Teils ersetzen. Zum Beispiel kann die Peptidaddition einen oder mehrere Aminosäurereste ersetzen, die z. B. die ersten Aminosäurereste, z. B. 1–5, des N-terminalen Endes und/oder die letzten Aminosäuren, z. B. 1–5, des Enzyms (d. h. die Aminosäurereste 1–5 des C-terminalen Endes) belegen. Zum Beispiel kann die Peptidaddition (einen) Aminosäurerest(e) 1 und/oder 2 und/oder 3 und/oder 4 und/oder 5 usw. von einem Ende des Stammenzym ersetzen.

**[0117]** Ist das Stammenzym eine Variante der Lipase von *H. lanuginosa*, die Aminosäuremodifikationen in ihrem strukturellen, reifen Teil umfasst, ist es vom besonderem Interesse, beliebige der vorstehenden Peptidadditionen (angebracht im N-Terminus) mit einer Deletion des ersten Aminosäurerests des reifen Stammenzym, d. h. des 1E, zu kombinieren.

#### Verfahren des Anbringens einer Peptidaddition an ein lipolytisches Stammenzym

**[0118]** Obwohl ein lipolytisches Erstwaschenzym der Erfindung durch Addieren (Kondensieren oder Einfügen) einer synthetisch hergestellten Peptidaddition an das fragliche lipolytische Stammenzym erhalten werden kann, ist es gegenwärtig bevorzugt, dass das modifizierte Enzym der Erfindung hergestellt wird durch i) Modifizieren der Nukleotid-, vorzugsweise DNA-Sequenz, die das Stammenzym so kodiert, dass die gewünschte Peptidaddition kodiert wird, die auf das (die) N- und/oder C-terminale(n) Ende(n) des Stammenzym kodiert wird (z. B. durch Einfügen einer Nukleinsäure-(vorzugsweise DNA-)Sequenz, die die Peptidaddition an der relevanten Lokalisierung der das Stammenzym kodierenden Nukleinsäure-(vorzugsweise DNA-)Sequenz kodiert), ii) Expressieren der resultierenden modifizierten Nukleinsäure-(vorzugsweise DNA-)Sequenz in einem geeigneten Expressionssystem und iii) Gewinnen des resultierenden modifizierten Enzyms.

**[0119]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „angebracht an“ darauf hinweisen, dass die Addition am N- und/oder C-terminalen Ende (z. B. dem ersten oder letzten Aminosäurerest) des reifen Enzyms kondensiert oder in einem nichtstrukturellen Teil des N-terminalen und/oder C-terminalen Ende des reifen Enzyms eingefügt ist.

**[0120]** Viele Enzyme werden als „Präproenzyme“, d. h. als Enzyme, die aus dem reifen Enzym, einem sekretorischen Signalpeptid (d. h. Präpeptid) und einem Propeptid bestehen, bezeichnet. Das Präproenzym wird intrazellulär so verarbeitet, dass es in das Fermentationsmedium sekretiert wird, aus welchem das reife Enzym isoliert und/oder gereinigt wird. Die Peptidaddition des Stammenzym kann durch Anbringen von Nukleinsäuresequenzen, die die gewünschten Peptidadditionen stromaufwärts (für N-terminale Peptidadditionen) und/oder stromabwärts (für C-terminale Peptidadditionen) kodieren, an die das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz durchgeführt werden.

**[0121]** Die Einfügung sollte in solcher Weise durchgeführt werden, dass das gewünschte modifizierte Enzym

(d. h. mit der (den) gewünschten Peptidaddition(en)) durch die Wirtszelle nach Transkription, Translation und Verarbeitung des Enzyms sekretiert wird. Der Begriff „Verarbeiten“ bedeutet in diesem Kontext das Entfernen von Prä- und Propeptiden (außer natürlich, wenn das Propeptid mit der gewünschten Peptidaddition identisch ist. Dies wird nachstehend behandelt).

**[0122]** Stromabwärts-Sequenzen (die eine C-terminale Addition kodieren), können zwischen die das Stammenzym und das terminierende Kodon kodierenden DNA-Sequenzen eingefügt werden. Umfasst jedoch die unverarbeitete DNA-Sequenz ein die DNA-Sequenz am C-terminalen Ende kodierendes Propeptid, kann die Einfügung/Addition der die Peptidaddition kodierenden DNA-Sequenz auch zwischen den das Pro-Peptid bzw. das reife Enzym kodierenden DNA-Sequenzen stattfinden.

**[0123]** In den meisten Fällen ist es möglich, das Stammpeptid stromaufwärts durch Einfügen einer die Peptidaddition kodierenden DNA-Sequenz zwischen die DNA-Sequenz, die das Propeptid oder Präpeptid kodiert (falls keine Prosequenz vorliegt) und der das reife Enzym kodierenden DNA-Sequenz zu erweitern.

**[0124]** Die die fragliche Peptidaddition kodierende DNA-Sequenz soll natürlich so ausgewählt sein, dass sie die Kodon-Vorlieben des für die Herstellung des lipolytischen Erstwaschenzyms der Erfindung bestimmten Expressionssystems abgeglichen werden.

**[0125]** Die Einfügung/Addition einer die Peptidaddition kodierenden DNA-Sequenz kann durch dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannte Standardtechniken durchgeführt werden (vgl. z. B. Sambrook et al., 1989). Dies schließt z. B. die Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Primern, z. B. beschrieben in US-Patent 4,683,202 oder R. K. Saiki et al., (1988), Science, 239, 487–491, ein. Wie die Expression und Sekretion einer (von) benachbarten DNA-Sequenzen) bereitgestellt wird, wird nachstehend beschrieben.

**[0126]** In Verbindung mit der vorliegenden Erfindung wurde gefunden, dass einige Wirtszellen zur Herstellung eines eine Peptidaddition umfassenden, lipolytischen Erstwaschenzyms ungeeignet sind, indem ein Teil der oder alle Peptidadditionen während der posttranslationalen oder einer anderen durch eine Wirtszelle durchgeführten Verarbeitung abgeschnitten wird oder werden. Demzufolge soll der Begriff „geeignetes Expressionssystem“ auf ein Expressionssystem (eine Wirtszelle und gegebenenfalls einen Expressionsvektor), das die Herstellung zumindest eines Teils des die Peptidaddition umfassenden, intakten gewünschten lipolytischen Erstwaschenzyms gewährt, d. h. auf ein Expressionssystem, das z. B. als Teil des posttranslationalen oder anderen Verarbeitens durch die Wirtszelle der Wahl einen Teil oder alle der Peptidadditionen nicht entfernt (und damit das Enzym ohne die gewünschte Peptidaddition herstellt) hinweisen. Anders ausgedrückt ist das Expressionssystem (einschließlich Wirtszelle, Züchtungsbedingungen und/oder Entfernungsbbedingungen) vorzugsweise so ausgewählt, dass der Hauptteil eines teilweisen Verarbeitens der Prä-, Pro- oder Präproform des lipolytischen Enzyms stattfindet, was dazu führt, dass mindestens 5%, wie mindestens 10%, wie mindestens 15%, wie mindestens 20%, wie mindestens 25%, wie mindestens 50%, wie mindestens 75% der hergestellten Enzymmoleküle die gewünschte Peptidaddition, z. B. die gesamte Prosequenz oder einen Teil davon umfassen. Typischerweise ist das zu verwendende Expressionssystem frei von einer oder mehreren die ungewünschte posttranslationale Verarbeitung ausübenden proteolytischen Aktivitäten oder um diese reduziert. Die Wahl des Expressionssystems und folglich der Wirtszelle hängt, wie es weiter nachstehend detailliert erörtert wird, von dem herzustellenden lipolytischen Enzym ab.

**[0127]** Während die Auswahl eines angemessenen Expressionssystems zur Herstellung eines lipolytischen Erstwaschenzyms der Erfindung, das eine Peptidaddition an seinem N- und/oder C-Terminus umfasst (insbesondere, wenn eine modifizierte DNA-Sequenz zur Herstellung verwendet wird), sorgfältig ausgewählt werden muss, wurde gefunden, dass, wenn es sich bei der Peptidaddition um das Propeptid oder einen Teil davon, verbunden mit dem fraglichen lipolytischen Stammenzym, handelt, die Peptidaddition (die folglich einen Teil der oder die gesamte Propeptidsequenz bildet) durch Expressieren einer das fragliche lipolytische Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz in einem Expressionssystem angebracht wird, das das translatierte Polypeptid in der normalen Weise nicht verarbeiten kann und damit zur Herstellung eines Enzyms führt, das einen Teil des oder das gesamte Propeptid(s) oder einer ähnlichen mit dem reifen Protein verbundenen Peptidsequenz vor seiner Verarbeitung umfasst. In diesem Fall bildet das Propeptid oder die ähnliche Peptidsequenz die Peptidaddition. Das Propeptid oder die ähnliche Peptidsequenz kann zu dem Stammenzym heterolog oder homolog sein und sowohl im N- als auch C-Terminus des Stammzyms vorliegen.

**[0128]** Demzufolge kann die Peptidaddition, wenn eine geeignete Aminosäurenerweiterung von Aminosäuren schon in der Präproform des Stammzyms kodiert ist und diese Aminosäurenerweiterung bei der Verar-

beitung des Enzyms durch ein vorgegebenes Expressionssystem abgeschnitten ist, durch Verändern des Expressionssystem zu einem System, in welchem eine Verarbeitung der Aminosäureerweiterung nicht stattfindet oder die Gensequenz zum Eliminieren der Posttranslationsverarbeitung, z. B. durch Sättigen des (der) Verarbeitungsenzyms(e) mit einem oder mehreren Kopien eines Pro-ähnlichen Peptids (wie eine der hier dargestellten Peptidadditionen) oder durch Verändern der Propeptidsequenz, z. B. zum Entfernen einer posttranslationalen Verarbeitungsstelle angebracht werden. In einem solchen Fall wird das Sekretionssignal-Präpeptid während oder nach der Sekretion abgeschnitten, was zu einem modifizierten Enzym führt, das aus dem Stammenzym besteht, das das Propeptid oder einen Teil davon oder eine ähnliche durch die entsprechende DNA-Sequenz kodierte Peptidsignalsequenz umfasst, d. h., wobei ein lipolytisches Enzym an entweder seinem N-terminalen oder C-terminalen Ende verlängert ist.

**[0129]** Mit anderen Worten kann das eine Peptidaddition umfassende lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung durch ein Verfahren aufgebaut und/oder hergestellt werden, das Folgendes umfasst:

Züchten einer Wirtszelle, die mit einer das lipolytische Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz transformiert wurde, einschließlich ihrer (Prä)Prosequenz unter Bedingungen, die zur Herstellung des zumindest einen Teil der gesamten Pro(Prä)sequenz umfassenden Enzyms geeignet sind, wobei es sich bei der Wirtszelle um eine handelt, die beim Verarbeiten des in das reife Enzym einzubringenden Proenzym unfähig oder unwirksam ist, und Gewinnen und gegebenenfalls Reinigen des erhaltenen modifizierten Enzyms.

**[0130]** Die das lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz kann beim Transformieren in die Wirtszelle auf einem Expressionsvektor vorliegen.

**[0131]** Die Wirtszelle kann von einem anderen Ursprung als das Stammenzym, z. B. von einer anderen Gattung, als diejenige, von welcher das Stammenzym abgeleitet ist, stammen oder eine andere posttranslationale Verarbeitungsmechanik als die Quelle des Stammenzym aufweisen. Es wurde gefunden, dass Hefezellen beim Anbringen von Peptidadditionen (in Form des Propeptids oder eines Teils davon) auf lipolytische Stammenzyme von Fadenpilzen, insbesondere lipolytische Enzymvarianten von *H. lanuginosa* aufgrund des Vergleichs mit den Fadenpilzzellen unterschiedlichen Verarbeitungssystemen der Hefezellen von besonderer Verwendung sind. Beispiele für geeignete Hefezellen für diesen Zweck sind Zellen, die von einem Stamm von *Saccharomyces* sp., insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* oder einem Stamm von *Hansenula* sp. abgeleitet sind.

**[0132]** In einer anderen und hoch bevorzugten Ausführungsform wurde das eine Peptidaddition umfassende, lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung durch ein Verfahren aufgebaut und/oder hergestellt, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Unterziehen einer das lipolytische Stammenzym mit einer Peptidaddition kodierenden DNA-Sequenz einer lokalisierten Zufallsmutagenese in der Peptidaddition oder in einem nichtstrukturellen Teil des C-terminalen oder N-terminalen Endes des Stammenzym,
- b) Exprimieren der in Schritt a) erhaltenen, mutierten DNA-Sequenz in eine Wirtszelle,
- c) Screenen nach Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym exprimieren, das eine verbesserte Leistung, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, aufweist,
- d) Selektieren eines mutierten lipolytischen Enzyms unter denjenigen, die aus Schritt c) resultieren, das, wenn es in Detergenzzusammensetzung A und/oder B mit 12.500 LU/l Detergenz vorliegt, mindestens 15% mehr Fett aus einem fettbeschmutzten Textilmuster als dieselbe Detergenzzusammensetzung ohne das Enzym in einem wie hier offenbarten Ein-Zyklus-Waschtest entfernen kann.

**[0133]** Durch diesen Zugang wurde eine Anzahl an äußerst vorteilhaften lipolytischen Erstwaschenzymen mit unterschiedlichen Peptidadditionen gebildet. Die in der zu mutagenisierenden DNA-Sequenz vorliegende Peptidaddition kann durch die Prosequenz oder einen gewöhnlich mit dem lipolytischen Stammenzym verbundenen Teil davon gebildet werden oder diese/n umfassen, oder es kann sich hierbei um eine beliebige andere Peptidaddition, z. B. eine der vorstehend veranschaulichten Peptidadditionen handeln. Jeder der Schritte a) bis d) kann, wie in den nachstehenden Abschnitten „Zufallsmutagenese“ und „Lokalisierte Zufallsmutagenese“ beschrieben, durchgeführt werden.

#### Das lipolytische Stammenzym

**[0134]** Das erfindungsgemäß zu modifizierende, lipolytische Stammenzym kann beliebigen Ursprungs sein. Folglich kann das Enzym vom Ursprung eines Säugers, einer Pflanze, eines Wirbeltiers oder beliebigen anderen Ursprungs sein. Jedoch ist es gegenwärtig bevorzugt, dass das Enzym mikrobiellen Ursprungs ist, da gefunden wurde, dass eine Anzahl an Mikrobenstämmen Enzyme von besonderer Verwendung für Detergenz-

zwecke herstellen.

**[0135]** Spezifischer kann das lipolytische Stammenzym von einem Pilz, d. h. einem Hefe- oder einem Fadenpilz abgeleitet sein. Zum Beispiel kann das Enzym von einem Fadenpilz der Klasse Plectomycetes, vorzugsweise der Ordnung von Eurotiales oder stärker bevorzugt der Familie wie Eremascaceae, Monoascaceae, Pseudoeurotiaceae und Trichocomaceae abgeleitet sein, wobei Letzteres Gattungen wie Emericella, Aspergillus, Penicillium, Eupenicillium, Paecilomyces, Talaromyces, Thermoascus und Sclerocleista enthält. Spezieller kann es sich bei dem Stammenzym um eines handeln, das von einem Stamm von Humicola sp., z. B. H. brevispora, H. lanuginosa, H. brevis var. thermoidea und H. insolens (US 4,810,414), einen Stamm von Rhizomucor sp., z. B. Rh. Miehei (EP 238 023), einem Stamm von Rhizopus sp., z. B. R. delemar (Hass et al., (1991), Gene 109, 107–113), R. niveus (Kugimiya et al., (1992) Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716–719) oder R. oryzae, einem Stamm von einem Candida sp., z. B. C. cylindracea (auch genannt C. rugosa) oder C. antarctica (WO 88/02775) oder der Lipase A oder B von C. antarctica (EP 214 761), einem Stamm von Fusarium sp., z. B. F. oxysporum (EP 130 064) oder F. solani pisi (WO 90/08446) oder Varianten davon (WO 94/14964), F. solani pisi (GB 2 296 011), einem Stamm von einem Venturia spp., z. B. V. inaequalis, einem Stamm von Colletotrichum spp., z. B. C. gloeosporioides oder C. lagenarium, einem Stamm von Geotricum, z. B. G. candidum (Schimada et al. (1989), J. Biochem., 106, 383–388), einem Stamm von Aspergillus, z. B. der lipolytischen Enzymvariante von A. niger oder einer Aspergillus sp. (EP 167 309) oder einem Stamm von einem Penicillium spp., z. B. P. spinulosum oder P. spinulosum oder P. camembertii (Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61–67) ableitbar ist.

**[0136]** Im vorliegenden Kontext soll „ableitbare Form“ nicht nur auf ein durch einen Stamm des fraglichen Organismus hergestelltes Enzym, sondern auch auf ein Enzym, das durch eine DNA-Sequenz kodiert ist, die von einem solchen Stamm isoliert und in einem Wirtsorganismus hergestellt wird, der mit der DNA-Sequenz transformiert ist, hinweisen. Weiterhin soll der Begriff auf ein Enzym hinweisen, das durch eine DNA-Sequenz synthetischen Ursprungs und/oder vom cDNA-Ursprung kodiert ist und die identifizierenden Eigenschaften des fraglichen Enzyms aufweist. Schließlich soll der Begriff Varianten des Enzyms, die z. B. eine oder mehrere Mutationen verglichen mit dem natürlich vorkommenden Enzym tragen, oder homologe Enzyme, bei welchen es sich um natürlich vorkommende Enzyme handeln kann, die von anderen Stämmen oder Organismen hergestellt sind, die z. B. durch Hybridisierung zu Oligonukleotidsonden isoliert werden können, die auf der Basis der Aminosäure- oder DNA-Sequenz von einem der vorstehenden Enzyme (die Hybridisierungsbedingungen beinhalten das Vorwässern in 5 × SSC und Vorhybridisieren für eine Dauer von 1 Stunde bei 40°C in einer Lösung aus 20% Formamid, 5 × Denhardt-Lösung, 50 mM Natriumphosphat, pH 6,8, und 50 g denaturierter beschallter Kalbsthymus-DNA, gefolgt von Hybridisierung in derselben Lösung, ergänzt mit 100 M ATP für eine Dauer von 18 Stunden bei 40°C) oder durch Verfahren, beschrieben von Sambrook et al., (1989) hergestellt werden, oder das mit den Enzymen immunologisch kreuzungsreaktiv ist (z. B. wie bestimmt durch das Verfahren von Hudson et al., 1989) umfassen.

**[0137]** Von besonderem Interesse als lipolytisches Stammenzym ist eines, das von einem Stamm von H. lanuginosa, z. B. von dem Stamm von H. lanuginosa DSM 4109, z. B. der in EP 305 216 beschriebenen reifen Form des Enzyms oder einer Variante davon, wie beschrieben in WO 92/05249, WO 94/01541, WO 94/14951, WO 94/25577, PCT/DK 94/00079 (alle von Novo Nordisk A/S), die hier unter Bezugnahme eingebracht sind, ableitbar ist.

**[0138]** In der vorliegenden Anmeldung wurde der Name Humicola lanuginosa verwendet, um ein bevorzugtes Stammenzym, d. h. dasjenige, das unmittelbar vorstehend erwähnt ist, zu identifizieren. In den letzten Jahren wurde jedoch H. lanuginosa auch Thermomyces lanuginosus (eine Spezies, die zum ersten Mal von Tsiklinsky im Jahre 1989 eingeführt wurde) genannt, da der Pilz morphologische und physiologische Ähnlichkeit mit Thermomyces lanuginosus zeigt. Demzufolge ist es klar, dass, wann immer auf H. lanuginosa Bezug genommen wird, der Begriff durch Thermomyces lanuginosus ersetzt werden könnte. Der DNA-kodierende Teil des 18S-Ribosomengens von Thermomyces lanuginosus (oder H. lanuginosa) wurde sequenziert. Die erhaltene 18S-Sequenz wurde mit anderen 18S-Sequenzen in der Genbankdatenbank verglichen, und eine phylogenetische Analyse unter Verwendung von Sparsamkeit (PAUP, Version 3.1.1, Smithsonian Institution, 1993) wurde ebenso durchgeführt. Dies ordnet deutlich Thermomyces lanuginosus der Klasse von Plectomycetes, wahrscheinlich der Ordnung von Eurotiales zu. Gemäß dem Entrez-Browser an der NCBI (National Center for Biotechnology Information) betrifft dies Thermomyces lanuginosus in Familien wie Eremascaceae, Monoascaceae, Pseudoeurotiaceae und Trichocomaceae, wobei letzteres Gattungen wie Emericella, Aspergillus, Penicillium, Eupenicillium, Paecilomyces, Talaromyces, Thermoascus und Sclerocleista enthält.

**[0139]** Das erfindungsgemäß zu modifizierende lipolytische Stammenzym kann von einem Bakterium ableitbar sein. Zum Beispiel kann die das lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz von einem Stamm

von *Pseudomonas* sp., wie *Ps. cepacia*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. mendocina* (auch *Ps. putida* genannt), *Ps. syringae*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. wisconsinensis* (WO 96/12012) oder *Ps. fragi*, einem Stamm von *Bacillus* spp., z. B. *B. subtilis* oder *B. pumilus* oder einem Stamm von *Streptomyces* sp., z. B. *S. scabies* ableitbar sein.

**[0140]** In Verbindung mit den Lipasen von *Pseudomonas* sp. wurde gefunden, dass Lipasen von den folgenden Organismen einen hohen Homologiegrad wie mindestens 60% Homologie, mindestens 80% oder mindestens 90% Homologie aufweisen, und es wird folglich erwogen, dass sie zu derselben Lipasefamilie gehören: *Ps. ATCC21808*, Lipase von *Pseudomonas* sp., im Handel erhältlich als Liposam®, *Ps. aeruginosa* EF2, *Ps. aeruginosa* PAC1R, *Ps. aeruginosa* PAO1, *Ps. aeruginosa* TE3285, *Ps. sp. 109*, *Ps. pseudoalcaligenes* M1, *Ps. glumae*, *Ps. cepacia* DSM3959, *Ps. cepacia* M-12-33, *Ps. sp. KWI-56*, *Ps. putida* IFO3458, *Ps. putida* IFO12049 (Gilbert, E. J., (1993)), *Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 634–645). Die Spezies *Pseudomonas cepacia* wurde in den letzten Jahren als *Burkholderia cepacia* umklassifiziert, wird jedoch in der vorliegenden Anmeldung *Ps. cepacia* genannt.

**[0141]** Spezifische Beispiele hierfür schließen ein lipolytisches Enzym von *Pseudomonas*, z. B. *Ps. fragi*, *Ps. stutzeri*, *Ps. cepacia* und *Ps. fluorescens* (WO 89/04361) oder *Ps. plantarii* oder *Ps. gladioli* (US 4,950,417) oder *Ps. alcaligenes* und *Ps. pseudoalcaligenes* (EP 218 272, EP 331 376 oder WO 94/25578 (welche Varianten des lipolytischen Enzyms von *Ps. pseudoalcaligenes* mit der Mutation M21S, M21L oder M21A offenbaren), die in EP 407 225 offenbarten Varianten von *Pseudomonas* sp. oder ein lipolytisches Enzym von *Pseudomonas* sp., wie das in WO 88/09367 und US 5,389,536 beschriebene lipolytische Enzym von *Ps. mendocina* oder wie in US 5,352,594 beschriebene Varianten davon ein.

**[0142]** Andere spezifische Beispiele schließen ein lipolytisches Enzym von *Bacillus*, wie das lipolytische Enzym von *B. subtilis* (Dartois et al., (1993), *Biochemica et Biophysica acta* 1131, 253–260) oder *B. stearothermophilus* (JP 64/7744992) oder *B. pumilus* (WO 91/16422) und ein lipolytisches Enzym von *Chromobacterium* (insbesondere ableitbar von *C. viscosum*) ein.

**[0143]** Spezifische Beispiele für die schon im Handel erhältlichen lipolytischen Enzyme, die als erfindungsgemäße lipolytische Stammenzyme dienen können, schließen Lipolase®, Lipolase® Ultra (erhältlich von Novo Nordisk A/S) ein.

**[0144]** Beispiele für andere lipolytische Enzyme, die speziell als erfindungsgemäß modifizierbar betrachtet werden, sind Lumafast®, d. h. ein lipolytisches Enzym von *Ps. mendocina* und Lipomax®, d. h. ein lipolytisches Enzym von *Ps. alcaligenes*, eine Lipase von *Fusarium solani* (Cutinase) von Unilever, eine Lipase von *Bacillus* sp. von Solvay-Enzymen (US 5,427,936, EP 528 828) und Liposam® (eine Lipase von *Ps. mendocina* von Showa Denko) und ferner die in WO 95/06720 beschriebene Lipase von *Pseudomonas* sp., die sequenziert wurde und von der gefunden wurde, dass sie die in SEQ ID Nr. 99 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, ein.

**[0145]** Es ist auch zu betonen, dass es sich bei dem erfindungsgemäß zu modifizierenden, lipolytischen Stammenzym um ein beliebiges der vorstehend erwähnten lipolytischen Enzyme und eine beliebige Variante, Modifikation oder Verkürzung davon handeln kann. Beispiele für solche Stammenzyme, die spezifisch erwogen werden, schließen die in WO 92/05249, WO 94/01541, WO 94/14951, WO 94/25577, WO 95/22615 beschriebenen Enzyme und wie in EP 407 225 beschriebene Protein-konstruierte Lipasevarianten, eine wie in US 5,352,594 beschriebene Protein-konstruierte Lipase von *Ps. mendocina*, eine wie in WO 94/14964 beschriebene Cutinasevariante, eine wie in EP-Patent 167 309 beschriebene Variante eines lipolytischen Enzyms von *Aspergillus* und eine wie in WO 95/06720 beschriebene Lipase von *Pseudomonas* sp., ein.

#### Spezifische lipolytische Erstwaschenzymvarianten von *H. lanuginosa*

**[0146]** Zur Bezugsvereinfachung sind spezifische Varianten der Erfindung unter Verwendung der folgenden Nomenklatur beschrieben: ursprüngliche Aminosäure(n):Position(en)substituierte Aminosäure(n).

**[0147]** Gemäß dieser Nomenklatur ist z. B. der Ersatz von Asparaginsäure in Valin in Position 96 dargestellt als:

Asp 96 Val oder D96V;

ist eine Deletion von Asparaginsäure in derselben Position dargestellt als:

Asp 96\* oder D96\*;

und ist eine Einfügung eines zusätzlichen Aminosäurerests wie Lysin dargestellt als:

Asp 96 ValLys oder D96VK;

sind mehrfache Mutationen durch Pluszeichen getrennt, d. h.:

Asp 96 Val + Glu 87 Lys oder D96V + E87K;

wodurch Mutationen in den Positionen 96 und 87 dargestellt sind, die Asparaginsäure und Glutaminsäure durch Valin bzw. Lysin ersetzen.

**[0148]** Kann ein oder können mehrere alternative Aminosäurereste in einer vorgegebenen Position eingefügt werden, wird dies als

D96V, N oder

D96V oder D96N angegeben.

**[0149]** Weiterhin sollte es klar sein, dass, wenn eine für Modifikation geeignete Position hier identifiziert ist, ohne dass eine beliebige spezifische Modifikation vorgeschlagen ist, jeder beliebige Aminosäurerest für den in der Position vorliegenden Aminosäurerest substituiert werden kann. Folglich sollte es klar sein, dass, wenn z. B. eine Modifikation einer Asparaginsäure in Position 96 erwähnt ist, jedoch nicht spezifiziert ist, die Asparaginsäure deletiert oder durch eine beliebige andere Aminosäure, d. h. eine beliebige von R, N, A, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V ersetzt werden kann oder ein weiterer Aminosäurerest an der Position eingefügt werden kann.

**[0150]** Schließlich sollte es klar sein, dass, wenn eine Mutation des lipolytischen Stammenzym von *H. lanuginosa* hier identifiziert ist, er eine Mutation eines Aminosäurerests einschließt, der eine homologe Position in einem lipolytischen Enzym belegt, das im Wesentlichen dieselbe Struktur oder eine andere Struktur einer Aminosäuresequenz aufweist, die mit derjenigen des Enzyms von *H. lanuginosa* (z. B. der hier erwähnten lipolytischen Enzyme *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Absidia* sp. und *Penicillium camembertii*) übereinstimmt. Die homologe Position kann leicht durch einen Vergleich der Strukturen identifiziert werden.

**[0151]** Die lipolytischen Enzymvarianten von *H. lanuginosa* können als Kombination von mindestens zwei verschiedenen Stammvarianten charakterisiert werden, von welchen gefunden oder wobei darauf hingewiesen wurde, dass sie einzeln eine gute Waschleistung oder andere wie vorstehend beschriebene interessante Eigenschaften aufweisen. Die gute Waschleistung kann z. B. wie in Beispiel 6 beschrieben bestimmt werden. Die Kombination zwischen den Stammvarianten kann zufällig oder spezifisch sein. In Verbindung mit der vorliegenden Erfindung wurde gefunden, dass besonders interessante Ergebnisse erhalten werden, wenn die zu kombinierenden Stammvarianten eine Mutation in mindestens einer, jedoch vorzugsweise mehreren der folgenden Positionen enthalten: 1, 2, 3, 4, 5, 19, 49, 53, 56, 57, 59, 62, 83, 85, 90, 94, 96, 97, 99, 101, 102, 111, 116, 126, 127, 137, 167, 170, 181, 187, 210, 221, 225, 234, 239, 249, 252, 256, 263, 264, 267, wie mindestens eine oder vorzugsweise mehrere der folgenden Mutationen:

E1K, E1S, V2G, S3T, Q4P, D5E, A19T, A49P, Y53C, E56K, D57G, G59V, D62R, S83T, S85F, I90F, N94K, F95L, D96A, D96H, D96L, L97M, E99K, N101S, D102Y, D111N, S116P, Q126R, K127C, D137G, D167G, S170P, F181L, V187A, E210K, E210V, W221 L, W221A, G225P, D234R, D234Y, E239C, Q249R, I252L, P256T, G263A, L264Q, T267R.

**[0152]** Es ist klar, dass die vorstehenden Mutationen oder mutierten Positionen auf demselben lipolytischen Stammenzym, jedoch vorzugsweise auf verschiedenen der verschiedenen zu kombinierenden lipolytischen Stammenzyme vorliegen.

**[0153]** Insbesondere wurde gefunden, dass es sich bei dem lipolytischen Erstwaschenzym von *H. lanuginosa* der Erfindung um eine Kombination aus mindestens zwei der folgenden lipolytischen Stammenzymvarianten von *H. lanuginosa* oder Teile dieser Varianten handeln kann:

(a) E56R + D57L + I90F + D96L + E99K

(b) E56R + D57L + V60M + D62N + S83T + D96P + D102E

(c) D57G + N94K + D96L + L97M

(d) E87K + G91A + D96R + I100V + E129K + K237M + I252L + P256T + G263A + L264Q

(e) E56R + D57G + S58F + D62C + T64R + E87G + G91A + F95L + D96P + K98I

(f) E210K

(g) S83T + N94K + D96N

(h) E87K + D96V

(i) N94K + D96A

(j) E87K + G91A + D96A

(k) D167G + E210V

(l) S83T + G91A + Q249R

(m) E87K + G91A

- (n) S83T + E87K + G91A + N94K + D96N + D111N
- (o) N73D + E87K + G91A + N94I + D96G
- (p) L67P + I76V + S83T + E87N + I90N + G91A + D96A + K98R
- (q) S83T + E87K + G91A + N92H + N94K + D96M
- (s) S85P + E87K + G91A + D96L + L97V
- (t) E87K + I90N + G91A + N94S + D96N + I100T
- (u) I34V + S54P + F80L + S85T + D96G + R108W + G109V + D111G + S116P + L124S + V132M + V140Q + V141A + F142S + H145R + N162T + I166V + F181P + F183S + R205G + A243T + D254G + F262L
- (v) N94K, D96A, Q249R,
- (w) E87K, G91A, D96W, D102N.

**[0154]** Verfahren, die zum Kombinieren von verschiedenen Stammvarianten geeignet 000000000sind, sind nachstehend im Abschnitt mit dem Titel „Kombination von lipolytische Enzyme kodierenden DNA-Sequenzen“ beschrieben. Ein besonders geeignetes Verfahren ist dasjenige, das hier im Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben ist.

**[0155]** In einer anderen Ausführungsform handelt es sich bei dem lipolytischen Erstwaschenzym der Erfindung um eine Variante des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* (wobei die Aminosäuresequenz davon in EP 305 216 dargestellt ist), das eine Mutation in mindestens einer, jedoch vorzugsweise mehreren der folgenden Positionen umfasst: 1, 2, 3, 4, 5, 19, 49, 53, 56, 57, 59, 62, 83, 85, 90, 94, 96, 97, 99, 101, 102, 111, 116, 126, 127, 137, 167, 170, 181, 187, 210, 221, 225, 234, 239, 249, 252, 256, 263, 264, 267, wie mindestens eine oder vorzugsweise mehrere der folgenden Mutationen: E1K, E1S, V2G, S3T, Q4P, DSE, A19T, A49P, Y53C, E56K, D57G, G59V, D62R, S83T, S85F, I90F, N94K, F95L, D96A, D96H, D96L, L97M, E99K, N101S, D102Y, D111N, S116P, Q126R, K127C, D137G, D167G, S170P, F181L, V187A, F210K, E210V, W221L, W221A, G225P, D234R, D234Y, E239C, Q249R, I252L, P256T, G263A, L264Q, T267R.

**[0156]** In einer spezifischeren Ausführungsform handelt es sich bei dem lipolytischen Erstwaschenzym der Erfindung um eine Variante des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa*, in welchem mindestens einer der folgenden Aminosäurereste mit einem anderen Aminosäurerest ersetzt wurde: A49, G59, SF35, I90, S116, Q126, D137, S170 oder W221.

**[0157]** Obwohl die vorstehend identifizierten Aminosäurereste durch beliebige andere der 19 möglichen Aminosäurereste ersetzt werden können, ist es bevorzugt, dass der Aminosäurerest wie folgt ersetzt wird: A49P, G59V, S85F, I90F, S116P, Q126R, D137G, S170P oder W221L, oder durch einen Aminosäurerest, der zu derselben Ladungsgruppe (vgl. die nachstehende Definition) gehört, wie derjenige des eingefügten Aminosäurerests, z. B. A49T statt A49P. Wird ein negativ geladener Aminosäurerest, z. B. D137 ersetzt, ist es bevorzugt, dass er durch einen Aminosäurerest ersetzt wird, der zu der positiv geladenen Gruppe oder der neutralen Gruppe gehört, z. B. D137G, N, K, wie nachstehend definiert:

Negative Ladungsgruppe: D, E

Positive Ladungsgruppe: K, R, H

Neutrale Ladungsgruppe: I, C, S, T, P, W, M, G, A, P, N, Y, Q, L, V.

**[0158]** Es wird erwogen, dass eine Variante, die eine Mutation in den folgenden Positionen umfasst, Erstwaschaktivität oder verbesserte Waschleistung zeigen kann:

D57X + N94(K oder R) + D96X + L97X + Q49(K oder R)

N94(K oder R) + D96X + L97X + Q49(K oder R)

N94(K oder R) + D96X + Q49(K oder R)

D137X + D167X + E210X + W221X

D137X + D167X + E210X

I90X + D96X + E99X + V187X

I90X + D96X + E99X

I90(F oder W oder Y) + D96X + E99X

E56X + D57X + D62X + S85X + D96X + D102X + E210X

N94(K oder R) + F95L + D96X + D234X, wobei X ein Aminosäurerest und identisch, paarweise identisch oder unterschiedlich sein kann.

**[0159]** Eine lipolytische Enzymvariante von *H. lanuginosa* der Erfindung kann die folgenden Mutationen umfassen:

D57G + N94K + D96L + Q49R

D57G + N94K + D96L + S116P + Q49R



D57G + G59V + N94K + D96L + Q49R  
 D57G + N94K + D96L + S116P + S170P + Q49R  
 D57G + G59V + N94K + D96L + S170P + Q49R  
 D57G + N94K + D96L + S170P + Q49R  
 D167G + E210V + Q49R  
 E56K + D167G + E210V  
 D137G + D167G + E210V + Q49R  
 D167G + E210V + W221L + Q249R  
 DS7G + N94K + F95L + D96H,L + Q249R  
 D57G + N94K + D96L + E210K  
 D57G + G59V + N94K + D96L + S116P + S174P + Q249R  
 S3R + D137G + D167G + E210V + W221L  
 D137G + D167G + E210V + W221L + N233R  
 S3R + I90F + D96L + E99K + V187A + Q249R  
 I90F + D96L + E99K + V187A + D233R  
 I90F + D96L + E99K + V187A + D234Y  
 I90F + D96L + E99K + V187A + T231R  
 I90F + D96L + E99K + V187A  
 D62R + I90F + D96L + E99K + V187A  
 I90F + D96L + E99K + V187A + N200R + R209A  
 I90F + D96L + E99K + V187A + T199R + N200R + R209A  
 D57G + D62R + N94K + D96L + Q249R  
 D57G + N94K + D96L + N200R + R209A + Q249R  
 D57G + N94K + D96L + T199R + N200R + Q249R  
 I90F + D96L + E99K + V187A + T 199R  
 D57G + N94K + D96L + T199R + R209A + Q249R  
 I90F + D96L + E99K + V187A + Q249R  
 I90F + D96L + E99K + V187A + P253R  
 I90F + D96L + E99K + D137G + D167G + V187A + Q249R  
 I90F + D96L + E99K + D137G + V187A + Q249R  
 D96L + E99K + V187A + Q249R  
 V2P + N94K + D96L + Q249R  
 V2W + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 V2R + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 V2R + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 V2R + S3W + N94K + D96L + Q249R  
 V2W + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 N94K + D96L + Q249R  
 V2G + S3T + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R  
 V2G + S3T + Q4P + DSE + D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R  
 V2G + DSQ + L6M + D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R.

**[0160]** Die folgenden Varianten sind von besonderem Interesse:

D57G + G59V + N94K + D96L + L97M + S116P + S170P + Q49R  
 A49P + D167G + E210V  
 E56K + D57G + D62R + S83T + S85F + D96L + D102Y + E210K  
 D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R  
 D137G + D167G + E210V + W221L  
 N94K + F95L + D96H + N101S + F181L + D234Y + I252L + P256T + G263A + L264Q  
 I90F + D96L + E99K + V187A  
 N94K + D96A + Q49R  
 A19P + D167G + E210V + W221L  
 N94K + D96L + L97M + Q249R  
 D57G + N94K + D96L + Q49R  
 I90F + D96L + E99K + D137G + V187A  
 N94K + D96L + E99K + Q49R  
 N94K + D96L + E99K + T231R + N233R + D234R + Q49R  
 N94K + D96L + E99K + D111N + F211A + G225P + Q249R + T267R  
 N94K + D96L + E99K + D111N + F211A + G225P + T231R + N233R + D234R + Q49R + T267R  
 E1K + N94K + D96L + E99K + Q49R

N94K + D96L + K223R + Q49R  
 N94K + D96L + E99K + N233R  
 N94K + D96L + E99K + T231R + N233R + Q49R  
 N94K + D96L + E99K + N233R + Q49R  
 N94K + D96L + E99K + D234R + Q49R.

**[0161]** Die Variante der Erfindung kann vorteilhafterweise eine zusätzliche Mutation in Position E1 umfassen, wobei die Mutation eine Deletion von E1 oder ein Ersatz von E durch einen anderen Aminosäurerest, insbesondere P oder S ist.

**[0162]** Zudem können die vorstehend spezifizierten Varianten beliebige der hier erörterten N-terminalen oder C-terminalen Peptidverlängerungen umfassen, wobei Beispiele dafür SPIRR, TAIRPRK, SPIRPRP, SPPRRP, RP, GPIRPRP, SRSRHNA, SALRPRK, STRRPRP, SPRRPRT, APPRPRPLLIS, SPIRK, SPPRPRP, WP, SPPRPRP, SPIRRP, APPRPRPRPR oder SPIRPR einschließen. Eine N-terminale Verlängerung wird z. B. an den Aminosäurerest E1 der reifen Stammlipase oder an Aminosäurerest 2–20, wie 2, 3, 4, 5 des reifen Stammenzym angebracht, wobei Rest E1 (gegebenenfalls mehrere Aminosäurereste des nichtstrukturellen Teils des Stammenzym, z. B. Aminosäurereste im N-terminalen Teil 2–20 des reifen Stammenzym) deletiert werden. Zudem kann die Peptidaddition so angebracht werden, dass einer oder mehrere der letzten Aminosäurereste der hier erwähnten Peptidverlängerungen den (die) Aminosäurerest(e) des reifen Stammenzym, die die Position 1 und gegebenenfalls 2 und weitere Positionen belegen, ersetzt. Zum Beispiel kann die Peptidverlängerung „SPPRRP“ durch Substituieren von E1 der reifen Stammlipase von *H. lanuginosa* mit dem letzten „P“ der Peptidaddition und Substituieren des Propeptids vom Wildtyp „SPIRR“ mit „SPPRR“ anbracht werden.

**[0163]** Wird kein Ersatz im N-terminalen Teil des reifen Stammenzym durchgeführt, kann die N-terminale Addition entweder als Ergebnis dessen, dass die Varianten in *S. cerevisiae* exprimiert wurden (wenn die N-terminale Verlängerung mit (einem Teil von) dem Pro-Peptid des Stammenzym identisch ist) oder stärker bevorzugt durch die relevante Kombination des Teils der das Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz, die die (Prä)Prosequenz oder eine andere Sequenz stromabwärts des den Aminosäurerest 1 des reifen Stammenzym kodierenden Kodons kodiert, angebracht werden.

**[0164]** Die gegenwärtig besonders bevorzugten Varianten der Erfindung schließen ein:

SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + Q249R  
 SPPRRP + I90F + D96L + E99K + D137G + V187A  
 SPIRPRP + N94K + D96L + L97M + Q249R  
 SPPRPRP + N94K + D96L + L97M + Q249R  
 SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R  
 SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A  
 SPIRPRP + D137G + D167G + E21V + W221L  
 E1SPIRPRP + I90F + D96L + E99K + V187A  
 E1SRIRKRIC + I90F + D96L + E99K + V187A  
 E1SPRIKPRIK + I90F + D96L + E99K + V187A  
 E1SPPRRP + D62R + I90F + D96L + E99K + V187A  
 E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + N200R + R209A  
 E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + T199R + N200R + R209A  
 E1SPIRPRP + D57G + D62R + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + N200R + R209A + Q249R  
 E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + T199R + N200R + Q249R  
 E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + T199R  
 E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + T199R + R209A + Q249R  
 E1SPIRPRP + I90F + D96L + E99K + V187A + Q249R  
 E1SPPRWP + I90F + D96L + E99K + V187A + p253R  
 E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + D137G + D167G + V187A + Q249R  
 E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + D137G + V187A + Q249R  
 E1SPPRRP + D96L + E99K + V187A + Q249R  
 E1SPPRPR + V2P + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPPWWP + V2W + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPPWRP + V2R + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPPRWP + V2R + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPPWWP + V2R + S3W + N94K + D96L + Q249R

E1SPPRWP + V2W + S3R + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPPRWP + V2R + S3W + N94K + D96L + Q249R  
 E1SPPRWP + N94K + D96L + Q49R  
 E1SPRRP + N94K + D96L + Q49R  
 E1APPPRRPRRPR + V2G + S3T + D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R  
 E1APPPRRPRRPR + V2G + S3T + Q4P + DSE + D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R  
 E1APPPKASPRQRP + V2G + DSQ + L6M + D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R  
 SCIRR + N94K + D96L + E239C + Q49R  
 E1SPPRWP + D57G + N94K + D96L + Y53C + K127C + Q49R  
 E1SPRRRP + V2R + S3P + N94K + D96L + Q49R  
 E1SPPWPRP + V2R + S3P + N94K + D96L + Q49R  
 E1SPPRWP + N94K + D96L + E99K  
 E1SPRRP + N94K + D96L + E99K + Q49R  
 E1SPPCGRRP + N94K + D96L + E239C + Q49R  
 E1SPCRPRP + N94K + D96L + E239C + Q249R  
 SPPCRRP + N94K + D96L + E239C + Q249R

und die in den nachstehenden Beispielen offenbarten Varianten. Liegt die N-terminale Verlängerung in den vorstehend spezifizierten Varianten vor, soll die Nomenklatur „E1 ...“ darauf hinweisen, dass E in Position 1 durch mindestens einen Aminosäurerest der Peptidaddition, die nach „E1“ aufgelistet sind, ersetzt wurden, wobei die übrigen Reste an den Aminosäurerest kondensiert wurden, der Position 1 belegt. Zum Beispiel soll „EISPPE-QP“ darauf hinweisen, dass Aminosäurerest E1 durch „P“ ersetzt wurde und die übrigen Reste „SPPEQ“ an E1P kondensiert wurden. In der Praxis werden solche Varianten günstigerweise durch Ersetzen der Aminosäurereste (–5)–(–1) des unverarbeiteten Stammenzym mit den relevanten Aminosäureresten der Peptidverlängerung und Ersetzen von E1 mit dem relevanten Aminosäurerest konstruiert, wobei der Ersatz durch Einbringen der relevanten Mutationen in die entsprechende DNA-Sequenz durchgeführt und anschließend die resultierende Variante in einem Expressionssystem hergestellt wird, wodurch gewährt wird, dass mindestens ein Teil der exprimierten Varianten ihre N-terminale Verlängerung (wie weiter hier offenbart) beibehalten wird. Wird auf keinen Ersatz von E1 hingewiesen, wird die N-terminale Peptidaddition einfach an den Aminosäurerest kondensiert, der Position 1 des reifen Stammenzym belegt.

**[0165]** Die vorstehenden Varianten wurden anfänglich unter Verwendung der Zufallsmutagenese und/oder von Gen-Schiebungsverfahren („gene shuffling“) der Erfindung konstruiert und anschließend in Bezug auf die dadurch eingebrachten Mutationen charakterisiert. Es ist klar, dass ein alternatives Verfahren des Konstruierens dieser Varianten auf zielgerichteter Mutagenese unter Verwendung von geeigneten Oligonukleotidsonden gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren basieren würde.

**[0166]** Es wird erwogen, dass die gute Waschleistung (Erstwaschaktivität) beibehalten wird, wenn eine der vorstehenden spezifischen einzelnen Mutationen durch eine Mutation an einem Aminosäurerest ersetzt wird, der zu derselben Ladungsgruppe wie die vorstehend vorgeschlagene Mutation gehört. Zum Beispiel kann die Mutation N94K durch N94R, H, ersetzt werden, das „G“ in Mutation D137G oder D167G kann durch einen der anderen Aminosäurereste ersetzt werden, die zu der neutralen Gruppe gehören, usw. Weiterhin kann es vorteilhaft sein, einen Aminosäurerest der neutralen Gruppe zu ersetzen, wobei einer zu der positiven Ladungsgruppe, z. B. das „G“ in D137G bzw. D167G, gehört, mit einem K, R oder H ersetzt werden, was zu Mutationen D137K, R, H bzw. D167K, R, H führt.

**[0167]** Wie schon erwähnt ist das lipolytische Enzym von *H. lanuginosa* strukturell mit anderen lipolytischen Enzymen wie denjenigen, die von *Rhizomucor miehei*, *Penicillium camembertii*, *Absidia* sp. und den verschiedenen hier offenbarten *Rhizopus* sp. ableitbar sind, eng verwandt. Demzufolge wird angenommen, dass Modifikationen, die denjenigen entsprechen, die vorstehend in der Lipase von *H. lanuginosa* erwähnt wurden, und in homologe Positionen in anderen strukturell verwandten lipolytischen Enzymen eingebracht sind, ebenso in Bezug auf die Erstwaschleistung funktionieren. Demzufolge betrifft in einem weiteren Aspekt die Erfindung eine Erstwaschvariante eines lipolytischen Stammenzym, das eine Aminosäuresequenz oder eine dreidimensionale Struktur aufweist, die mit der Lipaseamino-säuresequenz oder -struktur von *H. lanuginosa* (mit einer Sequenzidentität von z. B. mindestens 20%, die Lücken oder eine Gesamtproteinähnlichkeit von mindestens 50%, wie mindestens 60% oder 70% unter Verwendung des UWGGG GAP-Programms oder einer strukturellen „Ähnlichkeit“ gewährt) übereinstimmen kann, wobei die Aminosäuresequenz davon so modifiziert ist, dass Mutationen, die denjenigen der vorstehend erwähnten Lipase von *H. lanuginosa* entsprechen, und/oder Aminosäurereste, die in der Lipase vom Wildtyp von *H. lanuginosa* in das fragliche lipolytische Stammenzym zu finden sind, eingebracht sind. Die Aminosäurereste oder Positionen, die in strukturell- oder sequenzhomologen Lipasen zu modifizieren sind, können durch eine Abgleichung der relevanten Struktur/Sequenz mit derjenigen

der Lipase von *H. lanuginosa* identifiziert werden. Solche Varianten können durch ein Verfahren zum Konstruieren einer lipolytischen Erstwaschenzymvariante, hergestellt aus einem lipolytischen Stammenzym, das strukturelle und/oder Sequenz-Homologie zu der Lipase von *H. lanuginosa* aufzeigt (wobei solche lipolytischen Enzyme wie vorstehend definiert sind), konstruiert werden, wobei das Verfahren das Abgleichen der Sequenz des fraglichen Stammenzym mit derjenigen der Lipase von *H. lanuginosa* oder einer Erstwaschvariante davon oder Überlagern der Struktur des fraglichen Stammenzym mit derjenigen der Lipase oder Variante von *H. lanuginosa*, Identifizieren der Positionen) im Stammenzym, die homolog zu der Positionen) der Lipase oder Variante von *H. lanuginosa* ist (sind), von welcher angenommen wird, dass sie zum Erzielen von Erstwaschaktivität wichtig ist (vgl. die vorstehend offenbarten Mutationen), und Ersetzen des Aminosäurerests, der die relevante(n) Position(en) gemäß t belegt, und Herstellen des resultierenden Variantenzym umfasst.

#### Klonen einer ein lipolytisches Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz

**[0168]** Die DNA-Sequenz, die ein lipolytisches Stammenzym kodiert, aus welchem ein lipolytisches Erstwaschenzym erfindungsgemäß gebildet wird, kann aus einer beliebigen Zelle oder einem beliebigen Mikroorganismus isoliert werden, der das fragliche Stammenzym unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren herstellt.

**[0169]** Zum Beispiel kann die DNA-Sequenz durch Aufbauen einer cDNA- oder Genom-Genbank von einem Organismus, von welchem erwartet wird, dass er die Sequenz beinhaltet, und Screenen nach positiven Klonen durch herkömmliche Verfahren isoliert werden. Beispiele für solche Verfahren sind Hybridisierung zu Oligonukleotidsonden, die auf der Basis der Aminosäure- oder DNA-Sequenz des Stammenzym (wenn eine Sequenzinformation verfügbar ist) oder eines verwandten lipolytischen Enzyms (wenn eine Sequenzinformation über das Stammenzym nicht verfügbar ist) gemäß Standardtechniken (vgl. Sambrook et al., 1989) und/oder Selektion für Klone, die lipolytische Aktivität exprimieren, und/oder Selektion für Klone, die ein Protein herstellen, das mit einem Antikörper reaktiv ist, der gegen ein lipolytisches Stammenzym erwogen wird, reaktiv ist.

**[0170]** Bei einem bevorzugten Verfahren zum Isolieren einer DNA-Sequenz, die ein lipolytisches erfindungsgemäß zu modifizierendes Stammenzym kodiert, aus einer cDNA- oder Genom-Genbank, handelt es sich um die Verwendung von Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotidsonden, die auf der Basis der DNA- oder Aminosäuresequenz des Stammenzym hergestellt sind. Zum Beispiel kann die PCR unter Verwendung von Techniken durchgeführt werden, die in US-Patent Nr. 4,683,202 oder von R. K. Saiki et al. (1988) beschrieben sind.

**[0171]** In einer anderen Ausführungsform kann die das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz durch etablierte Standardverfahren, z. B. durch das von Beaucage und Caruthers (1981) beschriebenen Phosphoamidit-Verfahren oder durch das durch Matthes et al. (1984) beschriebene Verfahren synthetisch hergestellt werden. Gemäß dem Phosphoamidit-Verfahren werden Oligonukleotide z. B. in einer automatischen DNA-Syntheseapparatur synthetisiert, gereinigt, verknüpft, gebunden und in geeignete Vektoren geklont.

**[0172]** Schließlich kann die das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz aus DNA vom gemischten genomischen und synthetischen, gemischten synthetischen und cDNA- oder gemischten genomischen und cDNA-Ursprung, hergestellt durch Binden von Fragmenten vom synthetischen, genomischen oder cDNA-Ursprung (wie geeignet) gemäß Standardtechniken hergestellt werden, wobei die Fragmente verschiedenen Teilen der das Stammenzym kodierenden Gesamt-DNA-Sequenz entsprechen.

#### Verfahren zum Konstruieren von lipolytischen Erstwaschenzymvarianten

**[0173]** Es ist aus der Kurzbeschreibung der Erfindung klar, dass die Erfinder ein sehr effizientes Verfahren zum Bilden von lipolytischen Enzymen entwickelten, die eine wesentliche Menge an Fettbestandteilen während einem wie hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest entfernen können.

**[0174]** Folglich handelt es sich bei dem lipolytischen Enzym der Erfindung in einer stark bevorzugten Ausführungsform um eine Variante eines natürlich vorkommenden lipolytischen Stammenzym, das das Ergebnis eines Verfahrens ist, das mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Exprimieren einer Vielfalt an mutierten DNA-Sequenzen, die von einem lipolytischen Stammenzym stammen, in geeigneten Wirtszellen;
- (b) Screenen nach Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym exprimieren, das eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym aufzeigt; und

Selektieren eines mutierten lipolytischen Enzyms unter denjenigen, die aus Schritt (b) resultieren, das, wenn es in der Detergenzzusammensetzung A oder B in einer Konzentration von 12.500 LU/l vorliegt, mindestens 15% mehr Schmalz aus einem Schmalz-beschmutzten Textilmuster als dieselbe Detergenzzusammensetzung ohne das Enzym in einem wie hier beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest entfernen kann.

**[0175]** Die Vielfalt an mutierten DNA-Sequenzen, die in Schritt (a) genannt sind, kann günstigerweise erhalten werden, indem eine das lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz einer Mutagenese unterzogen wird, um mutierte DNA-Sequenzen zu bilden. Obwohl die Mutagenese durch jedes beliebige geeignete Verfahren wie durch zielgerichtete Mutagenese durchgeführt werden kann, ist es gegenwärtig bevorzugt, dass die Mutagenese als Zufallsmutagenese durchgeführt wird. Folglich ist es durch Verwendung von Zufallsmutagenese möglich, eine viel höhere Anzahl an mutierten DNA-Sequenzen zu bilden, als es unter Verwendung von zielgerichteter Mutagenese möglich wäre. Die Zufallsmutagenese wird in weiterem Detail nachstehend im Abschnitt mit dem Titel „Zufallsmutagenese“ erklärt. In diesem Abschnitt ist auch beschrieben, wie einer oder mehrere der Schritte (a) bis (c) des Verfahrens einmal oder mehrmals wiederholt werden können, um stufenweise Verbesserungen durchzuführen. Zum Beispiel wird das mutierte lipolytische Enzym, das aus der ersten Runde der Schritte (a) bis (c) selektiert wurde, einer zweiten Runde des Verfahrens unterzogen, in welcher der Screeningschritt (b) die Selektion unter strengeren Bedingungen als diejenigen, die in dem Screeningschritt (b) der ersten Runde verwendet wurden, beinhaltet, wodurch mutierte lipolytische Enzyme selektiert werden, die eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente verglichen mit dem mutierten lipolytischen Enzym, das aus der ersten Runde resultiert, aufweist.

### Zufallsmutagenese

**[0176]** Die Zufallsmutagenese der das lipolytische Stammenzym (oder die Peptidaddition) kodierenden DNA-Sequenz, die gemäß Schritt (a) des vorstehenden Verfahrens durchgeführt wird, kann günstigerweise unter Verwendung eines beliebigen auf dem Fachgebiet bekannten Verfahrens durchgeführt werden.

**[0177]** Zum Beispiel kann die Zufallsmutagenese unter Verwendung eines geeigneten physikalischen oder chemischen Mutagenisierungsmittels unter Verwendung eines geeigneten Oligonukleotids oder durch Unterziehen der DNA-Sequenz einer durch PCR gebildeten Mutagenese durchgeführt werden. Weiterhin kann die Zufallsmutagenese unter Verwendung einer beliebigen Kombination dieser Mutagenisierungsmittel durchgeführt werden.

**[0178]** Das Mutagenisierungsmittel kann z. B. eines sein, Transitionen, Transversionen, Umkehrungen, Verschlüsselungen, Deletionen und/oder Einfügungen induziert.

**[0179]** Beispiele für ein physikalisches oder chemisches Mutagenisierungsmittel, das für den vorliegenden Zweck geeignet ist, schließen Ultraviolett (UV)-Bestrahlung, Hydroxylamin, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), O-Methylhydroxylamin, salpetrige Säure, Ethylmethansulphonat (EMS), Natriumbisulphit, Ameisensäure, Gamma-Strahlung, 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (NTG) und Nukleotidanaloge ein.

**[0180]** Werden solche Mittel verwendet, wird die Mutagenese typischerweise durch Inkubieren der das zu mutagenisierende Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz in Gegenwart des Mutagenisierungsmittels der Wahl unter geeigneten Bedingungen zum Stattfinden der Mutagenese und Selektieren von mutierter DNA mit den gewünschten Eigenschaften durchgeführt.

**[0181]** Wird die Mutagenese unter Verwendung eines Oligonukleotids durchgeführt, kann das Oligonukleotid mit drei Nicht-Stammnukleotiden während der Synthese des Oligonukleotids an den zu ändern gewünschten Positionen aufgepuscht oder erhöht werden. Das Aufpuschen oder Erhöhen kann so durchgeführt werden, dass Kodons für ungewünschte Aminosäuren durch Vermindern der Menge oder vollständiges Vermeiden der zu diesen Kodons führenden Nukleotide vermieden werden. Die Kenntnis des Stands der Technik und Computerprogramme können zum Berechnen des optimalsten Nukleotidgemischs für eine vorgegebene Aminosäure-Vorliebe verwendet werden. Ein aufgepuschtes oder erhöhtes Nukleotid kann in die das lipolytische Enzym kodierende DNA-Sequenz durch jede beliebige veröffentlichte Technik unter Verwendung z. B. von PCR, LCR oder einer beliebigen DNA-Polymerase und -Ligase eingebracht werden.

**[0182]** Wird durch PCR gebildete Mutagenese verwendet, wird entweder ein chemisch behandeltes oder nichtbehandeltes Gen, das ein lipolytisches Stammenzym kodiert, einer PCR unter Bedingungen unterzogen, die die Fehleinbringung von Nukleotiden erhöht (Deshler 1992, Leung et al. 1989).

**[0183]** Ein Mutationsstamm von *E. coli* (Fowler et al. 1974), *S. cerevisiae* oder einer beliebigen anderen Stammkultur kann z. B. durch Transformieren eines das Stammenzym enthaltenden Plasmids in den Mutationsstamm, Wachsen des Mutationsstamms mit dem Plasmid und Isolieren des mutierten Plasmids aus dem Mutationsstamm für die Zufallsmutagenese der das lipolytische Enzym kodierenden DNA verwendet werden. Das mutierte Plasmid kann anschließend in den Expressionsorganismus transformiert werden.

**[0184]** Die zu mutagenisierende DNA-Sequenz kann günstigerweise in einer Genom- oder cDNA-Genbank vorliegen, die aus einem das lipolytische Stammenzym exprimierenden Organismus hergestellt ist. In einer anderen Ausführungsform kann die DNA-Sequenz auf einem geeigneten Vektor wie einem Plasmid oder einem Bakteriophagen, der als solches inkubiert oder auf andere Weise dem Mutagenisierungsmittel ausgesetzt werden kann, vorliegen. Die zu mutagenisierende DNA kann auch in einer Wirtszelle vorliegen, entweder indem sie in das Genom der Zelle integriert wurde oder auf einem in der Zelle beinhaltenen Vektor vorliegt. Schließlich kann die zu mutagenisierende DNA in isolierter Form vorliegen. Bei der Zufallsmutagenese zu unterziehenden DNA-Sequenz handelt es sich vorzugsweise um eine cDNA oder eine Genom-DNA-Sequenz.

**[0185]** In manchen Fällen kann es günstig sein, die mutierte DNA-Sequenz vor dem Durchführen der Expression oder des Screenens zu amplifizieren. Eine solche Amplifikation kann gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren durchgeführt werden, wobei es sich bei dem gegenwärtig bevorzugten Verfahren um eine durch PCR gebildete Amplifikation unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern handelt, die auf der Basis der DNA- oder Aminosäuresequenz des Stammenzyms hergestellt werden.

**[0186]** Nach der Inkubation mit oder Aussetzen dem Mutagenisierungsmittel wird die mutierte DNA durch Züchten einer geeigneten die DNA-Sequenz tragenden Wirtszelle unter dem Stattfinden von Expression gewährenden Bedingungen exprimiert. Bei der für diesen Zweck verwendeten Wirtszelle kann es sich um eine, die mit der gegebenenfalls auf einem Vektor vorliegenden mutierten DNA-Sequenz transformiert wird oder eine, die das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz während der Mutagenesebehandlung trägt, handeln. Beispiele für geeignete Wirtszellen sind nachstehend angegeben. Es ist besonders bevorzugt, eine Hefezelle als Wirtszelle zu verwenden, insbesondere, wenn das lipolytische Stammenzym von einem Pilz wie einem Fadenpilz oder einer Hefe abgeleitet ist. Die mutierte DNA-Sequenz kann ferner eine DNA-Sequenz umfassen, die die Expression der mutierten DNA-Sequenz gewährende Funktionen kodiert.

**[0187]** Es ist klar, dass die in Schritt (b) des Verfahrens der Erfindung erwähnten Kriterien des Screenens vorsichtig ausgewählt sind. Folglich wird, ohne an eine Theorie gebunden zu sein, angenommen, dass das Screenen nach einer herabgesetzten Abhängigkeit von Calcium bei alkalischem pH-Wert (pH über 7) zu Varianten führt, die eine insgesamt verbesserte Leistung dahingehend aufweisen, dass der Bedarf an Calcium insbesondere unter den meisten Waschbedingungen, die von der Tatsache gekennzeichnet sind, dass die Konzentration von freien Calciumionen absichtlich durch Chelatbildner in der Detergenz-Matrix (Gerüststoffe) vermindert wird, als Beschränkungsfaktor für eine optimale Aktivität betrachtet wird.

**[0188]** Das Detergenz oder die Detergenzkomponente, für welche die Variante eine verbesserte Toleranz aufweist, kann von beliebigem Typ, z. B. wie weiter nachstehend beschrieben, sein. Vorzugsweise handelt es sich bei der Detergenzkomponente um einen nichtionischen, anionischen, kationischen, zwitterionischen oder amphoteren oberflächenaktiven Stoff. Beispiele für nichtionische oberflächenaktive Stoffe schließen ein Alkoholethoxylat ein, Beispiele für anionische oberflächenaktive Stoffe schließen LAS, Alkylsulfat, Alkoholethoxysulfat und dgl. ein. Die Wahl des Detergenzes hängt z. B. von der eigenen Schwäche (in Bezug auf die Detergentoleranz) des lipolytischen Stammenzyms ab.

**[0189]** In Bezug auf lipolytische Enzyme von *Humicola lanuginosa* und homologe Enzyme (wie die lipolytischen Enzyme von *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Absidia* sp.), wird es erwogen, dass eine verbesserte Toleranz gegenüber einem nichtionischen oberflächenaktiven Alkoholethoxylat, wobei ein im Handel erhältliches Beispiel davon Dobanol® 25-7 ist, auf eine verbesserte Waschleistung hinweisen kann. In Bezug auf lipolytische Enzyme vom *Pseudomonas*-Typ, wie *P. pseudoalcaligenes*, *P. cepacia*, wird erwogen, dass eine verbesserte Toleranz gegenüber einem anionischen oberflächenaktiven Stoff wie einem Alkylsulfat (ein im Handel erhältliches Beispiel dafür ist NEODOL 45) oder LAS (ein im Handel erhältliches Beispiel dafür ist Nansa 1169/P) auf eine verbesserte Waschleistung hinweisen kann.

**[0190]** Der Schritt des Screenens (b) wird günstigerweise unter Verwendung eines Filtertests auf der Basis der folgenden Prinzipien durchgeführt:

**[0191]** Ein Mikroorganismus, der das mutierte lipolytische Enzym von Interesse exprimieren kann, wird auf

einem geeigneten Medium und unter geeigneten Bedingungen für das zu sekretierende Enzym exprimiert, wobei das Medium mit einem Doppelfilter bereitgestellt ist, der einen ersten ProteinbindungsfILTER und, auf dem oberen Teil davon, einen zweiten Filter, der eine geringe Proteinbindungsfähigkeit zeigt, umfasst. Der Mikroorganismus ist auf dem zweiten Filter lokalisiert. Nach der Inkubation wird der erste Filter, der von den Mikroorganismen sekretierte Enzyme umfasst, von dem zweiten die Mikroorganismen umfassenden Filter abgetrennt. Der erste Filter wird nach der gewünschten enzymatischen Aktivität dem Screenen unterzogen, und die entsprechenden Mikrobenkolonien, die auf dem zweiten Filter vorliegen, werden identifiziert.

**[0192]** In einer anderen Ausführungsform kann der zweite, die Kolonien tragende Filter direkt auf der Screeningplatte verwendet werden. Dies macht es leichter, die richtigen Kolonien zu selektieren, und liefert in manchen Fällen ein stärkeres Signal. Außerdem ist unter Verwendung nur eines Filter entweder die Proteinbindung oder in manchen Fällen die Nicht-Proteinbindung ausreichend.

**[0193]** Bei dem zum Binden der enzymatischen Aktivität verwendeten Filter kann es sich um einen beliebigen ProteinbindungsfILTER, z. B. Nylon oder Nitrozellulose handeln. Bei dem oben angebrachten Filter, der die Kolonien des Expressionsorganismus trägt, kann es sich um einen beliebigen Filter, der keine oder geringe Affinität für Bindungsproteine aufweist, z. B. Zelluloseacetat oder Durapore™ handeln. Der Filter kann mit beliebigen der zum Screenen verwendeten Bedingungen vorbehandelt sein oder während des Nachweises von enzymatischer Aktivität behandelt werden.

**[0194]** Die enzymatische Aktivität kann durch einen Farbstoff, Fluoreszenz, Niederschlagsbildung, einen pH-Indikator, IR-Absorption, oder eine andere bekannte Technik zum Nachweis von enzymatischer Aktivität nachgewiesen werden.

**[0195]** Die nachgewiesene Verbindung kann durch ein beliebiges Immobilisierungsmittel, z. B. Agarose, Agar, Gelatine, Polyacrylamid, Stärke, Filterpapier, Gewebe oder eine beliebige Kombination an Immobilisierungsmitteln immobilisiert werden.

**[0196]** Lipolytische Aktivität kann durch Brilliant Green, Rhodamine B oder Sudan Black in Kombination mit einem Lipid, z. B. Olivenöl oder Schmalz nachgewiesen werden. Bei den Kriterien des Screenens zum Identifizieren von Varianten von lipolytischen Stammenzymen mit verbesserter Waschleistung kann es sich z. B. um EGTA, EDTA, nichtionische und/oder anionische Tenside, alkalischen pH-Wert oder eine beliebige Detergenzzusammensetzung in Kombination mit einem der vorstehenden Nachweismitteln von enzymatischer Aktivität sein.

**[0197]** Nach dem Screenen in Schritt (b) werden lipolytische Enzyme mit gewünschten Eigenschaften (d. h. wie durch die Kriterien des Screenens definiert) isoliert und deren Erstwaschfähigkeit in dem hier in dem Abschnitt „Materialien und Verfahren“ beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest getestet.

**[0198]** Ist die Erstwaschaktivität der Enzyme nach einer Runde der vorstehenden Behandlung nicht ausreichend gut, kann das Enzym z. B. durch zielgerichtete oder Zufallsmutagenese modifiziert werden, um die Erstwaschaktivität der Enzyme z. B. gemäß einem beliebigen der weiter vorstehend angegebenen Prinzipien zur Modifikation von Lipasen zum Erzielen einer Erstwaschleistung zu verbessern.

**[0199]** Besonders günstig können die in Schritt (b) hergestellten Wirtszellen weiteren wie in den Schritten (a) bis (d) und gegebenenfalls vorstehendem (c) definierten Mutageneserunden günstigerweise unter Verwendung von strengeren Selektionskriterien als in einer vorherigen Mutagenesebehandlung eingesetzt, unterzogen werden. Die weitere(n) Mutageneserunde(n) kann (können) zufällig, lokalisiert – zufällig oder zielgerichtet sein, so dass vorher identifizierte vorteilhafte Mutationen, insbesondere D96L, Q49R, E87K, D254K, E210K oder Zufallsmutationen in selektierten Regionen, z. B. der Lipidkontaktzone, insbesondere Zufallsmutationen mit aufgepuschten oder erhöhten Oligonukleotiden gegenüber der Einbringung von positiven und/oder hydrophoben Aminosäureresten oder von beliebigen der anderen hier erwähnten spezifischen Mutationen eingebracht werden. In einer anderen Ausführungsform können verschiedene homologe lipolytische Stammenzyme kodierende Gene in zufälliger Weise kombiniert werden, um eine neue Variante, die eine oder mehrere Mutationen von jeder Variante trägt, zu erhalten. Dies ist in weiterem Detail nachstehend im Abschnitt mit dem Titel „Kombination von lipolytische Enzyme kodierenden DNA-Sequenzen“ erörtert.

**[0200]** Die für Schritt (b) oder (c) selektierten Wirtszellen können direkt bei der Herstellung der Variante des lipolytischen Enzyms verwendet werden. In einer anderen Ausführungsform kann die die Variante kodierende DNA von der Wirtszelle isoliert und in eine andere geeignete Wirtszelle, günstigerweise unter Verwendung des



Verfahrens, das nachstehend im Abschnitt mit dem Titel „Expression einer Variante der Erfindung“ beschrieben ist und in welchem geeignete Wirtszellen ebenso aufgezählt sind, eingefügt werden.

#### Lokalisierte Zufallsmutagenese

**[0201]** Erfindungsgemäß kann die Zufallsmutagenese vorteilhafterweise an einem Teil des fraglichen lipolytischen Stammenzyms lokalisiert sein. Dies kann z. B. vorteilhaft sein, wenn eine bestimmte Region des Enzyms für eine vorgegebene Eigenschaft des Enzyms als besonders wichtig identifiziert wurde und bei welchem es, wenn es modifiziert ist, erwartet wird, dass es zu einer Variante mit verbesserten Eigenschaften führt. Eine solche Region kann normalerweise identifiziert werden, wenn die tertiäre Struktur des Stammenzyms aufgeklärt und mit der Funktion des Enzyms verbunden wurde.

**[0202]** Bei einem Bereich von besonderem Interesse zur Modifikation von Aminosäureresten, die an der Oberfläche des Stammenzyms innerhalb oder außerhalb der Lipidkontaktzone, d. h. dem Teil des lipolytischen Stammenzyms, der mit dem Lipidsubstrat in Kontakt ist, lokalisiert sind, und der z. B. die Abdeckregion umfasst, handelt es sich um die hydrophobe Spalte oder einen beliebigen Teil dieser Strukturen. Ein anderer Bereich von Interesse für lipolytische Enzyme der Erfindung enthält eine Peptidaddition oder eine andere Modifikation innerhalb eines nichtstrukturellen Teils des N-terminalen oder C-terminalen Endes des reifen Stammenzyms.

**[0203]** Die lokalisierte Zufallsmutagenese wird günstigerweise durch Verwendung von wie vorstehend beschriebenen, durch PCR gebildete Mutagenesetechniken oder einer beliebigen anderen geeigneten, auf dem Fachgebiet bekannten Technik durchgeführt. Insbesondere zum Mutagenisieren von großen Peptidadditionen kann es relevant sein, durch PCR gebildete Mutagenese (z. B. wie beschrieben von Deshler, 1992, oder Leung et al., 1989) zu verwenden, in welcher eine oder mehrere geeignete Oligonukleotidsonden verwendet werden, die die zu mutagenisierende Fläche eingrenzen. Für die Mutagenese von kürzeren Peptidadditionen wird die lokalisierte Zufallsmutagenese vorzugsweise unter Verwendung von aufgepuschten oder erhöhten Oligonukleotiden durchgeführt. Das Aufpuschen oder Erhöhen wird verwendet, um z. B. Kodons für unerwünschte Aminosäurereste zu vermeiden oder die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein besonderer Typ eines Aminosäurerests, wie ein positiv geladener oder hydrophober Aminosäurerest, an eine gewünschte Position eingebracht wird.

**[0204]** In einer anderen Ausführungsform kann die den zu modifizierenden Teil der DNA-Sequenz kodierende DNA-Sequenz isoliert werden, indem sie z. B. in einen geeigneten Vektor eingefügt wird, und der Teil kann anschließend unter Verwendung von beliebigen der vorstehend erörterten Mutageneseverfahren einer Mutagenese unterzogen werden.

**[0205]** Von besonderem Interesse ist, dass die einer Zufallsmutagenese unterzogene DNA-Sequenz einen Teil einer die Lipidkontaktzone oder die Abdeckregion des lipolytischen Stammenzyms kodierenden DNA-Sequenz umfasst oder einen solchen Teil bildet. Die lokalisierte Zufallsmutagenese kann in einer oder mehreren dieser Regionen und/oder einer oder mehreren der die Lipidkontaktzone bildenden Regionen durchgeführt werden, und wird vorzugsweise in mindestens zwei der Regionen durchgeführt. Lipolytische Stammenzyme von besonderem Interesse zur Modifikation gemäß diesem Aspekt der Erfindung schließen das von Stamm DSM 4109 erhältliche lipolytische Enzym von *H. lanuginosa* oder eine Variante oder ein Analogon davon, ein von *Penicillium camembertii* abgeleitetes lipolytisches Stammenzym, ein von *Rhizopus oryzae* abgeleitetes lipolytisches Stammenzym, ein von *Rhizomucor miehei* abgeleitetes lipolytisches Stammenzym, ein von einem lipolytischen Enzym von *Absidia* sp. abgeleitetes lipolytisches Stammenzym, ein lipolytisches Stammenzym, das von einem *Pseudomonas* sp. abgeleitet ist, das vorzugsweise zu der Familie von *Ps. aeruginosa* gehört, wie die Lipase von *Pseudomonas cepacia*, die Lipase von *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, die Lipase von *Pseudomonas glumae*, die Lipase von *Pseudomonas mendocina*, die Lipase von *Pseudomonas wisconsinensis* oder die Lipase von *Pseudomonas* sp. (SD705) (Liposam®), die in SEQ ID Nr. 99 dargestellt ist, ein.

**[0206]** Die Lipidkontaktzonen und Abdeckregionen sind im vorstehenden Abschnitt „Definitionen“ identifiziert.

**[0207]** Die lokalisierte Zufallsmutagenese kann unter Verwendung von aufgepuschten Oligonukleotiden durchgeführt werden, die in der Richtung von L, I, V, F, W, A (hydrophobe Aminosäurereste) oder K, R (positive Aminosäurereste), z. B. unter Bedingungen, die etwa 90–93% des Wildtyps und etwa 7–10% des Mutanten gewährleisten, aufgepuscht werden. Spezifische Beispiele für geeignete Aufpuschverordnungen sind in den im nachstehenden Abschnitt „Beispiele“ angegeben.

**[0208]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann eine ein lipolytisches Erstwaschenzym kodierende DNA-Sequenz durch ein Verfahren konstruiert werden, das als einen wichtigen Schritt die Kombination von selektierten DNA-Sequenzen, die verschiedene lipolytische Stammenzyme kodieren, oder Teile solcher DNA-Sequenzen beinhaltet.

**[0209]** Vorzugsweise werden die zu kombinierenden DNA-Sequenzen von Genen abgeleitet, die lipolytische Enzyme kodieren, die eine zufriedenstellende Wasch- und/oder Geschirrspül-Leistung (wie z. B. in Beispiel 6 identifiziert) aufweisen. Das Ziel des Kombinierens der DNA-Sequenzen ist, dass die besten Elemente von jedem „Stammenzym“ zu ein und derselben Enzymvariante kombiniert werden.

**[0210]** Im vorliegenden Kontext soll der Begriff „zufriedenstellende Waschleistung“ darauf hinweisen, dass die Stammenzyme Fettflecken während eines oder mehrerer Waschzyklen entfernen, wenn sie in einem geeigneten Detergenz vorliegen. Vorzugsweise weist das fragliche Stammenzym eine bessere Waschleistung als Lipolase™ auf.

**[0211]** Die Kombination von DNA-Sequenzen kann durch jedes auf dem Fachgebiet bekannte beliebige geeignete Verfahren durchgeführt werden. Umfassen z. B. die zu kombinierenden DNA-Sequenzen homologe Fragmente, wird die Kombination vorzugsweise durch homologe Kreuzung, z. B. unter Verwendung von herkömmlichen Verfahren wie US 5,093,257 oder durch Gen-Schieben (Stemmer (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 91, 10747–10751; Stemmer (1994), Nature, Bd. 380, 389–391; Smith (1994), Nature, Bd. 370, S. 324–35), WO 95/17413 erzielt. Gen-Schieben bedeutet die Rekombination einer (von) Nukleotidsequenz(en) zwischen zwei oder mehreren homologen DNA-Sequenzen, die zur Herstellung von DNA-Sequenzen mit einer Anzahl an ausgewechselten Nukleotiden führt.

**[0212]** Von besonderem Interesse ist ein Gen-Schiebe-Verfahren in vivo, das auf dem folgenden Verfahren basiert:

- a) Bilden mindestens eines zirkulären Expressionsvektors, der eine ein lipolytisches Stammenzym oder einen wesentlichen Teil davon kodierende DNA-Sequenz umfasst,
- b) Öffnen des zirkulären Expressionsvektors in der das lipolytische Enzym oder einen Teil davon kodierenden DNA-Sequenz,
- c) Herstellen mindestens eines DNA-Fragments, das eine DNA-Sequenz umfasst, die zu mindestens einem Teil des Enzyms homolog ist, der eine Region auf mindestens einem Teil des zirkulären Expressionsvektors oder der zirkulären Expressionsvektoren kodiert,
- d) Einbringen mindestens eines der geöffneten Vektoren zusammen mit mindestens einem der homologen DNA-Fragmente, die die das (die) lipolytische(n) Enzym(e) oder einen Teil davon kodierenden DNA-Sequenzen in voller Länge bedecken in eine Rekombinationswirtszelle,
- e) Züchten der Hefe-Rekombinationswirtszelle unter dem Stattfinden der Rekombination zwischen den homologen DNA-Fragmenten leitenden Bedingungen und
- f) Screenen nach positiven lipolytischen Enzymvarianten mit einer verbesserten Waschleistung.

**[0213]** Der im vorstehenden Schritt a) verwendete Vektor kann ein Hefe-Expressionsvektor sein, der in eine Hefe-Rekombinationszelle transformiert und in ihr exprimiert wurde. Beispiele für solche Expressionsvektoren schließen aus pYES 2.0 (Invitrogene) konstruierte Expressionsvektoren wie das Lipasegen von *Humicola lanuginosa* vom Wildtyp umfassenden pJSO37 ein.

**[0214]** Das Öffnen des Vektors in Schritt b) kann durch alle beliebigen auf dem Fachgebiet bekannten, herkömmlichen Techniken erzielt und z. B. durch Öffnen des Vektors im Lipasegen durch Schneiden einer einzelnen Stelle oder durch Spalten des Vektors (d. h. Schneiden z. B. an zwei Stellen, was zum Herausschneiden eines kleinen Teils des Gens führt) durchgeführt werden.

**[0215]** Die Herstellung des (der) homologen Fragments oder Fragmente in Schritt c) kann durch Amplifizieren einer (von) homologen DNA-Sequenzen (z. B. umfassend eine oder mehrere Mutationen im lipolytischen Gen und beinhaltet in einem Plasmid oder Vektor) durch beliebige geeignete Verfahren wie durch ein Standard-PCR-Amplifikationsverfahren, beschrieben in US 4,683,202 oder Saiki et al., (1988), Science 239, 487–491, durchgeführt werden.

**[0216]** Der (die) Vektoren) können in die Rekombinationswirtszelle (in Schritt d)) durch Transformation eingebracht werden. In dem Fall, in welchem die Rekombinationswirtszelle ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae*

siae, wie *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 (nachstehend beschrieben) ist, kann die Transformation wie von Sambrook et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor, NY, USA) beschrieben durchgeführt werden.

**[0217]** Das Screenen nach positiven lipolytischen Enzymvarianten kann z. B. durch das in Verbindung mit der vorstehenden Zufallsmutagenese beschriebenen Screeningverfahren durchgeführt werden.

**[0218]** Ein oder mehrere Zyklen von Schritt a) bis f) können durchgeführt werden, bevor eine Selektion einer lipolytischen Erstwaschenzymvariante unter Herstellung der weiter vorstehend definierten Selektionsbedingungen hergestellt wird.

**[0219]** Gemäß dem Schiebeverfahren können bedeutsamerweise mehr als zwei DNA-Sequenzen verschoben werden. Eine beliebige Anzahl an verschiedenen DNA-Fragmenten und homologen lipolytischen Enzymen, die in geeigneten Plasmiden enthalten sind, können gleichzeitig verschoben werden.

**[0220]** Bei den zu kombinierenden DNA-Sequenzen kann es sich um die gesamten Gene handeln, unter welchen mindestens ein Teil ausreichende Homologie zu den anderen zeigt, um das Stattfinden der Kombination der Gene zu gewähren. In einer anderen Ausführungsform kann es sich bei den DNA-Sequenzen um Teilgene handeln, die beim Kombinieren ein funktionelles Gen erhöhen können, das ein lipolytisches Enzym exprimieren kann.

**[0221]** Sind die zu kombinierenden DNA-Sequenzen stark homolog oder teilweise identisch, kann z. B. im Falle der Kombination von zwei DNA-Sequenzen zum Kombinieren des N-terminalen Teils von einer der Sequenzen mit dem C-terminalen Teil der anderen (entsprechend dem übrigen Teil der ersten Sequenz) oder durch Kombinieren von anderen relevanten Teilen der fraglichen entsprechenden Gene eine kontrollierte Kombination durchgeführt werden.

**[0222]** Natürlich vorkommende Enzyme können, bevor sie dem Gen-Schieben unterzogen werden, durch zufällige, lokalisierte zufällige oder zielgerichtete Mutagenese, wie vorstehend beschrieben, genetisch modifiziert werden. In einer anderen Ausführungsform kann ein Teil von einem Enzym durch einen anderen Teil eines anderen ersetzt werden, um ein chimäres Enzym zu erhalten. Dieser Ersatz kann entweder durch herkömmliche Gen-Verbindungstechniken in vitro oder in vivo Rekombination oder durch Kombination beider Techniken erzielt werden. Bei der Verwendung von herkömmlichen Gen-Verbindungstechniken in vitro kann der gewünschte Teil des lipolytischen Enzymgens unter Verwendung von geeigneten zielgerichteten Restriktionsenzymen deletiert werden und der deletierte Teil der Kodierungssequenz durch Einfügung eines Teils einer ein anderes lipolytisches Enzym kodierenden Sequenz ersetzt werden, so dass eine chimäre Nukleotidsequenz hergestellt wird, die ein neues lipolytisches Enzym kodiert. In einer anderen Ausführungsform können lipolytische Enzymgene, z. B. unter Verwendung des durch Higuchi et al., 1988, beschriebenen PCR-Überlagerungsadditionsverfahrens kondensiert werden.

**[0223]** Die in vivo Rekombinationstechniken hängen von der Tatsache ab, dass verschiedene DNA-Segmente mit hoch homologen Regionen (Identifizierung von DNA-Sequenz) rekombinieren, d. h. DNA aufbrechen und auswechseln und neue Bindungen im homologen Bereich aufbauen können. Demzufolge führt, bei Verwendung der Kodierungssequenzen für zwei oder mehrere verschiedene, jedoch homologe lipolytische Enzyme zum Transformieren einer Wirtszelle, die Rekombination von homologen Sequenzen in vivo zur Herstellung von chimären Gensequenzen. Eine Translation dieser Kodierungssequenzen durch die Wirtszelle führt in vivo zur Herstellung eines chimären lipolytischen Enzymgenprodukts. Spezifische Rekombinationstechniken sind in US 5,093,257 und EP 252 666 beschrieben.

**[0224]** Zum Gewähren des Stattfindens von homologer Rekombination ist es erwünscht, dass die lipolytischen Enzyme Teile umfassen, die zu mindestens 60% homolog sind. Es ist besonders bevorzugt, dass die gesamten Enzyme zu mindestens 60% homolog sind. Bei den zu kombinierenden Enzymen kann es sich um verschiedene Varianten desselben Stammenzyms, z. B. Varianten, die von dem hier offenbarten lipolytischen Enzym von *H. lanuginosa* abgeleitet sind, oder Varianten, die von weiter vorstehend genannten lipolytischen Enzymen von *Ps. alcaligenes* oder *Ps. pseudoalcaligenes* abgeleitet sind, oder Varianten, die vom lipolytischen Enzym von *F. solani pisi* (vgl. vorstehend) abgeleitet sind, oder Varianten, die vom lipolytischen Enzym von *P. mendocina* oder der Lipase von *Pseudomonas* sp. (*Liposam*) (vgl. vorstehend) abgeleitet sind, handeln. Es ist klar, dass die zufällige Rekombination zwischen einem natürlich vorkommenden lipolytischen Enzym und einer oder mehreren Varianten des Enzyms, zwischen verschiedenen natürlich vorkommenden Enzymen, zwischen Varianten von natürlich vorkommenden Enzymen (wobei es sich bei den Varianten um Varianten des-

selben Stammenzym oder von verschiedenen Enzymen handelt) oder zwischen einer Kombination von natürlich vorkommenden Enzymen und Varianten von natürlich vorkommenden Enzymen durchgeführt werden kann, sofern die entsprechenden DNA-Sequenzen rekombinieren können. Handelt es sich bei den zu kombinierenden DNA-Sequenzen um Varianten eines Stammenzyms, können diese Varianten günstigerweise durch die Mutagenese, insbesondere durch das vorstehend offenbarte zufällige Mutageneseverfahren hergestellt werden.

**[0225]** In einer anderen Ausführungsform kann das Hybridenzym durch auf dem Fachgebiet bekannte chemische Standardverfahren synthetisiert werden. Siehe z. B. Hunkapiller et al. (1984). Demzufolge können Peptide mit den vorstehend beschriebenen Aminosäuresequenzen im Ganzen oder teilweise synthetisiert werden und unter Bildung der Hybridenzyme der Erfindung verbunden werden.

**[0226]** In einer stark bevorzugten Ausführungsform werden die lipolytischen Erstwaschenzyme der Erfindung durch ein Verfahren konstruiert, das das Unterziehen eines lipolytischen Stammenzyms einer Mutagenese, insbesondere einer Zufallsmutagenese unter Bildung einer Vielfalt an mutierten DNA-Sequenzen, Exprimieren der mutierten DNA-Sequenzen in einen geeigneten Wirt und Screenen nach Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym herstellen, das eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente aufweist, Unterziehen der DNA-Sequenz, die das mutierte lipolytische Enzym kodiert, das beim Screenen selektiert wurde, einer in vivo Rekombination, insbesondere einem Gen-Schieben oder einer Sexual-PCR mit einer oder mehreren anderen mutierten DNA-Sequenzen, die in ähnlicher Weise aus demselben lipolytischen Stammenzym hergestellt sind, Exprimieren der mutierten rekombinierten DNA-Sequenzen in einem geeigneten Wirt, gegebenenfalls Selektieren von Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym herstellen, das eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente aufweist, gegebenenfalls Wiederholen von einer oder beiden der vorstehenden Mutagenesen und ein- oder mehrfachen in vivo Rekombinationsverfahren unter Verwendung von strengeren Kriterien des Screenens und schließlich Selektieren einer rekombinierten DNA-Sequenz, die ein lipolytisches Enzym kodiert, das wie hier definierte Erstwaschaktivität aufweist, umfasst.

**[0227]** Weiterhin ist es klar, dass ein lipolytisches Erstwaschenzym der Erfindung, das eine Peptidaddition sowie (eine) Mutationen in einem strukturellen Teil des Stammenzyms umfasst, durch ein Verfahren konstruiert werden kann, das lokalisierte Mutagenese, insbesondere lokalisierte Zufallsmutagenese im Teil der die Peptidaddition kodierenden DNA-Sequenz und in selektierten Teilen der den reifen Teil des lipolytischen Stammenzyms kodierenden DNA-Sequenz, d. h. eine Kombination von zufälligen Mutageneseverfahren gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung, die in einem strukturellen Teil des Stammenzyms durchgeführt wird, und Zufallsmutagenese in einem nichtstrukturellen Teil des N-terminalen und/oder C-terminalen Endes und/oder in einer am N-terminalen und/oder C-terminalen Teil angebrachten Peptidaddition beinhaltet.

**[0228]** Es ist klar, dass die hier offenbarten in vivo Rekombinations- und Mutageneseverfahren auf jedes beliebige der lipolytischen Stammenzyme angewandt werden kann, die hier im Abschnitt „Lipolytische Stammenzyme“ erwähnt sind. Besonders bevorzugte lipolytische Stammenzyme sind von *Humicola lanuginosa* und von *Pseudomonas* sp. wie *Ps. alcaligenes* und *Ps. pseudoalcaligenes* abgeleitet.

#### Expression eines lipolytischen Enzyms der Erfindung

**[0229]** Eine ein lipolytisches Erstwaschenzym der Erfindung kodierende isolierte Nukleinsäuresequenz kann in einer Vielfalt von Wegen manipuliert werden, um die Expression des Enzyms bereitzustellen. Eine Manipulation der ein lipolytisches Erstwaschenzym kodierenden Nukleinsäuresequenz vor ihrem Einfügen in einen Vektor kann abhängig vom Expressionsvektor erwünscht oder nötig sein. Die Techniken zum Modifizieren von Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung von Klonverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

**[0230]** Der Begriff „Kontrollsequenzen“ ist hier definiert, um alle Komponenten einzuschließen, die zur Expression der Kodierungssequenz der Nukleinsäuresequenz nötig oder vorteilhaft sind. Jede Kontrollsequenz kann für die das lipolytische Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz nativ oder fremd sein. Solche Kontrollsequenzen schließen einen Leader, eine Polyadenylierungssequenz, eine Propeptidsequenz, einen Promotor, eine Signalsequenz und einen Transkriptionsterminator ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Minimal schließen die Kontrollsequenzen einen Promotor und Transkriptions- und Translationsstoppsignale ein. Die Kontrollsequenzen können zum Zwecke des Einbringens von spezifischen Restriktionsstellen, die die Bindung der Kontroll-Sequenzen mit dem Kodierungsbereich der Nukleinsäuresequenz erleichtern, mit Verbindungsgruppen bereitgestellt werden.

**[0231]** Bei der Kontrollsequenz kann es sich um eine geeignete Promotorsequenz, eine Nukleinsäuresequenz, die von einer Wirtszelle zur Expression der Nukleinsäuresequenz erkannt wird, handeln. Die Promotorsequenz enthält die Expression des lipolytischen Erstwaschenzyms vermittelnde Transkriptions- und Translationskontrollsequenzen. Bei dem Promotor kann es sich um eine beliebige Nukleinsäuresequenz handeln, die Transkriptionsaktivität in der Wirtszelle der Wahl aufzeigt und von Genen erhalten wird, die extrazelluläre oder intrazelluläre Polypeptide entweder homolog oder heterolog zu der Wirtszelle kodieren. Beispiele für geeignete Promotoren zum Leiten der Transkription von Nukleinsäurekonstrukten der vorliegenden Erfindung, insbesondere in einer Bakterienwirtszelle, sind die Promotoren, die vom lac-Operon von *E. coli*, vom Agarase-Gen (*dagA*) von *Streptomyces coelicolor*, vom Levansaccharase-Gen (*sacB*) oder alkalischen Proteasegen von *B. subtilis*, vom alpha-Amylase-Gen (*amyL*) von *B. licheniformis*, vom maltogenen Amylase-Gen (*amyM*) von *B. stearotheophilus*, vom alpha-Amylase-Gen (*amyQ*) von *B. amyloliquefaciens*, vom Penicillinase-Gen (*penP*) von *B. licheniformis*, von den *xyLA*- und *xyIB*-Genen von *B. subtilis*, vom Xylosidase-Gen von *B. pumilus* und vom prokaryotischen beta-Lactamase- oder Tryptophan-Gen (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727–3731), sowie vom *tac*-Gen (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21–25) abgeleitet sind. Weitere Promotoren sind in „Useful proteins from recombinant bacteria“ in Scientific American, 1980, 242: 74–94 und in Sarnbrook et al., 1989, vorstehend, beschrieben. Beispiele für geeignete Promotoren zum Leiten der Transkription der Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung in einer Fadenpilzzelle sind Promotoren, die von den Genen erhalten werden, die TKA-Amylase von *A. oryzae*, Triosephosphatisomerase von *A. oryzae*, Aspartamproteinase von *Rhizomucor miehei*, neutrale alpha-Amylase von *A. niger*, säurestabile alpha-Amylase von *A. niger*, Glucoamylase (*glaA*) von *A. niger* oder *A. awamori*, Lipase von *Rhizomucor miehei*, alkalische Protease von *A. oryzae*, Triosephosphatisomerase von *A. oryzae*, Acetamidase von *A. nidulans*, Trypsin-ähnliche Protease von *Fusarium oxysporum* (wie beschrieben in US-Patent 4,288,627, das hier unter Bezugnahme eingebracht ist) oder den ADH-3-Promotor (McKnight et al., (1985), The EMBO J. 4, 2093–3099) und Hybride davon kodieren. Besonders bevorzugte Promotoren zur Verwendung in Fadenpilzzellen sind die TKA-Amylase und die *glaA*-Promotor. In einem Hefewirt sind bevorzugte Promotoren von Hefeglykolytischen Enzymen (Hitzeuran et al., (1980), J. Biol. Chem. 255, 12073–12080; Alber und Kawasaki, (1982), J. Mol. Appl. Gen. 1, 419–434) oder Alkoholdehydrogenase-Genen (Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al., Hrsg.), Plenum Press, New York, 1982) oder der Promotor TP11 (US 4,599,311) oder ADH2-4c (Russell et al., (1983), Nature 304, 652m654). Nützliche Promotoren werden vom Enolase-Gen (*ENO-1*) von *S. cerevisiae*, dem Galctokinase-Gen (*GAL1*) von *S. cerevisiae*, den Alkoholdehydrogenase/Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Genen (*ADH2/GAP*) von *S. cerevisiae* und dem 3-Phosphoglyceratkinase-Gen von *S. cerevisiae* erhalten. Andere nützliche Promotoren von Hefewirtszellen sind von Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423–488 beschrieben.

**[0232]** Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um eine geeignete Transkriptions-Terminator-Sequenz, eine Sequenz, die von einer Wirtszelle zum Terminieren von Transkription erkannt wird, handeln. Die Terminatorsequenz ist funktionsfähig an den 3'-Terminus der das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz gebunden. Die Terminatorsequenz kann für die das lipolytische Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz nativ sein oder von fremden Quellen erhalten werden. Jeder beliebige Terminator, der in der Wirtszelle der Wahl funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Terminatoren für Fadenpilzwirtszellen werden von den Genen erhalten, die TKA-Amylase von *A. oryzae*, Glucoamylase von *A. niger*, Anthranilatsynthase von *A. nidulans*, alpha-Glucosidase von *A. niger* und Trypsin-ähnliche Protease von *Fusarium oxysporum* kodieren. Bevorzugte Terminatoren für Hefewirtszellen werden von Genen erhalten, die Enolase von *S. cerevisiae*, Cytochrom C (*CYC1*) von *S. cerevisiae* oder Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase von *S. cerevisiae* kodieren. Andere nützliche Terminatoren für Hefewirtszellen sind von Romanos et al., 1992, vorstehend, beschrieben.

**[0233]** Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch eine geeignete Leadersequenz, eine nichttranslatierte Region einer mRNA handeln, die für eine Translation aus der Wirtszelle wichtig ist. Die Leadersequenz ist funktionsfähig an den 5'-Terminus der das lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz gebunden. Die Leadersequenz kann für die das lipolytische Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz nativ sein oder von fremden Quellen erhalten werden. Jede beliebige Leadersequenz, die in der Wirtszelle der Wahl funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Leader für Fadenpilzwirtszellen werden von den Genen erhalten, die TKA-Amylase von *A. oryzae* und Triosephosphatisomerase von *A. oryzae* kodieren. Geeignete Leader für Hefewirtszellen werden von dem Enolase-Gen (*ENO-1*) von *S. cerevisiae* in 3-Phosphoglyceratkinase-Gen von *S. cerevisiae*, dem alpha-Faktor von *S. cerevisiae* und den Alkoholdehydrogenase/Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Genen (*ADH2/GAP*) von *S. cerevisiae* erhalten.

**[0234]** Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um eine Polyadenylierungssequenz, eine Sequenz, die

funktionsfähig an den 3'-Terminus der Nukleinsäuresequenz gebunden ist und beim Transkribieren von der Wirtszelle als Signal zum Addieren von Polyadenosinresten an transkribierte mRNA erkennbar ist, handeln. Die Polyadenylierungssequenz kann für die das lipolytische Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz nativ sein oder von fremden Quellen erhalten werden. Jede beliebige Polyadenylierungssequenz, die für die Wirtszelle der Wahl funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Adenylierungssequenzen für Fadenpilzzellen werden von den Genen erhalten, die TAKA-Amylase von *A. oryzae*, Glucoamylase von *A. niger*, Anthranilatsynthase von *A. nidulans* und alpha-Glucosidase von *A. niger* kodieren. Nützliche Polyadenylierungssequenzen für Hefewirtszellen sind von Guo und Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983–5990 beschrieben. Polyadenylierungssequenzen sind auf dem Fachgebiet für Säugervirtszellen bekannt.

**[0235]** Bei der Kontrollsequenz kann es sich auch um eine ein Signalpeptid kodierende Region handeln, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die an den Aminoterminus des lipolytischen Erstwaschenzyms gebunden ist, das direkt das lipolytische Erstwaschenzym in den Sekretionsweg der Zelle exprimieren kann. Die ein Signalpeptid kodierende Region kann für das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung nativ sein oder von fremden Quellen erhalten werden. Das 5'-Ende der Kodierungssequenz der Nukleinsäuresequenz kann von Natur aus eine ein Signalpeptid kodierende Region enthalten, die normalerweise im Translationsablesegerüst mit dem das sekretierte lipolytische Erstwaschenzym kodierenden Segment der Kodierungsregion verbunden ist. In einer anderen Ausführungsform kann das 5'-Ende der Kodierungssequenz eine ein Signalpeptid kodierende Region enthalten, die für diesen Teil der das sekretierte lipolytische Erstwaschenzym kodierenden Kodierungssequenz fremd ist. Die fremde Signalpeptidkodierungsregion kann erforderlich sein, wenn die Kodierungssequenz normalerweise keine Signalpeptidkodierungsregion enthält. In einer anderen Ausführungsform kann die fremde Signalpeptidkodierungsregion einfach die natürliche Signalpeptidkodierungsregion ersetzen, um eine verbesserte Sekretion des lipolytischen Enzyms in Bezug auf die normalerweise mit der Kodierungssequenz verbundene natürliche Signalpeptidkodierungsregion zu erhalten. Die Signalpeptidkodierungsregion kann von einem Glucoamylase- oder einem Amylase-Gen von einer *Aspergillus*-Spezies, einem Lipase- oder Proteinas-Gen von einer *Rhizomucor*-Spezies, dem Gen für den  $\alpha$ -Faktor von *Saccharomyces cerevisiae*, einem Amylase- oder Protease-Gen von einer *Bacillus*-Spezies oder dem Kalbspräprochymosin-Gen erhalten werden.

**[0236]** Bei einer wirksamen Signalpeptidkodierungsregion für Bakterienwirtszellen handelt es sich um die Signalpeptidkodierungsregion, die von dem maltogenen Amylase-Gen von *Bacillus* NCIB 11837, dem alpha-Amylase-Gen von *B. stearothermophilus*, dem Subtilisin-Gen von *B. licheniformis*, dem beta-Lactamase-Gen von *B. licheniformis*, den neutralen Protease-Genen (*nprT*, *nprS*, *nprM*) von *B. stearothermophilus* und dem *PrsA*-Gen von *B. subtilis* erhalten werden. Weitere Signalpeptide sind von Simonen und Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109–137 beschrieben. Bei einer wirksamen Signalpeptidkodierungsregion für Fadenpilzzellen handelt es sich um die Signalpeptidkodierungsregion, die vom TAKA-Amylasegen von *A. oryzae*, vom neutralen Amylase-Gen von *A. niger*, vom Aspartamproteinas-Gen von *Rhizomucor miehei*, vom Cellulase-Gen von *H. lanuginosa* oder vom Lipase-Gen von *Rhizomucor miehei* erhalten wird. Nützliche Signalpeptide für Hefewirtszellen werden von den Genen vom  $\alpha$ -Faktor von *S. cerevisiae* und der Invertase von *S. cerevisiae* erhalten. Andere nützliche Signalpeptid-Kodierungsregionen sind von Romanos et al., 1992, vorstehend beschrieben. Jedoch kann jede beliebige Signalpeptidkodierungsregion, die das exprimierte Enzym in den Sekretionsweg einer Wirtszelle der Wahl leiten kann, in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0237]** Die Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung können auch eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen umfassen, die einen oder mehrere für die Expression des lipolytischen Erstwaschenzyms vorteilhafte Faktoren, z. B. einen Aktivator (z. B. einen transwirkenden Faktor), ein Chaperon und eine Verarbeitungsprotease kodieren. Die einen oder mehrere dieser Faktoren kodierende Nukleinsäure liegt nicht unbedingt hinter der das lipolytische Erstwaschenzym kodierenden Nukleinsäuresequenz. Ein Aktivator ist ein Protein, das die Transkription einer ein lipolytisches Erstwaschenzym kodierenden Nukleinsäuresequenz aktiviert (Kudla et al., 1990, *EMBO Journal* 9: 1355–1364; Jarai und Buxton, 1994, *Current Genetics* 26: 2238–244; Verdier, 1990, *Yeast* 6: 271–297). Die einen Aktivator kodierende Nukleinsäuresequenz kann von den Genen erhalten werden, die *NprA* (*nprA*) von *B. stearothermophilus*, Heine-Aktivatorprotein-1 (*hap1*) von *S. cerevisiae*, Galactose-metabolisierendes Protein 4 (*gal4*) von *S. cerevisiae* und Ammoniak-Regulierungsprotein (*areA*) von *A. nidulans* kodieren. Für weitere Beispiele siehe Verdier, 1990, vorstehend, und MacKenzie et al., 1993, *Journal of General Microbiology* 139: 2295–2307. Ein Chaperon ist ein Protein, das ein anderes Polypeptid bei der Faltungsgenauigkeit unterstützt (Hartl et al., 1994, *TIBS* 19: 20–25; Bergeron et al., 1994, *TIBS* 19: 124–128; Demolder et al., 1994, *Journal of Biotechnology* 32: 179–189; Craig, 1993, *Science* 260: 1902–1903; Gething und Sambrook, 1992, *Nature* 355: 33–45; Puig und Gilbert, 1994, *Journal of Biological Chemistry* 269: 7764–7771; Wang und Tsou, 1993, *The FASEB Journal* 7: 1515–11157; Robinson et al., 1994, *Bio/Technology* 1: 381–384).

Eine ein Chaperon kodierende Nukleinsäuresequenz kann aus den Genen erhalten werden, die GroE-Proteine von *B. subtilis*, Proteindisulfidisomerase von *A. oryzae*, Calnexin von *S. cerevisiae*, BiP/GRP78 von *S. cerevisiae* und Hsp70 von *S. cerevisiae* kodieren. Für weitere Beispiele siehe Gething und Sambrook, 1992, vorstehend, und Hartl et al., 1994, vorstehend. Jeder beliebige Faktor, der in der Wirtszelle der Wahl funktionell ist, kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0238]** Es kann auch erwünscht sein, Regulationssequenzen zu addieren, die die Regulierung der Expression des lipolytischen Erstwaschenzyms in Bezug auf das Wachstum der Wirtszelle gewähren. Beispiele für Regulationssysteme sind diejenigen, die das An- und Abschalten der Expression des Gens in Reaktion auf einen chemischen oder physikalischen Reiz, einschließlich der Gegenwart einer Regulationsverbindung, bewirken. Regulationssysteme in prokaryotischen Systemen würden die lac-, tac- und trp-Operator-Systeme einschließen. In Hefen kann das ADH2-System oder GAL1-System verwendet werden. In Fadenpilzen können der TA-KA-Alpha-Amylasepromotor, Glucoamylasepromotor von *A. niger* und der Glucoamylasepromotor von *A. oryzae* als Regulationssequenzen verwendet werden. Andere Beispiele für Regulationssequenzen sind diejenigen, die Genamplifikation gewähren. In eukaryotischen Systemen schließen diese das in Gegenwart von Methotrexat amplifizierte Dihydrofolatreduktase-Gen und die mit Schwermetallen amplifizierten Metallothionein-Gene ein. In diesen Fällen würde die das lipolytische Erstwaschenzym kodierende Nukleinsäuresequenz hinter der Regulationssequenz platziert sein.

### Expressionsvektoren

**[0239]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung, einen Promotor und Transkriptions- und Translationsstoppsignale umfassen. Die verschiedenen vorstehend beschriebenen Nukleinsäure- und Kontrollsequenzen können miteinander verbunden werden, um einen rekombinanten Expressionsvektor herzustellen, der zum Gewähren der Einfügung oder Substitution der das lipolytische Erstwaschenzym an solchen Stellen kodierenden Nukleinsäuresequenz eine oder mehrere günstige Restriktionsstellen einschließen können. In einer anderen Ausführungsform kann die Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung durch Einfügen der Nukleinsäuresequenz oder eines die Sequenz umfassenden Nukleinsäurekonstrukts in einen geeigneten Vektor zur Expression exprimiert werden. Beim Bilden des Expressionsvektors ist die Kodierungssequenz im Vektor so lokalisiert, dass die Kodierungssequenz zur Expression und zur möglicherweise Sekretion funktionsfähig mit den geeigneten Kontrollsequenzen verbunden ist.

**[0240]** Bei dem rekombinanten Expressionsvektor kann es sich um einen beliebigen Vektor handeln, der günstigerweise rekombinanten DNA-Verfahren unterzogen werden und die Expression der Nukleinsäuresequenz hervorbringen kann. Die Wahl des Vektors hängt typischerweise von der Vereinbarkeit des Vektors mit der Wirtszelle ab, in welche der Vektor einzubringen ist. Bei den Vektoren kann es sich um lineare oder geschlossen zirkuläre Plasmide handeln. Bei dem Vektor kann es sich um einen autonom replizierenden Vektor, d. h. einen Vektor, der als extra-chromosomale Ganzheit vorliegt, wobei die Replikation davon von der chromosomalen Replikation unabhängig ist, z. B. um ein Plasmid, ein extrachromosomales Element, ein Minichromosom oder ein künstliches Chromosom handeln. Der Vektor kann beliebige Mittel zur Gewährleistung von Selbstreplikation enthalten. In einer anderen Ausführungsform kann es sich bei dem Vektor um einen handeln, der beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom integriert und zusammen mit dem (den) Chromosom(en), in welches er integriert wurde, repliziert wird. Bei dem Vektorsystem kann es sich um einen einzelnen Vektor oder ein einzelnes Plasmid oder zwei oder mehrere Vektoren oder Plasmide, die zusammen eine in das Genom der Wirtszelle einzubringende Gesamt-DNA enthalten, oder ein Transposon handeln.

**[0241]** Die Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise eine oder mehrere selektierbare Markierungen, die eine leichte Selektion von transformierten Zellen gewähren. Bei einer selektierbaren Markierung handelt es sich um ein Gen, wobei das Produkt davon biozide oder virale Resistenz, Resistenz gegenüber Schwermetallen, Prototrophie gegenüber Auxotrophen und dergleichen bereitstellt. Beispiele für bakterielle selektierbare Markierungen sind die dal-Gene von *B. subtilis* oder *B. licheniformis* oder Markierungen, die Antibiotikumresistenz wie Ampicillin-, Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyclinresistenz verleihen. Bei einer häufig verwendeten Säugermarkierung handelt es sich um das Dihydrofolatreduktase-Gen. Bei geeigneten Markierungen für Hefewirtszellen handelt es sich um ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 und UR3. Eine selektierbare Markierung zur Verwendung in einer Fadenpilzwirtszelle kann ausgewählt werden aus der Gruppe, einschließend, jedoch nicht beschränkt auf amdS (Acetamidase), argB (Ornithincarbamoyltransferase), bar (Phosphinothricinacetyltransferase), hygB (Hygromycinphosphotransferase), niaD (Nitratreduktase), pyrG (Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase), sC (Sulfatadenyltransferase), trpC (Anthranilatsynthase) und Glufosinatreistenzmarkierungen sowie Äquivalente von anderen Spezies. Bevorzugt zur Verwendung in einer



Aspergillus-Zelle sind die amdS- und pyrG-Markierungen von *A. nidulans* oder *A. oryzae* und die bar-Markierung von *Streptomyces hygroscopicus*. Weiterhin kann eine Selektion durch Co-Transformation, z. B. wie beschrieben in WO 91/17243 erzielt werden, wobei die selektierbare Markierung auf einem getrennten Vektor vorliegt.

**[0242]** Die Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise (ein) Element(e), das (die) eine stabile Integration des Vektors in das Wirtszellengenom oder eine autonome Replikation des Vektors in der Wirtszelle unabhängig von dem Genom der Zelle gewährt (gewähren).

**[0243]** Die Vektoren der vorliegenden Erfindung können beim Einbringen in eine Wirtszelle in das Wirtszellengenom integriert werden. Zur Integration kann der Vektor von der das lipolytische Erstwaschenzym kodierenden Nukleinsäuresequenz oder einem beliebigen anderen Element des Vektors zur stabilen Integration des Vektors in das Genom durch homologe oder nichthomologe Rekombination abhängen. In einer anderen Ausführungsform kann der Vektor zusätzliche Nukleinsäuresequenzen zum Leiten von Integration durch homologe Rekombination in das Genom der Wirtszelle enthalten. Die zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen ermöglichen, dass der Vektor in das Wirtszellengenom an einer genauen Lokalisierung oder an genauen Lokalisierungen im Chromosom oder in den Chromosomen integriert wird. Zur Erhöhung; der Wahrscheinlichkeit der Integration an einer genauen Lokalisierung sollten die Integrationselemente vorzugsweise eine ausreichende Anzahl an Nukleinsäuren, wie 100 bis 1.500 Basenpaare, vorzugsweise 400 bis 1.500 Basenpaare, und besonders bevorzugt 800 bis 1.500 Basenpaare enthalten, die mit der entsprechenden Zielsequenz zum Erhöhen der Wahrscheinlichkeit von homologer Rekombination stark homolog sind. Bei den Integrationselementen kann es sich um jede beliebige Sequenz handeln, die zu der Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homolog ist. Weiterhin kann es sich bei den Integrationselementen um nichtkodierende oder kodierende Nukleinsäuresequenzen handeln. Andererseits kann der Vektor in das Genom der Wirtszelle durch nichthomologe Kombination integriert werden. Bei diesen Nukleinsäuresequenzen kann es sich um eine beliebige Sequenz, die mit einer Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homolog ist, und weiterhin um nichtkodierende oder kodierende Sequenzen handeln.

**[0244]** Zur autonomen Replikation kann der Vektor ferner einen Replikationsursprung umfassen, der die autonome Replikation des Vektors in der fraglichen Wirtszelle ermöglicht. Beispiele für Bakterien-Replikationsursprünge sind Replikationsursprünge der Plasmide pBR322, pUC19, pACYC177, pACYC184, pUB110, pE194, pTA1060 und pAM $\beta$ 1. Beispiele für Replikationsursprünge zur Verwendung einer Hefewirtszelle sind die Replikationsursprünge mit 2 Mikron, die Kombination von CEN6 und ARS4 und die Kombination von CEN3 und ARS1. Bei dem Replikationsursprung kann es sich auch um einen handeln, der eine Mutation aufweist, die ihn in einer Wirtszelle temperaturempfindlich funktionieren lässt (siehe z. B. Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

**[0245]** Mehr als eine Kopie einer ein lipolytisches Erstwaschenzym kodierenden Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung kann zum Amplifizieren der Expression der Nukleinsäuresequenz in die Wirtszelle eingefügt werden. Eine stabile Amplifikation der Nukleinsäuresequenz kann durch Integrieren mindestens einer zusätzlichen Kopie der Sequenz in das Wirtszellengenom unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren und Selektieren von Transformanten erhalten werden.

**[0246]** Die zum Binden der vorstehend beschriebenen Elemente zum Aufbau der rekombinanten Expressionsvektoren der Erfindung verwendeten Verfahren sind dem Fachmann bekannt (siehe z. B. Sambrook et al., 1989, vorstehend).

#### Wirtszellen

**[0247]** Die vorliegende Erfindung betrifft: auch eine Nukleinsäuresequenz der Erfindung umfassenden rekombinanten Wirtszellen, die vorteilhaft bei der rekombinanten Herstellung von lipolytischen Erstwaschenzymen verwendet werden. Die Zelle wird vorzugsweise in einen eine Nukleinsäuresequenz der Erfindung umfassenden Vektor transformiert, gefolgt von der Integration des Vektors in das Wirtschromosom. „Transformation“ bedeutet das Einbringen eines eine Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung umfassenden Vektors in eine Wirtszelle, so dass der Vektor als chromosomaler Integrant oder als selbstreplizierender extrachromosomaler Vektor gehalten wird. Es wird im Allgemeinen erwogen, dass eine Integration vorteilhaft ist, da die Nukleinsäuresequenz mit größerer Wahrscheinlichkeit in der Zelle stabil gehalten wird. Eine Integration des Vektors in das Wirtschromosom kann durch wie vorstehend beschriebene homologe oder nichthomologe Rekombination stattfinden.

**[0248]** Die Wahl einer Wirtszelle hängt zu einem großen Grad von dem das lipolytische Erstwaschenzym kodierenden Gen und seiner Quelle ab. Zusätzlich hängt die Wahl der Wirtszelle häufig von dem proteolytischen Enzymsystem der Wirtszelle und seinem Einfluss auf die Herstellung eines lipolytischen Erstwaschenzyms der Erfindung ab. Demzufolge kann es erwünscht sein, eine Wirtszelle zu verwenden, welcher es an einem oder mehreren proteolytischen Enzymen oder anderen Enzym-verarbeitenden Mitteln mangelt. An Protease mangelnden Wirtszellen von Bakterien sowie Pilz (Fadenpilz oder Hefe)-Zellen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Umfasst das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung eine Peptidaddition, kann es vorteilhaft sein, dass der Wirt ein Stamm ist, welcher um eine oder mehrere Exoproteasen, die das modifizierte lipolytische Enzym an einer Stelle nahe der Peptidaddition spalten können, oder einer Protease, die mit der Peptidaddition abspalten kann, reduziert ist oder es ihm an diesen mangelt. Zum Beispiel kann die Wirtszelle um eine Tripeptidylamino-peptidase (TPAP) (siehe z. B. WO 96/14404 von Novo Nordisk A/S), einer Dipeptidylamino-peptidase (DPAP) und/oder einer Kex2-Protease oder Kex2-ähnlichen Protease reduziert sein oder es ihm an diesen mangeln und kann deshalb an dibasischen Stellen wie Arg-Arg (RR) nicht spalten.

**[0249]** Andere Beispiele für Wirtszellen schließen alkalische, an Protease mangelnde oder um diese reduzierte Wirtszellen, an Aspartamproteinasen mangelnde Wirtszellen (EP 429 490) und Wirtszellen, welchen es an proteolytischen Enzymen mangelt, wie die Wirtszellen, die in WO 93/00925, WO 92/17595, EP 341 215, EP 574 347 und PCT/DK 96/00111 beschrieben sind, ein.

**[0250]** Bei der Wirtszelle kann es sich um einen einzelligen Mikroorganismus oder einen nichteinzelligen Mikroorganismus handeln. Nützliche einzellige Zellen sind Bakterienzellen wie grampositive Bakterien, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, eine *Bacillus*-Zelle, z. B. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. megaterium* und *B. thuringiensis*; oder eine *Streptomyces*-Zelle, z. B. *S. lividans* oder *S. murinus*, oder gramnegative Bakterien wie *E. coli* und *Pseudomonas* sp. (insbesondere, wenn ein lipolytisches Bakterienenzym wie ein Enzym von *Pseudomonas* sp. herzustellen ist) ein. Die Transformation einer Bakterienwirtszelle kann z. B. durch Protoplasttransformation (siehe z. B. Chang und Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111–115) unter Verwendung von kompetenten Zellen (siehe z. B. Young und Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823–829, oder Dubnar und Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209–221), durch Elektroporation (siehe z. B. Shigekawa und Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742–751) oder durch Konjugation (siehe z. B. Köhler und Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771–5278) bewirkt werden.

**[0251]** Bei der Wirtszelle kann es sich um einen Eukaryot handeln und es handelt, insbesondere zur Herstellung eines modifizierten lipolytischen Enzyms eukaryotischen Ursprungs, sich vorzugsweise um eine Pilz-, d. h. eine Hefezelle oder eine Fadenpilzzelle.

**[0252]** „Hefe“ schließt, wie hier verwendet, ascosporogene Hefe (Endomycetales), basidiosporogene Hefe und Hefe, die zu dem Pilz Imperfecti (Blastomycetes) gehört, ein. Die ascosporogenen Hefen werden in die Familien *Spermophthoraceae* und *Saccharomycetaceae* unterteilt. Letztere wird von den vier Unterfamilien *Schizosaccharomycoideae* (z. B. der Gattung *Schizosaccharomyces*), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* und *Saccharomycoideae* (z. B. der Gattung *Pichia*, *Kluyveromyces* und *Saccharomyces*) enthalten. Die basidiosporogenen Hefen schließen die Gattung *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* und *Filobasidiella* ein. Hefen, die zum Pilz Imperfecti gehören, sind in die zwei Familien *Sporobolomycetaceae* (z. B. der Gattung *Sorobolomyces* und *Bullera*) und *Cryptococcaceae* (z. B. der Gattung *Candida*) unterteilt. Da sich die Klassifizierung von Hefen zukünftig ändern kann, soll zum Zwecke dieser Erfindung die Hefe, wie in *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F. A., Passmore, S. M. und Davenport, R. R., Hrsg, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series Nr. 9, 1980) definiert werden. Die Biologie von Hefen und Manipulation der Hefegenetik sind auf dem Fachgebiet bekannt (siehe z. B. *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Bacil, M., Horecker, B. J. und Stopani, A. O. M., Hrsg, 2. Auflage, 1987; *The Yeasts*, Rose, A. H. und Harrison, J. S., Hrsg, 2. Auflage, 1987; und *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Strathern et al., Hrsg., 1981). In Verbindung mit der vorliegenden Erfindung kann die Verwendung von Hefezellen, die typischerweise ein anderes proteolytisches Enzymverarbeitungssystem, wie z. B. Bakterien oder Fadenpilze, aufweisen, zur Herstellung von modifizierten lipolytischen Enzymen, die als Peptidaddition einen Teil oder alle der natürlichen Prosequenzen des fraglichen lipolytischen Stammenzyms umfassen, von besonderer Verwendung sein. Handelt es sich bei der Pilzwirtszelle um eine Hefezelle (z. B. zur Verwendung beim Anbringen einer Peptidaddition (in Form eines Teils oder der gesamten Prosequenz des Stammenzyms)), kann es sich bei der Wirtszelle um eine Zelle einer Spezies von *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* oder *Yarrowia*, wie eine Zelle von *S. cerevisiae*, eine Zelle von *S. carlsbergensis*, eine Zelle von *S. diastaticus*, eine Zelle von *S. douglasii*, eine Zelle von *S. kluyveri*, eine Zelle von *S. norbensis* oder eine Zelle von *S. oviformis* handeln.

**[0253]** „Pilz“ schließt, wie hier verwendet, den Phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota und Zygomycota (wie von Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, B. Ausgabe, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK definiert) sowie die Oomycota (wie in Hawksworth et al., 1995, vorstehend, S. 171 genannt) und alle Mitosporen-Pilze (Hawksworth et al., 1995, vorstehend) ein. Repräsentative Gruppen von Ascomycota schließen z. B. Neurospora, Eupenicillium (= Penicillium), Emericella (= Aspergillus), Eurotium (Aspergillus) und die reinrassigen vorstehend aufgezählten Hefen ein. Beispiele für Basidiomycota schließen Pilze, Rostpilze und Brandpilze ein. Beispielhafte Gruppen von Chytridiomycota schließen z. B. Allomyces, Blastocladiella, Coelomomyces und aquatische Pilze ein. Repräsentative Gruppen von Oomycota schließen z. B. Saproleniomycetous aquatische Pilze (Wasserschimmel) wie Achlya ein. Beispiele für Mitosporen-Pilze schließen Aspergillus, Penicillium, Candida und Alternaria ein. Repräsentative Gruppen von Zygomycota schließen z. B. Rhizopus und Mucor ein.

**[0254]** „Fadenpilze“ schließen alle Fadenformen der Unterteilung Eumycota und Oomycota (wie von Hawksworth et al., 1995, vorstehend, definiert) ein. Die Fadenpilze sind durch ein vegetatives Mycelium charakterisiert, das aus Chitin, Cellulose, Glucan, Chitosan, Mannan und anderen komplexen Polysacchariden zusammengesetzt ist. Vegetatives Wachstum erfolgt durch Hyphal-Verlängerung, und der Kohlenstoffkatabolismus ist zwingend aerob. Im Gegensatz dazu erfolgt das vegetative Wachstum durch Hefen wie Saccharomyces cerevisiae durch Keimen eines einzelligen Thallus, und der Kohlenstoffkatabolismus kann fermentativ sein.

**[0255]** In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Pilzwirtszelle um eine Fadenpilzzelle. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Fadenpilzwirtszelle um eine Zelle einer Spezies von, jedoch nicht beschränkt auf Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Humicola, Myceliophthora, Mucor, Neurospora, Penicillium, Thielavia, Tolypocladium und Trichoderma. In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Fadenpilzwirtszelle um eine Aspergillus-Zelle. In noch einer anderen stärker bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Fadenpilzwirtszelle um eine Fusarium-Zelle. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Fadenpilzwirtszelle um eine Zelle von A. oryzae, eine Zelle von A. niger, eine Zelle von A. foetidus oder eine Zelle von A. japonicus. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Fadenpilzwirtszelle um eine Zelle von Fusarium oxysporum oder eine Zelle von F. graminearum.

**[0256]** Pilzzellen können durch ein Verfahren transformiert werden, das Protoplasttransformation, Transformation des Protoplasten und Regeneration der Zellwand in einer an sich bekannten Weise beinhaltet. Geeignete Verfahren zur Transformation von Aspergillus-Wirtszellen sind in EP 238 023 und Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470–1474 beschrieben. Ein geeignetes Verfahren zum Transformieren von Fusarium-Spezies ist von Malardier et al., 1989, Gene 78: 147–156, oder in WO 96/00787 beschrieben. Hefen können unter Verwendung der Verfahren transformiert werden, die von Becker und Guarente, In Abelson, J. N. und Simon, M. I., Hrsg., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Bd. 194, S. 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 beschrieben sind. Säugerzellen können durch direkte Aufnahme unter Verwendung des Calciumphosphat-Ausfällungsverfahren von Graham und Van der Eb (1978, Virology 52: 546) transformiert werden.

#### Herstellungsverfahren

**[0257]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines lipolytischen Erstwaschenzyms der Erfindung, umfassend (a) Züchten einer Wirtszelle, die mit einer das Enzym kodierenden DNA-Sequenz unter die Expression des lipolytischen Erstwaschenzyms leitenden Bedingungen transformiert sind; und (b) Gewinnen des lipolytischen Erstwaschenzyms.

**[0258]** Die Wirtszelle kann in einem Nährstoffmedium gezüchtet werden, das zur Herstellung des lipolytischen Erstwaschenzyms unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren geeignet ist. Zum Beispiel kann die Zelle durch Schüttelkolben-Züchtung, Fermentation in kleinem oder großem Maßstab (einschließlich kontinuierliche, Chargen-, Zufuhr-Chargen- oder Festzustands-Fermentationen) in Labor- oder industriellen Fermentatoren, durchgeführt in einem geeigneten Medium und unter die Expression und/oder Isolierung des modifizierten lipolytischen Enzyms gewährenden Bedingungen, gezüchtet werden. Die Züchtung findet in einem geeigneten, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze umfassenden Nährstoffmedium unter Verwendung von auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren statt (siehe z. B. die Literaturangaben für Bakterien und Hefe; Bennett, J. W. und LaSure, L., Hrsg., More Gene Manipulations in Fungi; Academic Press, CA, 1991). Geeignete Medien sind von Handelsanbietern erhältlich oder können gemäß veröffentlichten Zusammensetzungen hergestellt werden (siehe z. B. in den Katalogen der American Culture Collection). Wird das

lipolytische Erstwaschenzym in das Nährstoffmedium sekretiert, kann das lipolytische Enzym direkt aus dem Medium gewonnen werden. Wird das lipolytische Erstwaschenzym nicht sekretiert, wird es aus Zellsäften gewonnen.

**[0259]** Das erhaltene lipolytische Erstwaschenzym kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden. Zum Beispiel kann das lipolytische Erstwaschenzym aus dem Nährstoffmedium durch herkömmliche Verfahren, einschließlich, jedoch nicht begrenzt auf, Zentrifugation, Filtration, Extraktion, Sprühtrocknen, Eindampfen oder Ausfällung gewonnen werden. Das gewonnene lipolytische Erstwaschenzym kann dann weiter durch eine Vielzahl an chromatographischen Verfahren, z. B. Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Affinitätschromatographie oder dgl. gereinigt werden.

**[0260]** Die lipolytischen Erstwaschenzyme der vorliegenden Erfindung können durch eine Vielfalt an auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, Chromatographie, z. B. Ionenaustausch, Affinität, hydrophobe, Chromatofokussieren und Größenausschluss), elektrophoretische Verfahren (z. B. präparatives isoelektrisches Fokussieren (IEF), Differenzial-Löslichkeit (z. B. Ammoniumsulfat-Ausfällung) oder Extraktion (siehe z. B. Protein Purification, J.-C. Janson und Lars Ryden, Hrsg., VCH Publishers, New York, 1989) gereinigt werden.

**[0261]** Erfindungsgemäß wird auch erwogen, am lipolytischen Erstwaschenzym eine oder mehrere geladene Aminosäuren anzubringen, die eine wirksame Reinigung des modifizierten Enzyms gewähren. Techniken zur Durchführung dessen sind dem Fachmann der Molekularbiologie bekannt.

**[0262]** Die Wirtszelle, die Züchtungsbedingungen oder Gewinnungsbedingungen sind vorzugsweise so ausgewählt, dass hauptsächlich eine teilweise Verarbeitung der Prä-, Pro- oder Präproform des Stammenzym erfolgt, woraus mindestens 5%, wie mindestens 10%, wie mindestens 15%, wie mindestens 20%, wie mindestens 25%, wie mindestens 50% oder mindestens 75% der hergestellten modifizierten Enzymmoleküle, die die gewünschte, z. B. die gesamte, Präsequenz oder einen wesentlichen Teil davon umfassen, resultieren.

#### Enzymzusammensetzung der Erfindung

**[0263]** In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine ein lipolytisches Erstwaschenzym der Erfindung umfassende Enzymzusammensetzung.

**[0264]** Wie hier definiert, handelt es sich bei einem „im Wesentlichen reinen“ Enzym um ein Enzym, das im Wesentlichen frei von anderen homologen Kontaminanten (die von derselben Quelle wie das lipolytische Erstwaschenzym stammen), wie bestimmt durch SDS-PAGE, z. B. mindestens zu etwa 20% rein, vorzugsweise mindestens zu etwa 40% rein, stärker bevorzugt zu etwa 60% rein, sogar noch stärker bevorzugt zu etwa 80% rein, besonders bevorzugt zu etwa 90% rein und insbesondere bevorzugt zu etwa 95% rein ist.

**[0265]** Umfasst das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung eine Peptidaddition, wurde gefunden, dass nicht alle der durch eine vorgegebene Wirtszelle exprimierten, lipolytischen Erstwaschenzymmoleküle an derselben Spaltungsseite verarbeitet werden. Dies hat zur Folge, dass das aus der Fermentation von solchen Wirtszellen gewonnene lipolytische Erstwaschenzymprodukt einen Teil mit der Peptidaddition in voller Länge und einen oder mehrere andere Teile mit nur einem Teil der Peptidaddition umfasst. Die Erfinder fanden, dass dies die Waschleistung nicht deutlich beeinflusst. Demzufolge kann, obwohl nicht alle der lipolytischen Enzyme der Enzymzusammensetzung der Erfindung die Peptidaddition in voller Länge bewahren, die Zusammensetzung immer noch eine Erstwaschwirkung ausüben. Tatsächlich wurde gefunden, dass es, sofern mindestens etwa 5% der Gesamtmenge des eine Peptidaddition enthaltenden lipolytischen Erstwaschenzyms der Erfindung eine intakte, wie vorstehend offenbarte Peptidaddition aufweisen, als zum Bereitstellen der gewünschten Erstwaschwirkung ausreichend befunden werden. Der übrige Teil der lipolytischen Erstwaschenzymmoleküle kann dann eine Peptidaddition aufweisen, die kürzer als eine beabsichtigte ist (z. B. als Folge davon, dass ein oder mehrere Aminosäurereste während der Verarbeitung des Enzyms durch den Wirtsorganismus abgeschnitten wurde(n)). Deshalb muss die Zusammensetzung der Erfindung nicht nur mindestens etwa 5%, vorzugsweise mindestens etwa 10%, wie mindestens etwa 25%, besser mindestens etwa 50%, insbesondere mindestens etwa 75% des lipolytischen Erstwaschenzyms mit seiner Addition in voller Länge umfassen.

**[0266]** Die Enzymzusammensetzung kann ferner ein Enzym, ausgewählt aus der Gruppe von Proteasen, Zellulasen, Peroxidasen, Cutinasen, Amylasen und/oder Lipasen, und, wenn es zum Waschen beabsichtigt ist, normalerweise in Detergenzzusammensetzungen verwendete Zusätze umfassen.

## DETERGENZOFFENBARUNG

## Oberflächenaktives System

**[0267]** Die erfindungsgemäßen Detergenzzusammensetzungen umfassen ein oberflächenaktives System, wobei die oberflächenaktiven Stoffe ausgewählt sein können aus nichtionischen und/oder anionischen und/oder kationischen und/oder ampholytischen und/oder zwitterionischen und/oder semipolaren oberflächenaktiven Stoffen.

**[0268]** Die oberflächenaktiven Stoffe liegen typischerweise mit einem Gehalt von 0,1 bis 60 Gew.-% vor.

**[0269]** Der oberflächenaktive Stoff ist vorzugsweise so formuliert, dass es mit in der Zusammensetzung vorliegenden Enzymkomponenten kompatibel ist. In Flüssig- oder Gel-Zusammensetzungen ist der oberflächenaktive Stoff besonders bevorzugt so formuliert, dass es die Stabilität eines beliebigen Enzyms in diesen Zusammensetzungen unterstützt oder zumindest nicht herabsetzt.

**[0270]** Bei bevorzugten, erfindungsgemäß als oberflächenaktiver Stoff zu verwendenden oberflächenaktiven Systemen handelt es sich um ein oder mehrere der hier beschriebenen nichtionischen und/oder anionischen oberflächenaktiven Stoff(e).

**[0271]** Nichtionische oberflächenaktive Detergenzen bestehen gewöhnlich aus einem wasserlöslichen Polyalkoxylen oder einer Mono- oder Dialkanolamidgruppe in chemischer Kombination mit einer organischen hydrophoben Gruppe, die z. B. von Alkylphenolen, in welchen die Alkylgruppe etwa 6 bis etwa 12 Kohlenstoffatome enthält, von Alkylphenolen, in welchen jede Alkylgruppe 6 bis 12 Kohlenstoffatome enthält, primären, sekundären oder tertiären aliphatischen Alkoholen (oder Derivaten mit endständigen Alkylgruppen davon), vorzugsweise mit 8 bis 12 Kohlenstoffatomen, Monocarbonsäuren mit 10 bis 24 Kohlenstoffatomen in der Alkylgruppe und Polyoxypropylenen abgeleitet sind. Ebenso üblich sind Fettsäuremono- und -dialkanolamide, in welchen die Alkylgruppe des Fettsäurerests 10 bis etwa 20 Kohlenstoffatome und die Alkylolylgruppe 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält. Gegebenenfalls kann in jedem beliebigen der Mono- und Dialkanolamidderivat eine Polyoxyalkyleneinheit vorliegen, die die letzteren Gruppen und den hydrophoben Teil des Moleküls verbindet. In allen Polyoxyalkylen enthaltenden oberflächenaktiven Stoffen besteht die Polyoxyalkyleneinheit aus 2 bis 20 Ethylenoxidgruppen oder Ethylenoxid- und Propylenoxidgruppen.

**[0272]** Polyoxyethylen-, Polypropylen- und Polybutylenoxidkondensate von Alkylphenolen sind zur Verwendung als nichtionischer oberflächenaktiver Stoff der oberflächenaktiven Systeme der vorliegenden Erfindung geeignet, wobei die Polyethylenoxidkondensate bevorzugt sind. Diese Verbindungen schließen die Kondensationsprodukte von Alkylphenolen mit einer Alkylgruppe, enthaltend etwa 6 bis 14 Kohlenstoffatome, vorzugsweise etwa 8 bis 14 Kohlenstoffatome, in entweder geradkettiger oder verzweigter Konfiguration mit dem Alkylenoxid ein. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt das Ethylenoxid in einer Menge vor, die gleich etwa 2 bis etwa 25 Mol, vorzugsweise etwa 3 bis etwa 15 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkylphenol ist. Im Handel erhältliche nichtionische oberflächenaktive Stoffe dieses Typs schließen Igepal<sup>TM</sup> CO-630, vertrieben von GAF Corporation, und Triton<sup>TM</sup> X-45, X-114, X-100 und X-102, alle vertrieben von Rohm & Haas Company, ein. Diese oberflächenaktiven Stoffe werden üblicherweise als Alkylphenolalkoxylate (z. B. Alkylphenoethoxylate) bezeichnet.

**[0273]** Kondensationsprodukte von primären und sekundären aliphatischen Alkoholen mit etwa 1 bis etwa 25 Mol Ethylenoxid sind zur Verwendung als nichtionischer oberflächenaktiver Stoff der nichtionischen oberflächenaktiven Systeme der vorliegenden Erfindung geeignet. Die Alkylkette des aliphatischen Alkohols kann entweder geradkettig oder verzweigt, primär oder sekundär sein und enthält im Allgemeinen etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatome. Bevorzugt sind die Kondensationsprodukte von Alkoholen mit einer Alkylgruppe, die etwa 8 bis 20 Kohlenstoffatome, stärker bevorzugt etwa 10 bis 18 Kohlenstoffatome, mit etwa 2 bis etwa 10 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol enthält. Etwa 2 bis etwa 7 Mol Ethylenoxid und besonders bevorzugt 2 bis 5 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol liegen in den Kondensationsprodukten vor. Beispiele für im Handel erhältliche nichtionische oberflächenaktive Stoffe dieses Typs schließen Tergitol<sup>TM</sup> 15-S-9 (das Kondensationsprodukt eines C<sub>11</sub>-C<sub>15</sub>-linearen Alkohols mit 9 Mol Ethylenoxid), Tergitol<sup>TM</sup> 24-L-6 NMW (das Kondensationsprodukt eines primären C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-Alkohols mit 6 Mol Ethylenoxid mit einer engen Molekulargewichtsverteilung), beide vertrieben von Union Carbide Corporation; Neodol<sup>TM</sup> 45-9 (das Kondensationsprodukt eines linearen C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Alkohols mit 9 Mol Ethylenoxid), Neodol<sup>TM</sup> 23-3 (das Kondensationsprodukt eines linearen C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>-Alkohols mit 3,0 Mol Ethylenoxid), Neodol<sup>TM</sup> 45-7 (das Kondensationsprodukt eines linearen C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Alkohols mit 7 Mol Ethylenoxid), Neodol<sup>TM</sup> 45-5 (das Kondensationsprodukt eines linearen C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Alkohols mit 5 Mol Ethylenoxid), vertrie-

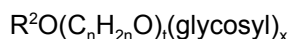
ben von Shell Chemical Company; Kyro™ EOB (das Kondensationsprodukt eines C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub>-Alkohols mit 9 Mol Ethylenoxid), vertrieben von The Procter & Gamble Company; und Genapol LA 050 (das Kondensationsprodukt eines C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>-Alkohols mit 5 Mol Ethylenoxid), vertrieben von Hoechst, ein. Ein bevorzugter HLB-Bereich dieser Produkte beträgt 8 bis 11 und besonders bevorzugt 8 bis 10.

**[0274]** Die Detergenzzusammensetzung der Erfindung kann ein nichtionisches Material umfassen, bei welchem es sich um alkoxylierte, aliphatische Alkohole, enthaltend mindestens 25 Alkylenoxidgruppen, vorzugsweise mindestens 50 Alkylenoxidgruppen und stärker bevorzugt mindestens 80 Alkylenoxidgruppen, handelt.

**[0275]** Ebenso nützlich als der nichtionische oberflächenaktive Stoff der oberflächenaktiven Systeme der vorliegenden Erfindung sind in US 4,565,647 offenbarte Alkylpolysaccharide mit einer hydrophoben Gruppe, enthaltend etwa 6 bis 30 Kohlenstoffatome, vorzugsweise etwa 10 bis etwa 16 Kohlenstoffatome, und ein Polysaccharid, z. B. ein Polyglycosid, bei welchem die hydrophile Gruppe etwa 1,3 bis etwa 10, vorzugsweise etwa 1,3 bis etwa 3, besonders bevorzugt etwa 1,3 bis etwa 2,7 Saccharideinheiten enthält. Jedes beliebige reduzierende Saccharid, das 5 oder 6 Kohlenstoffatome enthält, kann verwendet werden, z. B. können Glucose-, Galactose- und Galactosyleinheiten für die Glucosyleinheiten substituiert werden (gegebenenfalls ist die hydrophobe Gruppe an die 2-, 3-, 4- usw. Positionen gebunden, wodurch eine Glucose oder Galactose im Gegensatz zu einem Glucosid oder einem Galactosid erhalten wird). Die Saccharidzwischenbindungen können z. B. zwischen einer Position der zusätzlichen Saccharideinheiten und den 2-, 3-, 4- und/oder 6-Positionen der vorangehenden Saccharideinheiten vorliegen.

**[0276]** Bei einem anderen nützlichen nichtionischen oberflächenaktiven Stoff handelt es sich um ein wie in WO 95/10524 beschriebenes Glycosid einer Uronsäure, eines Uronsäuresalzes oder eines Uronsäurelactons oder einer Polyuronsäure mit einer geradkettigen oder verzweigten gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Kette mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls einen aromatischen, cycloaliphatischen, gemischten aromatischen-aliphatischen oder Polyalkyloxyalkylrest enthält.

**[0277]** Die bevorzugten Alkylpolyglycoside weisen die Formel



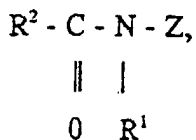
auf, wobei R<sup>2</sup> ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Alkyl, Alkylphenyl, Hydroxyalkyl, Hydroxyalkylphenyl und Gemischen davon, in welchen die Alkylgruppen etwa 10 bis etwa 18, vorzugsweise etwa 12 bis etwa 14 Kohlenstoffatome enthalten; n 2 oder 3, vorzugsweise 2 ist; t 0 bis etwa 10, vorzugsweise 0 ist; und x etwa 1,3 bis etwa 10, vorzugsweise 1,3 bis etwa 3, besonders bevorzugt etwa 1,3 bis etwa 2,7 ist. Das Glycosyl ist vorzugsweise von Glucose abgeleitet. Zur Herstellung dieser Verbindungen wird zuerst der Alkohol oder Alkylpolyethoxyalkohol gebildet und dieser dann mit Glucose oder einer Glucosequelle unter Bildung des Glucosids (Bindung an der 1-Position) umgesetzt. Die zusätzlichen Glycosyleinheiten können dann zwischen ihrer 1-Position und den vorangehenden Glycosyleinheiten an die 2-, 3-, 4- und/oder 6-Position, vorzugsweise überwiegend an die 2-Position gebunden werden.

**[0278]** Die Kondensationsprodukte von Ethylenoxid mit einer hydrophoben Base, die durch die Kondensation von Propylenoxid mit Propylenglycol gebildet ist, sind ebenso zur Verwendung als die zusätzlichen nichtionischen oberflächenaktiven Systeme der vorliegenden Erfindung geeignet. Der hydrophobe Teil dieser Verbindungen weist vorzugsweise ein Molekulargewicht von etwa 1.500 bis etwa 1.800 auf und zeigt Wasserunlöslichkeit. Die Addition von Polyoxyethyleinheiten an diesen hydrophoben Teil neigt zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit des Moleküls als Ganzes, und der flüssige Charakter dieses Produkts wird bis zu dem Punkt beibehalten, an welchem der Polyoxyethylengehalt etwa 50% des Gesamtgewichts des Kondensationsprodukts beträgt, was einer Kondensation mit bis zu etwa 40 Mol Ethylenoxid entspricht. Beispiele für Verbindungen dieses Typs schließen bestimmte im Handel erhältliche oberflächenaktive Stoffe des Typs Pluronic™, vertrieben von BASF, ein.

**[0279]** Ebenso zur Verwendung als der nichtionische oberflächenaktive Stoff des nichtionischen oberflächenaktiven Systems der vorliegenden Erfindung geeignet sind die Kondensationsprodukte von Ethylenoxid mit dem aus der Umsetzung von Propylenoxid und Ethylendiamin erhaltenen Produkt. Die hydrophobe Einheit dieser Produkte besteht aus dem Reaktionsprodukt von Ethylendiamin und überschüssigem Propylenoxid und weist im Allgemeinen ein Molekulargewicht von etwa 2.500 bis etwa 3.000 auf. Diese hydrophobe Einheit wird mit Ethylenoxid zu einem Grad kondensiert, bei welchem das Kondensationsprodukt etwa 40 bis etwa 80 Gew.-% Polyoxyethylen enthält und ein Molekulargewicht von etwa 5.000 bis etwa 11.000 aufweist. Beispiele für diesen Typ von nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen schließen bestimmte der im Handel erhältlichen

Verbindungen des Typs Tetronic™, vertrieben von BASF, ein.

**[0280]** Bevorzugt zur Verwendung als der nichtionische oberflächenaktive Stoff der nichtionischen oberflächenaktiven Systeme der vorliegenden Erfindung sind Polyethylenoxidkondensate von Acrylphenolen, Kondensationsprodukte von primären und sekundären aliphatischen Alkoholen mit etwa 1 bis etwa 25 Mol Ethylenoxid, Alkylpolysaccharide und Gemische davon. Besonders bevorzugt sind C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>-Alkylphenoethoxylate mit 3 bis 15 Ethoxygruppen und C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoholethoxylate (vorzugsweise durchschnittlich C<sub>10</sub>) mit 2 bis 10 Ethoxygruppen und Gemische davon. Bei äußerst bevorzugten nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen handelt es sich um oberflächenaktive Polyhydroxyfettsäureamide der Formel



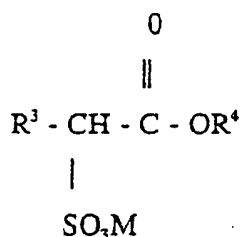
wobei R<sup>1</sup> H oder R<sup>1</sup> C<sub>1-4</sub> Hydrocarbyl, 2-Hydroxyethyl, 2-Hydroxypropyl oder ein Gemisch davon ist, R<sup>2</sup> C<sub>5-31</sub>-Hydrocarbyl ist und Z ein Polyhydroxyhydrocarbyl mit einer linearen Hydrocarbylkette mit mindestens 3 direkt an die Kette gebundenen Hydroxylgruppen oder ein alkoxyliertes Derivat davon ist. Vorzugsweise ist R<sup>1</sup> Methyl, R<sup>2</sup> eine geradkettige C<sub>11-15</sub>-Alkyl- oder C<sub>16-18</sub>-Alkyl- oder -Alkenylkette wie Kokosalkyl oder Gemische davon, und ist Z abgeleitet von einem reduzierenden Zucker wie Glucose, Fructose, Maltose, Lactose in einer reduktiven Aminierungsreaktion.

**[0281]** Ein nichtionisches oberflächenaktives System, das ein alkoxylierter, nichtionischer oberflächenaktiver Stoff mit einem mittleren Alkoxylierungsgrad von mindestens 6 und ein Aldobionamid der Struktur ANR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> umfasst, wobei A eine Zuckereinheit ist, die eine Aldobionsäure ist, außer dass sie die sich gewöhnlich von der Carbonylgruppe an der Aldonsäure erstreckende OH-Gruppe nicht enthält. NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> ist dort gebunden, wo die Hydroxylgruppe an der Aldobionsäure normalerweise zu finden wäre. R<sub>1</sub>R<sub>2</sub> kann gleich oder verschieden sein, ist ein Wasserstoffatom, ein aliphatischer Kohlenwasserstoffrest, ein aromatischer Rest, ein cycloaliphatischer Rest oder ein Aminosäureester oder ein Etheramin. R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> können wie in WO 95/2770 beschrieben beides Wasserstoffatome sein.

**[0282]** Andere so genannte nichtionische Detergenzverbindungen schließen langkettige tertiäre Aminoxide, langkettige tertiäre Phosphinoxide und Dialkylsulphoxide ein.

**[0283]** Äußerst bevorzugte anionische oberflächenaktive Stoffe schließen oberflächenaktive alkylalkoxylierte Sulfate ein, bei welchen es sich um wasserlösliche Salze oder Säuren der Formel RO(A)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub>M, wobei R eine unsubstituierte C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>-Alkyl- oder -Hydroxyalkylgruppe mit einer C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylkomponente, vorzugsweise eine C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>-Alkyl- oder -Hydroxyalkyl-, stärker ein C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl oder -Hydroxyalkyl ist, A eine Ethoxy- oder Propoxyeinheit ist, m größer als Null, typischerweise zwischen etwa 0,5 und etwa 6, stärker bevorzugt zwischen etwa 0,5 und etwa 3 liegt, und M H oder ein Kation ist, bei welchem es sich z. B. um ein Metallkation (z. B. Natrium, Kalium, Lithium, Calcium, Magnesium usw.), Ammonium- oder substituiertes Ammoniumkation handeln kann, handelt. Alkylethoxylierte Sulfate sowie alkylpropoxylierte Sulfate sind hier zu erwägen. Spezifische Beispiele für substituierte Ammoniumkationen schließen Methyl-, Dimethyl-, Trimethylammoniumkationen und quartäre Ammoniumkationen wie Tetramethylammonium- und Dimethylpiperdiniumkationen und diejenigen, die von Alkylaminen wie Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Gemischen davon und dgl. abgeleitet sind, ein. Bei beispielhaften oberflächenaktiven Stoffen handelt es sich um C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylpolyethoxylat(1,0)sulfat (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E(1,0)M), C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylpolyethoxyalkylat(2,25)sulfat (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>(2,25)M) und C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylpolyethoxylat(3,0)sulfat (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E(3,0)M) und C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylpolyethoxylat(4,0)sulfat (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>E(4,0)M), wobei M günstigerweise ausgewählt ist aus Natrium und Kalium. Bei zu verwendenden geeigneten anionischen oberflächenaktiven Stoffen handelt es sich um oberflächenaktive Alkylestersulfonate, die lineare Ester von C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-Carbonsäuren (d. h. Fettsäuren) einschließen, die mit gasförmigem SO<sub>3</sub> gemäß dem „The Journal of the American Oil Chemists Society“, 52 (1975), S. 323–329, sulfoniert sind. Geeignete Ausgangsmaterialien schließen wie von Talk, Palmöl usw. abgeleitete, natürliche Fettsubstanzen ein.

**[0284]** Das bevorzugte oberflächenaktive Alkylestersulfonat, insbesondere für Waschanwendungen, umfasst ein oberflächenaktives Alkylestersulfonat der Strukturformel:



wobei  $R^3$  ein  $C_8$ - $C_{20}$ -Hydrocarbyl, vorzugsweise ein Alkyl oder eine Kombination davon ist,  $R^4$  ein  $C_1$ - $C_6$ -Hydrocarbyl, vorzugsweise ein Alkyl oder eine Kombination davon ist, und M ein ein wasserlösliches Salz mit dem Alkylestersulfonat bildendes Kation ist. Geeignete salzbildende Kationen schließen Metalle wie Natrium, Kalium und Lithium und substituierte oder unsubstituierte Ammoniumkationen wie Monoethanolamin, Diethanolamin und Triethanolamin ein. Vorzugsweise ist  $R^3$  ein  $C_{10}$ - $C_{16}$ -Alkyl und ist  $R^4$  Methyl, Ethyl oder Isopropyl. Besonders bevorzugt sind Methylestersulfonate, in welchen  $R^3$  ein  $C_{10}$ - $C_{16}$ -Alkyl ist.

**[0285]** Andere geeignete anionische oberflächenaktive Stoffe schließen die oberflächenaktiven Alkylsulfate ein, bei welchen es sich um wasserlösliche Salze oder Säuren der Formel  $ROSO_3M$  handelt, wobei R vorzugsweise ein  $C_{10}$ - $C_{24}$ -Hydrocarbyl, vorzugsweise ein Alkyl oder -Hydroxyalkyl mit einer  $C_{10}$ - $C_{20}$ -Alkylkomponente, stärker bevorzugt ein  $C_{12}$ - $C_{18}$ -Alkyl oder -Hydroxyalkyl ist und M H oder ein Kation ist, z. B. ein Alkalimetallkation (z. B. Natrium, Kalium, Lithium) oder Ammonium oder substituiertes Ammonium (z. B. Methyl-, Dimethyl- und Trimethylammoniumkationen und quartäre Ammoniumkationen wie Tetramethylammonium- und Dimethylpiperdiniumkationen und quartäre Ammoniumkationen, abgeleitet von Alkylaminen wie Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin und Gemischen davon und dgl.). Typischerweise sind  $C_{12}$ - $C_{16}$ -Alkylketten für niedrigere Waschttemperaturen (z. B. unter etwa  $50^\circ\text{C}$ ) und  $C_{16}$ - $C_{18}$ -Alkylketten für höhere Waschttemperaturen (z. B. über  $50^\circ\text{C}$ ) bevorzugt.

**[0286]** Andere anionische oberflächenaktive Stoffe, die für Detergenzzwecke nützlich sind, können ebenso in den Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen sein. Diese können Salze (einschließlich z. B. Natrium-, Kalium-, Ammonium- und substituierte Ammoniumsalze wie Mono-, Di- und Triethanolaminsalze von Seife, primäre oder sekundäre  $C_8$ - $C_{24}$ -Alkansulfonate,  $C_8$ - $C_{24}$ -Olefinsulfonate, sulfonierte Polycarbonsäuren, hergestellt durch Sulfonisierung des pyrolysierten Produkts von Erdalkalimetallcitrat, z. B. wie beschrieben in GB 1,082,179,  $C_8$ - $C_{24}$ -Alkylpolyglycol ethersulfate (enthaltend bis zu 10 Mol Ethylenoxid), Alkylglycerinsulfonate, Fettacylglycerinsulfonate, Fettoleylglycerinsulfonate, Alkylphenoylethylenoxidethersulfate, Paraffinsulfonate, Alkylphosphate, Isethionate wie Acylisethionate, Isethionatester von Alkoxycarbonsäuren (wie beschrieben in WO 95/14661), N-Acyltaurate, Alkylsuccinamate und Sulfosuccinate, Monoester von Sulfosuccinaten (insbesondere gesättigte und ungesättigte  $C_{12}$ - $C_{18}$ -Monoester) und Diester von Sulfosuccinaten (insbesondere gesättigte und ungesättigte  $C_6$ - $C_{12}$ -Diester), Acylsarcosinate, Oleylsarcosinate, Sulfate von Alkylpolysacchariden wie die Sulfate von Alkylpolyglucosid (wobei die nichtionischen nichtsulfatierten Verbindungen nachstehend beschrieben sind), verzweigte primäre Alkylsulfate und Alkylpolyethoxycarboxylate wie diejenigen der Formel  $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO-M^+$ , wobei R ein  $C_8$ - $C_{22}$ -Alkyl ist, k eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und M ein lösliches salzbildendes Kation ist, einschließen. Harzsäuren und hydrierte Harzsäuren wie Rosin, hydriertes Rosin und Harzsäuren und hydrierte Harzsäuren, die in Tallöl vorliegen oder von ihm abgeleitet sind, sind ebenso geeignet. Alkylbenzolsulfonat, insbesondere lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS), wobei die Alkylgruppe vorzugsweise 10 bis 18 Kohlenstoffatome enthält, ist äußerst bevorzugt.

**[0287]** Weitere Beispiele sind in „Surface Active Agents and Detergents“ (Bd. I und II von Schwartz, Perry und Berch) beschrieben. Eine Vielfalt solcher oberflächenaktiven Stoffe ist auch in US 3,929,678 (Spalte 23, Zeile 58 bis Spalte 29, Zeile 23) offenbart.

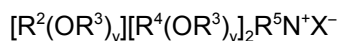
**[0288]** Falls sie hier eingeschlossen sind, umfassen die Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung typischerweise etwa 1 bis etwa 40%, vorzugsweise etwa 3 bis etwa 20 Gew.-% solcher anionischen oberflächenaktiven Stoffe.

**[0289]** Die Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch kationische, ampholytische, zwitterionische und semipolare oberflächenaktive Stoffe sowie die nichtionischen und/oder anionischen oberflächenaktiven Stoffe, die von denjenigen, die hier schon beschrieben sind, verschieden sind, enthalten.

**[0290]** Bei kationischen oberflächenaktiven Detergenzverbindungen, die zur Verwendung in den Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, handelt es sich um diejenigen



mit einer langkettigen Hydrocarbylgruppe. Beispiele für solche kationischen oberflächenaktiven Stoffe schließen die oberflächenaktiven Ammoniumverbindungen wie Alkyltrimethylammoniumhalogenide und diejenigen oberflächenaktiven Stoffe der Formel



ein, wobei  $R^2$  eine Alkyl- oder Alkylbenzylgruppe mit etwa 8 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette ist, jedes  $R^3$  ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH(CH_3)-$ ,  $-CH_2CH(CH_2OH)-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-$ , und Gemischen davon; jedes  $R^4$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_4$ -Hydroxyalkyl, Benzylringstrukturen, die durch Verbinden der zwei  $R^4$ -Gruppen gebildet sind,  $-CH_2CHOHCHOHCOR^6CHOHCH_2OH$ , wobei  $R^6$  eine beliebige Hexose oder ein beliebiges Hexosepolymer mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 1000 ist, und Wasserstoff, wenn  $y$  nicht 0 ist,  $R^5$  derselbe wie  $R^4$  oder eine Alkylkette ist, wobei die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen oder  $R^2$  plus  $R^5$  nicht mehr als etwa 18 beträgt, jedes  $y$  0 bis etwa 10 beträgt und die Summe der  $y$ -Werte 0 bis etwa 15 bildet, und  $X$  ein beliebiges kompatibles Anion ist.

**[0291]** Bei äußerst bevorzugten kationischen oberflächenaktiven Stoffen handelt es sich um die wasserlöslichen quartären Ammoniumverbindungen, die in der vorliegenden Zusammensetzung nützlich sind, mit der Formel:

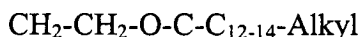


wobei  $R_1$   $C_8$ - $C_{16}$ -Alkyl ist, jeder von  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  unabhängig  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_4$ -Hydroxyalkyl, Benzyl und  $-(C_2H_{40})_xH$  ist, wobei  $x$  einen Wert von 2 bis 5 aufweist, und  $X$  ein Anion ist. Nicht mehr als einer von  $R_2$ ,  $R_3$  oder  $R_4$  sollte Benzyl sein.

**[0292]** Die bevorzugte Alkylkettenlänge für  $R_1$  ist  $C_{12}$ - $C_{15}$ , insbesondere, wenn die Alkylgruppe ein Gemisch aus Kettenlängen ist, die von Kokos- oder Palmkernelfett oder synthetisch durch Olefinaufbau oder OXO-Alkoholsynthese abgeleitet ist.

**[0293]** Bei bevorzugten Gruppen für  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  handelt es sich um Methyl- und Hydroxyethylgruppen, und das Anion  $X$  kann ausgewählt sein aus Halogenid-, Methosulfat-, Acetat- und Phosphationen. Beispiele für geeignete quartäre Ammoniumverbindungen der Formeln (i) zur Verwendung hier sind:

Kokotrimethylammoniumchlorid oder -bromid;  
Kokosdimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;  
Decyltriethylammoniumchlorid;  
Decyldimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;  
 $C_{12-15}$ -Dimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;  
Kokosdimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;  
Myristyltrimethylammoniummethylsulfat;  
Lauryldimethylbenzylammoniumchlorid oder -bromid;  
Lauryldimethyl(ethenoxy)<sub>4</sub>-Ammoniumchlorid oder -bromid;  
Cholinester (Verbindungen der Formel (i), wobei  $R_1$



ist und  $R_2R_3R_4$  Methyl sind).

Dialkylimidazoline [Verbindungen von Formel (i)].

**[0294]** Andere hier nützliche oberflächenaktive Stoffe sind auch in US 4,228,044 und in EP 000 224 beschrieben.

**[0295]** Falls sie hier eingeschlossen sind, umfassen die Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung typischerweise 0,2 bis etwa 25 Gew.-%, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 8 Gew.-% solcher kationischen oberflächenaktiven Stoffe.

**[0296]** Ampholytische oberflächenaktive Stoffe sind hier ebenso zur Verwendung in den Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung geeignet. Diese oberflächenaktiven Stoffe können all-

gemein als aliphatische Derivate von sekundären oder tertiären Aminen oder aliphatische Derivate von heterocyclischen sekundären und tertiären Aminen beschrieben werden, in welchen der aliphatische Rest geradkettig oder verzweigt sein kann. Einer der aliphatischen Substituenten enthält mindestens etwa 8 Kohlenstoffatome, typischerweise etwa 8 bis 18 Kohlenstoffatome, und mindestens einer enthält eine anionische wasserlöslich stellende Gruppe, z. B. Carboxy, Sulfonat, Sulfat. Siehe US 3,929,678 (Spalte 19, Zeile 38–35) für Beispiele für ampholytische oberflächenaktive Stoffe.

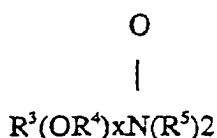
**[0297]** Falls sie hier eingeschlossen sind, umfassen die Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung typischerweise 0,2 bis etwa 15 Gew.-%, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 10 Gew.-% solcher ampholytischen oberflächenaktiven Stoffe.

**[0298]** Zwitterionische oberflächenaktive Stoffe sind ebenso zur Verwendung in Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen geeignet. Diese oberflächenaktiven Stoffe können allgemein als Derivate von sekundären und tertiären Aminen, Derivate von heterocyclischen sekundären und tertiären Aminen oder Derivate von quartären Ammonium-, quartären Phosphonium- oder tertiären Sulfoniumverbindungen beschrieben werden. Siehe US 3,929,678 (Spalte 19, Zeile 38 bis Spalte 22, Zeile 48) für Beispiele für zwitterionische oberflächenaktive Stoffe.

**[0299]** Falls sie eingeschlossen sind, umfassen die Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung typischerweise 0,2 bis etwa 15 Gew.-%, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 10 Gew.-% solcher zwitterionischen oberflächenaktiven Stoffe.

**[0300]** Bei halbpolaren nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen handelt es sich um eine spezielle Kategorie von nichtionischen oberflächenaktiven Stoffen, die wasserlösliche Aminoxide einschließen, enthaltend eine Alkyleinheit mit etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen und 2 Einheiten, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylgruppen und Hydroxyalkylgruppen; wasserlösliche Phosphinoxide, enthaltend eine Alkyleinheit mit etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen und 2 Einheiten, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome enthaltenden Alkylgruppen und Hydroxyalkylgruppen; und wasserlösliche Sulfoxide, enthaltend eine Alkyleinheit mit etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen und eine Einheit, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkyl- und Hydroxyalkyleinheiten mit etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatomen.

**[0301]** Halbpolare nichtionische oberflächenaktive Detergenzverbindungen schließen die oberflächenaktiven Aminoxide der Formel



ein, wobei  $\text{R}^3$  eine etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatome enthaltende Alkyl-, Hydroxyalkyl- oder Alkylphenylgruppe oder Gemische davon ist,  $\text{R}^4$  eine etwa 2 bis etwa 3 Kohlenstoffatome enthaltende Alkyl- oder Hydroxyalkylgruppe oder Gemische davon ist;  $x$  0 bis etwa 3 ist, jeder  $\text{R}^5$  eine etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome enthaltende Alkyl- oder Hydroxyalkylgruppe oder eine etwa 1 bis etwa 3 Ethylenoxidgruppen enthaltende Polyethylenoxidgruppe ist. Die  $\text{R}^5$ -Gruppen können z. B. durch ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom unter Bildung einer Ringstruktur aneinander gebunden sein.

**[0302]** Diese oberflächenaktiven Aminoxide schließen insbesondere  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{18}$ -Alkyldimethylaminoxide und  $\text{C}_8$ - $\text{C}_{12}$ -Alkoxyethylidihydroxyethylaminoxide ein.

**[0303]** Falls sie hier eingeschlossen sind, umfassen die Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung typischerweise 0,2 bis etwa 15 Gew.-%, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 10 Gew.-% solcher semipolaren nichtionischen oberflächenaktiven Stoffe.

#### Gerüststoffsystm

**[0304]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können ferner ein Gerüststoffsystm umfassen. Jedes beliebiges Gerüststoffsystm, einschließlich Aluminosilicatmaterialien, Silicate, Polycarboxylate und Fettsäuren, Materialien wie Ethylendiamintetraacetat, Metallionmaskierungsmittel wie Aminopolymersphosphonate, insbesondere Ethylendiamintetraethylphosphonsäure und Diethylentriaminpentamethylenphosphonsäure ist zur Verwendung hier geeignet. Phosphatgerüststoffe, z. B. Pyrophosphate, Orthophosphate oder Polyphos-

phate können ebenso hier verwendet werden.

**[0305]** Bei geeigneten Gerüststoffen kann es sich um ein anorganisches Ionenaustauschermaterial, üblicherweise ein anorganisches hydriertes Aluminosilicatmaterial, insbesondere einen hydrierten synthetischen Zeolith wie einen hydrierten Zeolith A, X, B, HS oder MAP handeln. Bei einem anderen geeigneten anorganischen Gerüststoffmaterial handelt es sich um geschichtetes Silicat, z. B. SKS-6 (Hoechst). Bei SKS-6 handelt es sich um ein kristallines geschichtetes Silicat, das aus Natriumsilicat ( $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ ) besteht.

**[0306]** Geeignete eine Carboxygruppe enthaltende Polycarboxylate schließen Milchsäure, Glycolsäure und wie in BE 831,368, BE 821,369 und BE 821,370 offenbarte Etherderivate davon, ein. Zwei Carboxygruppen enthaltende Polycarboxylate schließen die wasserlöslichen Salze von Bernsteinsäure, Malonsäure, (Ethylen-dioxy)diessigsäure, Maleinsäure, Diglycolsäure, Weinsäure, Tartronsäure und Fumarsäure sowie die in DE 24 46 686, DE 24 46 487, US 3,935,257 beschriebenen Ethercarboxylate und die in BE 840,623 beschriebenen Sulfinylcarboxylate ein. Drei Carboxygruppen enthaltende Polycarboxylate schließen insbesondere wasserlösliche Citrate, Aconitrate und Citraconate sowie Succinatderivate wie die in GB 1,379,241 beschriebenen Carboxymethyloxysuccinate, die in der NL-Anmeldung 7205873 beschriebenen Lactoxysuccinate und die Oxypolycarboxylatmaterialien wie die in GB 1,387,447 beschriebenen 2-Oxa-1,1,3-propantricarboxylate ein.

**[0307]** Vier Carboxygruppen enthaltende Polycarboxylate schließen in GB 1,261,829 offenbarte Oxydisuccinate, 1,1,2,2-Ethantetracarboxylate, 1,1,3,3-Propantetracarboxylate, enthaltend Sulfosubstituenten, einschließlich die in GB 1,398,421 und GB 1,398,422 und in US 3,936,448 offenbarten Sulfosuccinatderivate und die in GB 1,082,179 beschriebenen sulfonierten pyrolysierten Citrate ein, während die Phosphonsubstituenten enthaltenden Polycarboxylate in GB 1,439,000 beschrieben sind.

**[0308]** Alicyclische und heterocyclische Polycarboxylate schließen cis,cis-cis-Cyclopentantetracarboxylate, Pentacarboxylatocyclopentadien, cis,cis,cis-Tetrahydrofuran-Tetracarboxylate, cis-Tetrahydrofuran-2,5-dicarboxylate, Tetrahydrofuran-2,2,5,5-tetracarboxylate, Hexan-1,2,3,4,5,6-hexacarboxylate und Carboxymethyl-derivate von mehrwertigen Alkoholen wie Sorbit, Mannit und Xylit ein. Aromatische Polycarboxylate schließen Mellitsäure, Pyromellitsäure und die in GB 1,425,343 offenbarten Phthalsäurederivate ein. Unter den vorstehenden handelt es sich bei den bevorzugten Polycarboxylaten um bis zu drei Carboxygruppen pro Molekül enthaltende Hydroxycarboxylate, insbesondere Citrat.

**[0309]** Bevorzugte Gerüststoffsysteme zur Verwendung in den vorliegenden Zusammensetzungen schließen ein Gemisch aus einem wasserlöslichen Aluminosilicatgerüststoff wie Zeolith A oder aus einem beschichteten Silicat (SKS-6) und einen wasserlöslichen Carboxylatchelatbildner wie Zitronensäure ein.

**[0310]** Bei einem geeigneten Chelatbildner zum Einschluss in die erfindungsgemäßen Detergenzzusammensetzungen handelt es sich um Ethylendiamin-N,N'-dibernsteinsäure (EDDS) oder die Alkalimetall-, Erdalkalimetall-, Ammonium- oder substituierten Ammoniumsalze davon oder Gemische davon. Bei bevorzugten EDDS-Verbindungen handelt es sich um die freie Säureform und das Natrium- oder Magnesiumsalz davon. Beispiele für solche bevorzugten Natriumsalze von EDDS schließen  $\text{Na}_2\text{EDDS}$  und  $\text{Na}_4\text{EDDS}$  ein. Beispiele für solche bevorzugten Magnesiumsalze von EDDS schließen  $\text{MgEDDS}$  und  $\text{Mg}_2\text{EDDS}$  ein. Die Magnesiumsalze sind für den Einschluss in die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen besonders bevorzugt.

**[0311]** Bevorzugte Gerüststoffsysteme schließen ein Gemisch aus einem wasserlöslichen Aluminosilicatgerüststoff wie Zeolith A und einen wasserlöslichen Carboxylatchelatbildner, wie Zitronensäure ein.

**[0312]** Andere Gerüststoffmaterialien, die einen Teil des Gerüststoffsystems zur Verwendung in Granulatzusammensetzungen bilden können, schließen anorganische Materialien wie Alkalimetallcarbonate, -bicarbonate, -silicate und organische Materialien wie die organischen Phosphonate, Aminopolyalkylenphosphonate und Aminocarboxylate ein.

**[0313]** Bei anderen geeigneten wasserlöslichen organischen Salzen handelt es sich um die homo- oder copolymeren Säuren oder deren Salze, in welchen die Polycarbonsäure durch nicht mehr als zwei Kohlenstoffatome voneinander getrennte Carboxylreste umfasst.

**[0314]** Polymere dieses Typs sind in GB-A-1,596,756 offenbart. Beispiele für solche Salze sind Polyacrylate mit einem MW von 2.000–5.000 und deren Copolymere mit Maleinsäureanhydrid, wie Copolymere mit einem Molekulargewicht von 20.000 bis 70.000, insbesondere etwa 40.000.

**[0315]** Detergenzgerüststoffsalze sind gewöhnlich in Mengen von 5 bis 80 Gew.-% in der Zusammensetzung eingeschlossen. Bevorzugte Gerüststoffgehalte für Flüssigdetergenzien betragen 5 bis 30%.

## Enzyme

**[0316]** Bevorzugte Detergenzzusammensetzungen umfassen zusätzlich zu dem Enzym der Erfindung ein anderes Enzym oder andere Enzyme, das oder die Reinigungsleistung und/oder Gewebepflege-Nutzen bereitstellt oder bereitstellen. Solche Enzyme schließen Proteasen, Lipasen, Cutinasen, Amylasen, Cellulasen, Peroxidasen, Oxidasen (z. B. Laccasen) ein.

**[0317]** Proteasen: Eine beliebige zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignete Protease kann verwendet werden. Geeignete Proteasen schließen diejenigen tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs ein. Der mikrobielle Ursprung ist bevorzugt. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Bei der Protease kann es sich um eine Serinprotease, vorzugsweise eine alkalische mikrobielle Protease oder eine Trypsin-ähnliche Protease handeln. Beispiele für alkalische Proteasen sind Subtilisine, insbesondere diejenigen, die von *Bacillus* abgeleitet sind, z. B. Subtilisin Novo, Subtilisin Carlsberg, Subtilisin 309, Subtilisin 147 und Subtilisin 168 (beschrieben in WO 89/06279). Beispiele für Trypsin-ähnliche Proteasen sind Trypsin (z. B. vom Schweine- oder Rinderursprung) und die in WO 89/06270 beschriebene *Fusarium*-Protease. Bevorzugte, im Handel erhältliche Proteaseenzyme schließen diejenigen, die unter den Marken Alcalase, Savinase, Primase, Durazym und Esperase von Novo Nordisk A/S (Dänemark) vertrieben werden, diejenigen, die unter der Marke Maxatase, Maxacal, Maxapem und Properase von Gist-Brocades/Genencor vertrieben werden, diejenigen, die unter der Marke Purafect und Purafect OXP von Genencor International vertrieben werden und diejenigen, die unter der Marke Opticlean und Optimase von Solvay Enzymes vertrieben werden, ein. Proteaseenzyme können in die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen mit einem Gehalt von 0,0001 bis 2 Gew.-% Enzymprotein der Zusammensetzung, insbesondere mit einem Gehalt von 0,001 bis 0,1 Gew.-% Enzymprotein in der Zusammensetzung eingebracht werden.

**[0318]** Lipasen: Jede beliebige zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignete Lipase kann verwendet werden. Geeignete Lipasen schließen diejenigen bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs und chemisch oder genetisch modifizierte Lipase-mutanten ein.

**[0319]** Beispiele für nützliche Lipasen schließen z. B. die wie in EP 258 068 und EP 305 216 beschriebene Lipase von *Humicola lanuginosa* und wie in WO 92/05249, WO 94/25577 und WO 95/22615 beschriebene Mutanten davon, z. B. eine wie in EP 238 023 beschriebene Lipase von *Rhizomucor miehei*, eine Lipase von *Candida* wie z. B. eine Lipase von *C. antarctica*, die in EP 214 761 beschriebene Lipase A oder B von *C. antarctica*, eine Lipase von *Pseudomonas*, wie z. B. eine in EP 218 272 beschriebene Lipase von *P. alcaligenes* und *P. pseudoalcaligenes* oder einen beliebigen Mutanten der *Pseudomonas*-Lipasen, z. B. eine wie in EP 331 376 beschriebene Lipase von *P. cepacia*, z. B. eine wie in BP 1,372,034 offenbarte Lipase von *P. stutzeri*, eine Lipase von *P. fluorescens*, eine Lipase von *Bacillus*, z. B. eine Lipase von *B. subtilis* (Dartois et al., (1993), *Biochemica et Biophysica acta* 1131, 253–260), eine Lipase von *B. starothermophilus* (JP 64/744992) und eine Lipase von *B. pumilus* (WO 91/16422) ein. Weiterhin können eine Anzahl von geklonten Lipasen, einschließlich die Lipase von *Penicillium camembertii*, beschrieben von Yamaguchi et al., (1991), *Gene* 103, 61–67), die Lipase von *Geotricum candidum* (Schimada Y. et al., (1989), *J. Biochem.*, 106, 383–388) und verschiedene Lipasen von *Rhizopus*, wie eine Lipase von *R. delemar* (Hass, M. J. et al., (1991), *Gene* 109, 117–113), eine Lipase von *R. niveus* (Kugimiya et al., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 716–719) und eine Lipase von *R. oryzae* nützlich sein.

**[0320]** Andere Typen von lipolytischen Enzymen wie Cutinasen, z. B. eine von *Pseudomonas mendocina* abgeleitete Cutinase, wie beschrieben in WO 88/09367, oder eine von *Fusarium solani* pisi abgeleitete Cutinase (z. B. beschrieben in WO 90/09446) können ebenso nützlich sein. Bei besonders geeigneten Lipasen handelt es sich um Lipasen wie M1-Lipase<sup>TM</sup>, Luma fast<sup>TM</sup> und Lipomax<sup>TM</sup> (Gist-Brocades/Genencor), Lipolase<sup>TM</sup> und Lipolase Ultra<sup>TM</sup> (Novo Nordisk A/S) und Lipase P „Amano“ (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

**[0321]** Die Lipasen werden gewöhnlich mit einem Gehalt von 0,0001 bis 2 Gew.-% Enzymprotein der Zusammensetzung, insbesondere mit einem Gehalt von 0,001 bis 0,1 Gew.-% Enzymprotein der Zusammensetzung in die Detergenzzusammensetzung eingebracht.

**[0322]** Amylasen: Jede beliebige zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignete Amylase (A und/oder B) kann verwendet werden. Geeignete Amylasen schließen diejenigen bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs ein. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Amylasen schließen z. B. von einem

speziellen Stamm von *B. licheniformis* erhaltene  $\alpha$ -Amylasen, detaillierter beschrieben in GB 1,296,839, ein. Bei im Handel erhältlichen Amylasen handelt es sich um Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ und BAN™ (erhältlich von Novo Nordisk A/S) und Rapidase™ und Maxamyl P™ (erhältlich von Gist-Brocades/Genencor).

**[0323]** Die Amylasen werden gewöhnlich mit einem Gehalt von 0,0001 bis 2 Gew.-% Enzymprotein der Detergenzzusammensetzung, insbesondere mit einem Gehalt von 0,001 bis 0,1 Gew.-% Enzymprotein der Zusammensetzung in die Detergenzzusammensetzung eingebracht.

**[0324]** Cellulasen: Jede beliebige zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignete Cellulase kann verwendet werden. Geeignete Cellulasen schließen diejenigen bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs ein. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Geeignete Cellulasen sind in US 4,435,307 offenbart, in welchem von *Humicola insolens* hergestellte Pilzcellulasen offenbart sind. Bei besonders geeigneten Cellulasen handelt es sich um die Cellulasen mit Farbpflege-Nutzen. Beispiele für solche Cellulasen sind Cellulasen, die in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung Nr. 0495257 beschrieben sind. Bei im Handel erhältlichen Cellulasen handelt es sich um Celluzyme®, hergestellt von einem Stamm von *Humicola insolens* (Novo Nordisk A/S) und KAC-500(B)® (Kao Corporation).

**[0325]** Die Cellulasen werden gewöhnlich mit einem Gehalt von 0,0001 bis 3 Gew.-% Enzymprotein der Detergenzzusammensetzung, insbesondere mit einem Gehalt von 0,001 bis 0,1 Gew.-% Enzymprotein der Zusammensetzung in die Detergenzzusammensetzung eingebracht.

**[0326]** Peroxidasen/Oxidasen: Peroxidase- und/oder Oxidaseenzyme wie Laccase können verwendet werden, wobei ersteres zum Lösungsbleichen, d. h. zum Verhindern des Übergangs der Textilfarbstoffe von gefärbten Stoffen auf andere gefärbte Stoffe beim miteinander Waschen der Stoffe in einer Waschlauge vorzugsweise zusammen mit einem wie z. B. in WO 94/12621 und WO 95/01426 beschriebenen Verstärkungsmittel in Kombination mit Wasserstoffperoxidquellen, z. B. Percarbonat, Perborat oder Persulfat verwendet wird. Geeignete Enzyme dieser Typen schließen diejenigen pflanzlichen, pilzlichen oder bakteriellen Ursprungs ein. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen.

**[0327]** Die Peroxidase- und/oder Oxidaseenzyme können mit einem Gehalt von 0,0001 bis 2 Gew.-% Enzymprotein der Detergenz-Zusammensetzung, insbesondere mit einem Gehalt von 0,001 bis 0,1 Gew.-% Enzymprotein der Zusammensetzung in die Detergenzzusammensetzung eingebracht werden.

**[0328]** Gemische aus den vorstehend erwähnten Enzymen, insbesondere ein Gemisch aus einer Protease, einer Amylase, einer Lipase und/oder einer Cellulase, sind hier umfasst.

#### Optionale Detergenzzusätze

**[0329]** Bleichmittel: Zusätzliche optionale Detergenzzusätze, die in den Detergenzzusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen werden können, schließen Peroxidbleichmittel wie Natriumperborat-Wasser (1/1), PB1, Natriumperborat-Wasser (1/4), PB4 und Natriumcarbonat-Wasserstoffperoxid (2/3), Percarbonat mit einer Teilchengröße von 400 bis 800 Mikron ein. Falls sie eingeschlossen sind, liegen Peroxidbleichmittel typischerweise mit Gehalten von etwa 1 bis etwa 25% vor.

**[0330]** Bei anderen, Bleichmitteln auf Peroxidbasis, die verwendet werden können, handelt es sich um Per-carbonsäuren und Salze davon. Geeignete Beispiele für diese Klasse von Mitteln schließen Magnesiummonoperoxidphthalathexahydrat, das Magnesiumsalz von Metachlorperbenzoesäure, 4-Nonylamino-4-oxoperoxycapronsäure und Diperoxidodecandionsäure ein. Solche Bleichmittel sind in US 4,483,781, US 740,446, EP 0 133 354 und US 4,412,934 offenbart. Äußerst bevorzugte Bleichmittel schließen auch wie in US 4,634,551 beschriebene 6-Nonylamino-6-oxoperoxycarbonsäure ein. Bei hier verwendeten Bleichmitteln kann es sich auch um andere auf dem Fachgebiet zur Verwendung in Detergenzzusammensetzungen bekannte Bleichmittel handeln.

**[0331]** Eine nichtwässrige Flüssig-Detergenzzusammensetzung kann ein Peroxysäurematerial, z. B. Peroxysäuren bestehend aus N,N'-Di(4-percarboxybenzoyl)ethylendiamin (PCBED), N,N'-Terephthaloyldi(6-aminopercarboxycarbonsäure) (TPCAP), N,N'-Di(4-percarboxybenzoyl)piperazin (PCBPIP), N,N'-Di-(4-percarboxybenzoyl)-1,4-diaminocyclohexan (PCBHEX), N,N'-Di(4-percarboxybenzoyl)-1,4-butandiamin (PCBBD), N,N'-Di(4-percarboxyanilin)terephthalat (DPCAT), N,N,N',N'-1,2,4,5-Tetracarboxybenzolyldi(6-aminopercarboxycapronsäure) (DiPAP), N,N'-Di(percarboxyadipoyl)phenylendiamin (DPAPD), N,N'-Succinoyldi(4-percarboxy)anilin (SDPCA), ein wie in WO 95/06104 beschriebenes C<sub>3</sub>-Analogon von N,N'-Terephthaloyldi(8-Aminoper-

oxyoctansäure) (TPOCT) handeln.

**[0332]** Eine andere solche Kategorie von Bleichmitteln, die verwendet werden können, umfasst die Halogenbleichmittel. Beispiele für Hypohalit freisetzende Bleichmittel schließen z. B. Trichlorisocyanursäure und die Natrium- und Kaliumdichlorisocyanurate und N-Chlor- und N-Bromalkalisulfonamide ein. Solche Materialien werden gewöhnlich mit 0,5 bis 10 Gew.-% des fertigen Produkts, vorzugsweise 1–5 Gew.-% zugesetzt.

**[0333]** Ein weiterer Typ von Bleichmitteln auf Nicht-Peroxidase-Basis von besonderem Interesse schließt lichtaktivierte Bleichmittel wie die sulfonierten Zink- und/oder Aluminiumphthalocyanine ein. Diese Materialien können auf dem Substrat während des Waschvorgangs abgelagert werden. Durch Bestrahlung mit Licht, in Gegenwart von Sauerstoff, wie durch Aufhängen der Stoffe zum Trocknen bei Tageslicht, wird der sulfoniert Phthalocyaninkomplex aktiviert und folglich das Substrat gebleicht. Bevorzugte Zink-Phthalocyanin-Komplexe und ein lichtaktiviertes Bleichverfahren sind in US 4,033,718 beschrieben. Typischerweise enthalten Detergenzzusammensetzungen etwa 0,025 bis etwa 1,25 Gew.-% sulfoniertes Zink-Phthalocyanin.

**[0334]** Die Bleichmittel auf Peroxidbasis können in Kombination mit Bleichaktivatoren wie Tetraacetylenhydriamin (TAED), Nonanoyloxybenzolsulfonat (NOBS, beschrieben in US 4,412,934), 3,5,5-Trimethylhexanolyoxybenzolsulfonat (ISONOBS, beschrieben in EP 120 591) oder Pentaacetylglucose (PAG) verwendet werden, die perhydrolysiert werden, um eine Persäure als aktive Bleichspezies zu bilden, was zu einem verbesserten Bleicheffekt führt. Zusätzlich handelt es sich bei sehr geeigneten Bleichaktivatoren um 6-Octanamidocaproyloxybenzolsulfonat, 6-Nonanamidocaproyloxybenzolsulfonat und 6-Decanamidocaproyloxybenzolsulfonat oder Gemische davon. Bei ebenso geeigneten Aktivatoren handelt es sich um acylierte Citratester, wie in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 91870207.7 offenbart.

**[0335]** Weitere nützliche Bleichmittel, die Peroxysäure und Bleichaktivatoren und Peroxygenbleichverbindungen umfassende Bleichsysteme einschließen, zur Verwendung in erfindungsgemäßen Reinigungszusammensetzungen sind in der Anmeldung USSN 08/136,626 beschrieben.

**[0336]** Wasserstoffperoxid kann auch durch Zugabe eines enzymatischen Systems (d. h. eines Enzyms und eines Substrats dafür) in der Waschlösung gebildet werden, das Wasserstoffperoxid bei Beginn oder während des Wasch- oder Spülvorgangs bilden kann. Solche enzymatischen Systeme sind in der veröffentlichten EP-Patentanmeldung Nr. 0 537 381 offenbart.

**[0337]** Die Freisetzung von Peressigsäure aus einer Peroxygenbleichquelle kann unter Verwendung einer Lipase der Erfindung aktiviert werden. Die notwendigen Komponenten für das enzymatische Hydrolysesystem ist das Persäurevorstufensubstrat: ein Diacylperoxid  $R_1\text{-CO-O-O-CO-R}$ , wobei R und  $R_1$  ein gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl, eine Arylgruppe oder eine Alkarylgruppe sein können. Die Lipase reagiert mit dem Substrat und setzt bei der Waschung Persäuren frei.

**[0338]** Quartäre Iminsalze können als Bleichkatalysatoren zusammen mit einer wie in WO 95/13352 beschriebenen Peroxygenverbindung verwendet werden.

**[0339]** Bleichsysteme auf Peroxidbasis können auch einen Mangankatalysator umfassen. Bei dem Mangankatalysator kann es sich z. B. um eine der Verbindungen handeln, die in „Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching“, Nature 369, 1994, S. 637–639, beschrieben sind.

**[0340]** Schaumunterdrücker: Bei einem anderen optionalen Zusatz handelt es sich um einen Schaumunterdrücker, der durch Silicone und Siliciumdioxid-Silicon-Gemische veranschaulicht ist. Silicone können im Allgemeinen als alkylierte Polysiloxanmaterialien dargestellt werden, wobei Siliciumdioxid normalerweise in fein verteilten Formen verwendet werden, die durch Siliciumdioxid-Aerogele und Xerogele und hydrophobe Siliciumdioxide von verschiedenen Typen veranschaulicht sind. Diese Materialien können als Teilchen eingebracht werden, in welchen der Schaumunterdrücker vorteilhafterweise freisetzbar in einen wasserlöslichen oder wasserdispersierbaren, im Wesentlichen nichtoberflächenaktiven für das Detergenz undurchlässigen Träger freigesetzt werden eingebracht ist. In einer anderen Ausführungsform kann der Schaumunterdrücker in einem flüssigen Träger gelöst oder dispergiert und durch Sprühen auf eine oder mehrere der anderen Komponenten aufgebracht werden.

**[0341]** Ein bevorzugtes Siliconschaumregulierungsmittel ist in US 3,933,672 offenbart. Bei anderen besonders nützlichen Schaumunterdrückern handelt es sich um selbstemulgierende Siliconschaumunterdrücker, die in DE 26 46 126 beschrieben sind. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist DC.544, im Handel erhältlich von

Dow Corning, bei welchem es sich um ein Siloxan-Glycol-Copolymer handelt. Bei besonders bevorzugten Schaumregulierungsmitteln handelt es sich um das Schaumunterdrückungssystem, das ein Gemisch aus Siliconölen und 2-Alkylalkanolen umfasst. Bei geeigneten 2-Alkylalkanolen handelt es sich um 2-Butyloctanol, das im Handel unter der Marke Isofol 12 R erhältlich ist.

**[0342]** Ein solches Schaumunterdrückungssystem ist in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung Nr. 0593841 beschrieben.

**[0343]** Besonders bevorzugte Siliconschaumregulierungsmittel sind in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung Nr. 0573699 beschrieben. Die Zusammensetzungen können ein Silicon-Siliciumdioxid-Gemisch in Kombination mit nichtporösem Quarzstaub wie Aerosil® umfassen.

**[0344]** Die vorstehend beschriebenen Schaumunterdrücker werden gewöhnlich mit Gehalten von 0,001 bis 2 Gew.-% der Zusammensetzung, vorzugsweise 0,01 bis 1 Gew.-% eingesetzt.

**[0345]** Andere Komponenten: Andere in Detergenzzusammensetzungen verwendete Komponenten wie Schmutz-Suspensionsmittel, Schmutzfreisetzungsmittel, optische Aufheller, Scheuermittel, Bakterizide, Beschlagshemmer, Färbemittel und/oder eingekapselte oder nicht-eingekapselte Parfums können eingesetzt werden.

**[0346]** Bei besonders geeigneten Einkapselungsmaterialien handelt es sich um wasserlösliche Kapseln, die aus einer Matrix aus wie in GB 1,464,616 beschriebenen Polysaccharid- und Polyhydroxyverbindungen bestehen.

**[0347]** Andere geeignete wasserlösliche Einkapselungsmaterialien umfassen wie in US 3,455,838 beschriebene Dextrine, die von ungelatinisierten Stärkersäureestern von substituierten Dicarbonsäuren abgeleitet sind. Diese Säureesterdextrine sind vorzugsweise aus solchen Stärken wie wachsartigem Mais, wachsartiger Hirse, Sago, Tapioka und Kartoffel hergestellt. Geeignete Beispiele für die Einkapselungsmaterialien schließen das von National Starch hergestellte N-Lok ein. Das N-Lok-Einkapselungsmaterial besteht aus einer modifizierten Maisstärke und Glucose. Die Stärke ist durch Addition von monofunktionellen substituierten Gruppen wie Octenylbernsteinsäureanhydrid modifiziert.

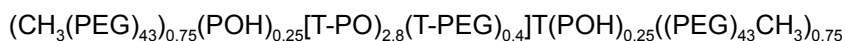
**[0348]** Hier geeignete Antiwiederablagerungs- und Schmutzsuspensionsmittel schließen Cellulosederivate wie Methylcellulose, Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose und homo- oder copolymere Polycarbonsäuren oder deren Salze ein. Polymere dieses Typs schließen die vorstehend als Gerüststoffe erwähnten Polyacrylate und Maleinsäureanhydrid-Acrylsäure-Copolymere, z. B. Sokalan CPS, sowie Copolymere von Maleinsäureanhydrid mit Ethylen, Methylvinylether oder Methacrylsäure ein, wobei das Maleinsäureanhydrid mindestens 20 Mol-% des Copolymers bildet. Diese Materialien werden gewöhnlich mit Gehalten von 0,5 bis 10 Gew.-%, stärker bevorzugt 0,75 bis 8 Gew.-%, besonders bevorzugt von 1 bis 6 Gew.-% der Zusammensetzung verwendet.

**[0349]** Bevorzugte optische Aufheller sind anionischen Charakters, wobei Beispiele dafür Dinatrium-4,4'-bis-(2-diethanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino)stilben-2,2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(2-morpholino-4-anilino-s-triazin-6-ylaminostilben-2,2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ylamin)stilben-2,2'-disulfonat, Mononatrium-4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ylamino)stilben-2-sulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-methyl-N-2-hydroxyethylamino)-s-triazin-6-ylamino)stilben-2,2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(4-phenyl-2,1,3-triazol-2-yl)-stilben-2,2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis(2-anilino-4-(1-methyl-2-hydroxyethylamino)-s-triazin-6-ylamino)stilben-2,2'-disulfonat, Natrium-2-(stilbyl-4''-(naphtho-1',2':4,5)-1,2,3,-triazol-2''-sulfonat und 4,4'-Bis(2-sulfostryl)biphenyl sind.

**[0350]** Bei anderen nützlichen polymeren Materialien handelt es sich um die Polyethylenglycole, insbesondere diejenigen mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 10.000, stärker bevorzugt 2.000 bis 8.000, und besonders bevorzugt 4.000. Diese werden mit Gehalten von 0,20 bis 5 Gew.-%, stärker bevorzugt 0,25 bis 2,5 Gew.-% verwendet. Diese Polymere und die vorstehend erwähnten homo- oder copolymeren Polycarboxylatsalze sind zum Verbessern der Beibehaltung der Weißheit, der Gewebeascheablagerung und Reinigungsleistung für Ton, proteinhaltigen oder oxidierbaren Schmutz in Gegenwart von Übergangsmetallverunreinigungen sehr wertvoll.

**[0351]** Ein wie in WO 95/22593 offenbartes Pflöppolymer kann ebenso verwendet werden.

**[0352]** Bei in Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung nützlichen Schmutzfreisetzungsmitteln handelt es sich günstigerweise um Copolymere oder Terpolymere von Terephthalsäure mit Ethylenglycol- und/oder Propylenglycoleinheiten in verschiedenen Anordnungen. Beispiele für solche Polymere sind in US 4,116,885, US 4,711,730 und EP 0 272 033 offenbart. Ein besonders bevorzugtes Polymer gemäß EP 0 272 033 weist die Formel



auf, wobei PEG  $-(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{O}-$  darstellt, PO  $(\text{OC}_3\text{H}_6\text{O})$  darstellt und T  $(\text{pOC}_6\text{H}_4\text{CO})$  darstellt.

**[0353]** Auch sehr nützlich sind modifizierte Polyester als zufällige Copolymere von Dimethylterephthalat, Dimethylsulfoisophthalat, Ethylenglycol und 1,2-Propandiol, wobei die Endgruppen primär aus Sulfobenzoat und sekundär aus Monoestern von Ethylenglycol und/oder Propandiol bestehen. Ziel ist es, ein Polymer zu erhalten, das an beiden Enden mit endständigen Sulfobenzoatgruppen versehen ist, wobei im vorliegenden Kontext „primär“ die meisten der Copolymere hier endständig mit Sulphobenzoatgruppen versehen sind. Jedoch sind einige Copolymere weniger als vollständig mit Endgruppen versehen, und deshalb können ihre Endgruppen aus Monoester von Ethylenglycol und/oder Propan-1,2-diol davon „sekundär“ aus solchen Spezies bestehen.

**[0354]** Die ausgewählten Polyester hier enthalten etwa 46 Gew.-% Dimethylterephthalsäure, etwa 16 Gew.-% Propan-1,2-diol, etwa 10 Gew.-% Ethylenglycol, etwa 13 Gew.-% Dimethylsulfobenzoesäure und etwa 15 Gew.-% Sulfoisophthalsäure, und weisen ein Molekulargewicht von etwa 3.000 auf. Diese Ester und ihre Herstellungsverfahren sind im Detail in EP 311 342 beschrieben.

**[0355]** Weichmacher: Gewebeweichmacher können ebenso in erfindungsgemäße Detergenzzusammensetzungen eingebracht werden. Diese Mittel können anorganischen oder organischen Typs sein. Anorganische Weichmacher sind durch die in GB-A-1 400 898 und in US 5,019,292 offenbarten Smektitone beispielhaft beschrieben. Organische Gewebeweichmacher schließen die wie in GB-A 1 514 276 und EP 0 011 340 offenbarten wasserunlöslichen tertiären Amine und ihre wie in EP 026 528 offenbarte Kombination mit quartären  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{14}$ -Monoammoniumsalzen und wie in EP 0 242 919 offenbarte langkettige Diamide ein. Andere nützliche organische Zusätze für Gewebeweichmachersysteme schließen wie in EP 0 299 575 und 0 313 146 offenbarte Polyethylenoxidmaterialien mit hohem Molekulargewicht ein.

**[0356]** Die Gehalte von Smektitton liegen gewöhnlich im Bereich von 5 bis 15 Gew.-%, stärker bevorzugt von 8 bis 12 Gew.-%, wobei das Material als Trockenmischungskomponente zum Rest der Formulierung zugesetzt wird. Organische Gewebeweichmacher wie die wasserunlöslichen tertiären Amine und langkettigen Diamidmaterialien werden mit Gehalten von 0,5 bis 5 Gew.-%, gewöhnlich 1 bis 3 Gew.-%, eingebracht, während die Polyethylenoxidmaterialien mit hohem Molekulargewicht und die wasserlöslichen kationischen Materialien mit Gehalten von 0,1 bis 2 Gew.-%, gewöhnlich 0,15 bis 1,5 Gew.-% zugesetzt werden. Diese Materialien werden gewöhnlich dem sprühgetrockneten Teil der Zusammensetzung zugesetzt, obwohl es in manchen Fällen günstig sein kann, sie als trockengemischte Teilchen zuzusetzen oder als geschmolzene Flüssigkeit auf andere feste Komponenten der Zusammensetzung aufzusprühen.

**[0357]** Polymere Farbübergangshemmstoffe: Die erfindungsgemäßen Detergenzzusammensetzungen können auch 0,001 bis 10%, vorzugsweise 0,01 bis 2 Gew.-%, stärker bevorzugt 0,05 bis 1 Gew.-% polymere Farbübergangshemmstoffe enthalten. Solche polymeren Farbübergangshemmstoffe werden gewöhnlich in die Detergenzzusammensetzungen eingebracht, um den Übergang von Farben von gefärbten Geweben auf damit gewaschene Gewebe zu hemmen. Diese Polymere weisen die Fähigkeit auf, die von gefärbten Geweben herausgewaschenen, austretenden Farbstoffe zu absorbieren, bevor die Farbstoffe die Möglichkeit zum Anlagern an andere Gegenstände in der Wäsche erhalten.

**[0358]** Bei besonders geeigneten polymeren Farbübergangshemmstoffen handelt es sich um Polya-min-N-oxid-Polymere, Copolymere von N-Vinylpyrrolidon und N-Vinylimidazol, Polyvinylpyrrolidonpolymere, Polyvinylloxzolidone und Polyvinylimidazole oder Gemische davon. Die Zugabe solcher Polymere verbessert auch die Leistung der erfindungsgemäßen Enzyme.

**[0359]** Die erfindungsgemäße Detergenzzusammensetzung kann in Form einer Flüssigkeit, einer Paste, eines Gels, von Stangen oder eines Granulats vorliegen. Nichtstäubende Granulate können z. B. wie in US 4,106,991 und 4,661,452 (beide von Novo Industri A/S) offenbart hergestellt und gegebenenfalls durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren beschichtet werden. Beispiele für wachsartige Beschichtungsmaterialien sind Poly(ethylenoxid)-Produkte (Polyethylenglycol, PEG) mit mittleren Molekulargewichten von 1.000 bis



20.000; ethoxylierte Nonylphenole mit 16 bis 50 Ethylenoxideinheiten; ethoxylierte Fettalkohole, in welchen der Alkohol 12 bis 20 Kohlenstoffatome enthält, und in welchen 15 bis 80 Ethylenoxideinheiten vorliegen; Fettalkohole; Fettsäuren; und Mono- und Di- und Triglyceride von Fettsäuren. Beispiele für zum Aufbringen durch Wirbelschichttechniken geeignete filmbildende Beschichtungsmaterialien sind in GB 1 483 591 angegeben.

**[0360]** Erfindungsgemäße Granulatzusammensetzungen können auch in „Kompaktform“ vorliegen, d. h. sie können eine relativ höhere Dichte als herkömmliche Granulatdetergenzien, d. h. 550 bis 950 g/l enthalten; in einem solchen Fall enthält die erfindungsgemäße Granulat-Detergenzzusammensetzung eine geringere Menge an „anorganischem Füllsalz“, verglichen mit herkömmlichen Granulatdetergenzien, wobei es sich bei typischen Füllsalzen um Erdalkalimetallsalze von Sulfaten und Chloriden, typischerweise Natriumsulfat handelt. „Kompakt“-Detergenzien umfassen typischerweise nicht mehr als 10% Füllsalz. Die erfindungsgemäßen Flüssigzusammensetzungen können auch in „konzentrierter Form“ vorliegen, wobei in einem solchen Fall die erfindungsgemäße Flüssig-Detergenzzusammensetzung eine verglichen mit herkömmlichen Flüssigdetergenzien geringere Menge Wasser enthält. Typischerweise beträgt der Wassergehalt des konzentrierten Flüssigdetergenzes weniger als 30 Gew.-%, stärker bevorzugt weniger als 20 Gew.-%, besonders bevorzugt weniger als 10 Gew.-% der Detergenzzusammensetzungen.

**[0361]** Die Zusammensetzungen der Erfindung können z. B. als Hand- und Maschinenwaschmittel-Detergenzzusammensetzungen, einschließlich Waschzusatzmittelzusammensetzungen und Zusammensetzungen, die zur Verwendung zur Vorbehandlung von verschmutztem Gewebe geeignet sind, der Spülung zugesetzte Gewebeweichmacherzusammensetzungen und Zusammensetzungen zur Verwendung in allgemeinen Haushaltsreinigungsvorgängen für harte Oberflächen und Geschirrspülvorgängen formuliert werden.

**[0362]** Besondere Formen von Waschmittel-Detergenzzusammensetzungen in der Erfindung schließen ein:

- 1) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	7 – 12%
Alkoholethoxysulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> -Alkohol, 1-2 EO) oder Alkylsulfat (z. B. C <sub>16-18</sub> )	1 – 4%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>14-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	5 – 9%
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14 – 20%
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	2 – 6%
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	15 – 22%
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 – 6%
Natriumcitrat/Zitronensäure (wie C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 15%
Natriumperborat (wie NaBO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O)	11 – 18%
TAED	2 – 6%
Carboxymethylcellulose	0 – 2%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer, PVP, PEG)	0 – 3%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%

- 2) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	6 – 11%
Alkoholethoxysulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> -Alkohol, 1-2 EO) oder Alkylsulfat (z. B. C <sub>16-18</sub> )	1 – 3%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>14-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	5 – 9%
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15 – 21%
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1 – 4%

Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	24 - 34%
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 – 10%
Natriumcitrat /Zitronensäure (wie C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> / C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 15%
Carboxymethylcellulose	0 – 2%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer, PVP, PEG)	1 – 6%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum)	0 – 5%

3) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	5 – 9%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	7 – 14%
Seife als Fettsäuren (z. B. C <sub>16-22</sub> -Fettsäure)	1 – 3%
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	10 – 17%
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	3 – 9%
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	23 - 33%
Natirumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 – 4%
Natriumperborat (wie NaBO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O)	8 – 16%
TAED	2 – 8%
Phosphonat (z. B. EDTMPA)	0 – 1%
Carboxymethylcellulose	0 – 2%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer, PVP, PEG)	0 – 3%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller)	0 – 5%

4) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	8 – 12%
Alkoholethoxysulfat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO)	10 – 25%
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14 – 22%
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2 SiO <sub>2</sub> )	1 – 5%
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	25 - 35%
Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 – 10%
Carboxymethylcellulose	0 – 2%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer, PVP, PEG)	1 – 3%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum)	0 – 5%

5) Eine wässrige Flüssig-Detergenzzusammensetzung, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15 – 21%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	12 – 18%
Seife als Fettsäure (z. B. Oleinsäure)	3 – 13%
Alkenylbernsteinsäure (C <sub>12-14</sub> )	0 – 13%
Aminoethanol	8 – 18%
Zitronensäure	2 - 8%
Phosphonat	0 – 3%
Polymere (z. B. PVP, PEG)	0 – 3%
Borat (wie B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 2%
Ethanol	0 – 3%
Propylenglycol	8 – 14%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Dispersionsmittel, Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller)	0 – 5%

6) Eine wässrige strukturierte Flüssig-Detergenzzusammensetzung, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15 – 21%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	3 – 9%
Seife als Fettsäure (z. B. Oleinsäure)	3 – 10%
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	14 – 22%
Kaliumcitrat	9 – 18%
Borat (wie B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 - 2%
Carboxymethylcellulose	0 – 2%
Polymere (z. B. PVP, PEG)	0 – 3%
Ankerpolymere wie z. B. Laurylmethacrylat /Acrylsäure-Copolymer; Molverhältnis	0 – 3%
Glycerin	0 – 5%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Dispersionsmittel, Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller)	0 – 5%

7) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l, umfassend:

Fettalkoholsulfat	5 – 10%
Ethoxyliertes Fettsäuremonoethanolamid	3 – 9%
Seife als Fettsäure	0 – 3%
Natriumcarbonat (wie Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	5 – 10%
Lösliches Silicat (wie Na <sub>2</sub> O, 2SiO <sub>2</sub> )	1 – 4%
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	20 – 40%

Natriumsulfat (wie Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 – 8%
Natriumperborat (wie NaBO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O)	12 – 18%
TAED	2 – 7%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer, PEG)	1 – 5%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. optische Aufheller, Schaumunterdrücker, Parfum)	0 – 5%

8) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	8 – 14%
Ethoxyliertes Fettsäuremonoethanolamid	5 – 11%
Seife als Fettsäure	0 – 3%
Natriumcarbonat (wie $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	4 – 10%
Lösliches Silicat (wie $\text{Na}_2\text{O}$ , $2\text{SiO}_2$ )	1 – 4%
Zeolith (wie $\text{NaAlSiO}_4$ )	30 – 50%
Natriumsulfat (wie $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	3 – 11%
Natriumcitrat (wie $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ )	5 – 12%
Polymere (z. B. PVP, Malein-/Acrylsäure-Copolymer, PEG)	1 – 5%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum)	0 – 5%

9) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylsulfat (z. B. $\text{C}_{12-18}$ )	6 – 12%
Seife, Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat $\text{C}_{10-18}$ , 2 – 7 EO)	2 – 8%
Alkylglucamid (z. B. $\text{C}_{16-18}$ )	2 – 6%
Zeolith (wie $\text{NaAlSiO}_4$ )	14 – 24%

Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	7 – 13%
Natriumdisilicat; ( $\text{Na}_2\text{O}:2\text{SiO}_2$ ) (z. B. SKS6)	10 – 14%
Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	5 – 9%
Natriumpercarbonat	10 – 16%
TAED	1 – 5%
CMC	0 – 3%
Polycarboxylat	1 – 7%
Polymere (z. B. PVP, PEG, Malein-/Acrylsäure-Copolymer)	0 – 2%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	700

10) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylsulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> )	7 – 11%
Seife, Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>10-18</sub> , 2 – 7 EO)	7 – 11%
Alkylglucamid (z. B. C <sub>16-18</sub> )	2 – 6%
Zeolith (wie NaAlSiO <sub>4</sub> )	19 – 29%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	12 – 18%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> ) (z. B. SKS6)	7 – 11%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 – 9%
CMC	0 – 3%
Polycarboxylat	4 – 8%
Polymere (z. B. PVP, PEG, Malein-/Acrylsäure-Copolymer)	1 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als	0,0001 – 0,1%

reines Enzymprotein)	
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	700

11) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylsulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> )	4 – 10%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>10-18</sub> , 2 – 7 EO)	2 – 7%
Phosphat (als STPP)	17 – 27%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	4 – 8%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> ) (z. B. SKS6)	4 – 8%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	18 – 26%
Natriumperborattetrahydrat	13 – 19%
TAED	1 – 4%
CMC	0 – 2%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

12) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylschwefelsäure (z. B. C <sub>12-18</sub> )	2 – 9%
Seife, Na-Salz	1 – 4%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>10-18</sub> , 2 – 7 EO)	9 – 15%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> )	35 – 45%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3 – 10%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> ) (z. B. SKS6)	0 – 4%

Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 – 6%
Natriumpercarbonat	14 – 20%
TAED	2 – 7%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	700

13) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	8 – 14%
Alkylschwefelsäure (z. B. C <sub>12-18</sub> )	2 – 6%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>10-18</sub> , 2 – 7 EO)	9 – 13%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (z. B. Zeolith 4A)	20 – 30%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0 – 6%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> )	0 – 3%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0 – 6%
Natriumperborattetrahydrat	22 – 28%
TAED	5 – 9%
CMC	0 – 2%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer)	0 – 4%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

14) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	6 – 12%
Alkyletherschwefelsäure (z. B. C <sub>12-18</sub> -Alkohol, 4 – 10 EO) oder Alkylsulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> )	2 – 6%
Seife, Na-Salz	0 – 2%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>10-18</sub> , 3 – 10 EO)	9 – 13%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (z. B. Zeolith 4A)	39 – 49%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	2 – 8%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> )	0 – 3%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2 – 8%
Natriumperborattetrahydrat	22 – 28%
CMC	0 – 3%
Polymere (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer)	0 – 4%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

15) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylsulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> )	2 – 8%
Seife, Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-16</sub> , 3 – 10 EO)	10 – 16%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (z. B. Zeolith 4A)	47 – 57%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15 – 23%
Natriumcitrat/Zitronensäure; (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> / C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 16%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 – 5%
CMC	0 – 3%

Polycarboxylat	0 – 2%
Polymere (z. B. PVP)	0 – 2%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	800



16) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	1 – 5%
Phosphat (als STPP)	12 – 18%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	16 – 24%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> )	1 – 3%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	38 – 48%
Natriumperborattetrahydrat	8 – 14%
TAED	0 – 3%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	500

17) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Seife, Na-Salz	1 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	2 – 6%
Betain (z. B. Alkylamidpropylbetain)	0 – 3 %

Phosphat (als STPP)	27 – 37%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	17 – 23%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> )	3 – 7%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 – 11%
Natriumperborattetrahydrat	15 – 21%
TAED	1 – 4%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

18) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	5 – 11%
Seife, Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	3 – 7%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (z. B. Zeolith 4A)	20 – 30%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	15 – 23%
Natriumcitrat/Zitronensäure; (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> / C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 3%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 – 10%
Natriumpercarbonat	7 – 13%
TAED	2 – 6%
CMC	1 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

19) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	0 – 4%
Seife, Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	2 – 6%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (z. B. Zeolith 4A)	11 – 17%
Phosphat (als STPP)	25 – 35%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3 – 7%
Natriumsilicat; (Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> )	0 – 19%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	20 – 28%
Natriumperborattetrahydrat	9 – 13%
TAED	1 – 5%
CMC	0 – 2%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

20) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	17 – 23%
Seife, Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	11 – 15%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> ) (z. B. Zeolith 4A)	60 – 70%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0 – 3%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 – 11%
CMC	0 – 3%
Polymere (z. B. PVP, PEG, Malein-/Acrylsäure-	2 – 6%

Copolymer)	
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	350

21) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	16 – 22%
Seife, Na-Salz	0 – 2%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	3 – 9%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> )	25 – 33%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	3 – 7%
Natriumsilicat; (Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> )	0 – 4%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 – 11%
Phosphonat	0 – 3%
Natriumperboratmonohydrat	15 – 19%
TAED	3 – 7%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	700

22) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	4 – 8%
Alkylsulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> )	0 – 3%

Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 – 10 EO)	5 – 9%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> )	20 – 28%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	9 – 15%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> )	0 – 4%
Natriumperborattetrahydrat	21 – 31%
TAED	1 – 5%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

23) Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat, umfassend:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	6 – 12%
Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff	1 – 4%
Seife als Fettsäure	2 – 6%
Natriumcarbonat (als Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	14 – 22%
Zeolith (als NaAlSiO <sub>4</sub> )	18 – 32%
Natriumsulfat (als Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5 – 20%
Natriumcitrat (als C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	3 – 8%
Natriumperborat (als NaBO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O)	4 – 9%
Bleichaktivator (z. B. NOBS oder TAED)	1 – 5%
Carboxymethylcellulose	0 – 2%
Polymere (z. B. Polycarboxylat oder PEG)	1 – 5%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. optische Aufheller, Parfum)	0 – 5%

24) Eine wässrige Flüssig-Detergenzzusammensetzung, umfassend:

Lineares Alkylbenzenesulfonate (berechnet als Säure)	15 – 23%
Alkoholethoxysulfat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 2 – 3 EO)	8 – 15%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	3 – 9%
Seife als Fettsäure (z. B. Laurinsäure)	0 – 3%
Aminoethanol	1 – 5%
Natriumcitrat	5 – 10%
Hydrotrop (z. B. Natriumtoluolinsulfonat)	2 – 6%
Borat (als B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 2%
Carboxymethylcellulose	0 – 1%
Ethanol	1 – 3%
Propylenglycol	2 – 5%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Polymere, Dispersionsmittel, Parfum, optische Aufheller)	0 – 5%

25) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als konzentrierte Flüssigkeit:

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	20 – 32%
Alkoholethoxylat (z. B. C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 7 EO oder C <sub>12-15</sub> -Alkohol, 5 EO)	6 – 12%
Aminoethanol	2 – 6%
Zitronensäure	8 – 14%
Borat (als B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	1 – 3%
Polymer (z. B. Malein-/Acrylsäure-Copolymer, Ankerpolymer wie z. B. Laurylmethacrylat /Acrylsäure-Copolymer)	0 – 3%
Glycerin	3 – 8%

Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Hydrotrope, Dispersionsmittel, Parfum, optische Aufheller)	0 – 5%

26) Eine wässrige Flüssig-Detergenzzusammensetzung, umfassend:

Alkylbenzolsulfonsäure	6 – 12%
Alkylschwefelsäure	0 – 4%
Monoethanolamin	2 – 6%
Nichtionisch (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 - 10 EO)	9 – 15%
Natriumcitrat/Zitronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	2 – 8%
Glycerin	2 – 6%
Borat (als Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	0 – 4%
Polymere (z. B. PVP, PEG, Malein-/Acrylsäure-Copolymer)	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Gesamtwasser	40%

27) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als konzentrierte Flüssigkeit:

Alkylbenzolsulfonsäure	11 – 17%
Alkyletherschwefelsäure (z. B. C <sub>12-18</sub> -Alkohol, 4 – 10 EO) oder Alkylsulfat (z. B. C <sub>12-18</sub> )	0 – 4%
Triethanolamin	0 – 3%
Nichtionisch (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 3 - 10 EO)	6 – 10%
Natriumcitrat/Zitronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> /C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	2 – 6%
Hydrotrope (Natriumtoluolsulfonat)	1 – 5%

Glycerin	6 – 12%
MPG	0 – 5%
Ethanol	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Gesamtwasser	55%

28) Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat mit einer Schüttdichte von mindestens 600 g/l umfassend:

Anionischer oberflächenaktiver Stoff (lineares Alkylbenzolsulfonat, Alkylsulfat, alpha-Olefinsulfonat, alpha-Sulfofettsäuremethyl Ester, Alkansulfonate, Seife)	25 – 40%
Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff (z. B. Alkoholethoxylat)	1 – 10%
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	8 – 25%
Natriumsilicat; ( $\text{Na}_2\text{O}$ , $2\text{SiO}_2$ )	5 – 15%
Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	0 – 5%
Zeolith (als $\text{NaAlSiO}_4$ )	15 – 28%
Natriumperborat (als $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0 – 20%
Bleichaktivator (TAED oder NOBS)	0 – 5%
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Parfum, optische Aufheller)	0 – 3%

29) Eine Detergenzzusammensetzung formuliert als Granulat:

Alkylbenzolsulfonsäure	25 – 35%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat $\text{C}_{12-18}$ , 3 – 10 EO)	0 – 3%

Zeolith ( $\text{NaAlSiO}_4$ )	3 – 9%
Phosphat (als STPP)	25 – 35%
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	0 – 3%
Natriumdisilicat; ( $\text{Na}_2\text{O}:2\text{SiO}_2$ )	2 – 8%
Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	17 – 23%
Natriumperboratmonohydrat	1 – 5%
TAED	0 – 3%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	600

30) Eine Detergenzzusammensetzung formuliert als Granulat:

Alkylbenzolsulfonsäure	25 – 35%
Seife, Fettsäure-Na-Salz	0 – 3%
Nichtionisch, (z. B. Alkoholethoxylat C <sub>13-15</sub> , 7 EO)	4 – 9%
Zeolith (NaAlSiO <sub>4</sub> )	7 – 11%
Phosphat (als STPP)	26 – 36%
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	6 – 12%
Natriumdisilicat; (Na <sub>2</sub> O:2SiO <sub>2</sub> )	4 – 10%
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 – 8%
CMC	0 – 3%
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1%
Nebenbestandteile (z. B. Schaumunterdrücker, Parfum, optische Aufheller, Lichtbleiche)	0 – 5%
Schüttdichte (g/l), mindestens	700

**[0363]** Die folgenden spezifischen Zusammensetzungen bedeuten die Veranschaulichung von Zusammensetzungen für die vorliegende Erfindung, sollen jedoch den Rahmen der Erfindung nicht beschränken oder auf andere Weise definieren.

**[0364]** In den Detergenzzusammensetzungen weisen die abgekürzten Komponentenbezeichnungen die folgenden Bedeutungen auf:

LAS:	lineares Natrium-C <sub>12</sub> -alkylbenzolsulfonat
TAS:	Natriumtalkalkylsulfat
XYAS:	Natrium-C <sub>IX</sub> -C <sub>IY</sub> -alkylsulfat
SS:	sekundäre oberflächenaktive Seife der Formel 2-Butyloctansäure
25EY:	ein überwiegend linearer primärer C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> -Alkohol, kondensiert mit durchschnittlich Y mol Ethylenoxid
45EY:	ein überwiegend linearer primärer C <sub>14</sub> -C <sub>15</sub> -Alkohol, kondensiert mit durchschnittlich Y mol Ethylenoxid
XYEYZ:	C <sub>IX</sub> -C <sub>IY</sub> -Natriumalkylsulfat, kondensiert mit durchschnittlich Z mol Ethylenoxid pro Mol
Nichtionisch:	gemischter ethoxylierter/propoxylierter C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> -Alkohol mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 3,8 und einem mittleren Propoxylierungsgrad von 4,5, vertrieben unter der Marke Plurafax LF404 von BASF GmbH
CFAA:	C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> -Alkyl-N-methylglucamid
TFAA:	C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> -Alkyl-N-methylglucamid
Silicat:	amorphes Natriumsilicat (SiO <sub>2</sub> : Na <sub>2</sub> O-Verhältnis = 2,0)
NaSKS-6:	kristallines geschichtetes Silicat der Formel d-Na <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Carbonat:	wasserfreies Natriumcarbonat
Phosphat:	Natriumtripolyphosphat
MA/AA:	Copolymer von 1 : 4 Malein-/Acrylsäure, mittleres Molekulargewicht etwa 80.000



Polyacrylat:	Polyacrylathomopolymer mit einem mittleren Molekulargewicht von 8.000, vertrieben unter der Marke PA30 von BASF GmbH
Zeolith A:	hydriertes Natriumaluminiumsilicat der Formel $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ mit einer Primärteilchengröße im Bereich von 1 bis 10 Mikrometer
Citrat:	Trinatriumcitratdihydrat
Zitronen:	Zitronensäure
Perborat:	wasserfreie Natriumperboratmonohydrat-Bleiche, empirische Formel $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$
PB4:	wasserfreies Natriumperborattetrahydrat
Percarbonat:	wasserfreie Natriumpercarbonat-Bleiche der empirischen Formel $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$
TAED:	Tetraacetylenethyldiamin
CMC:	Natriumcarboxymethylcellulose
DETPMP:	Diethylentriaminpenta(methylenphosphonsäure), vertrieben von Monsanto unter der Marke Dequest 2060
PVP:	Polyvinylpyrrolidonpolymer
EDDS:	Ethyldiamin-N,N'-dibernsteinsäure, [S,S]-Isomer in Form des Natriumsalzes
Schaumunterdrücker:	25% Paraffinwachs, Schmelzpunkt 50°C, 17% hydrophobes Siliciumdioxid, 58% Paraffinöl
Granulatschaum:	12% Silicon/Siliciumdioxid, 18% Stearylalkohol, 70% Stärke in Granulatform
Sulfat:	wasserfreies Natriumsulfat
HMWPEO:	Polyethylenoxid mit hohem Molekulargewicht
TAE 25:	Talkalkoholethoxylat (25)

## Zusammensetzung 1

**[0365]** Eine erfindungsgemäße Granulatgewebereinigungs-Zusammensetzung kann wie folgt hergestellt werden:

Natrium-lineares- $\text{C}_{12}$ -Alkyl	6,5
Benzolsulfonat	
Natriumsulfat	15,0
Zeolith A	26,0
Natriumnitrilotriacetat	5,0
Enzym der Erfindung	0,1
PVP	0,5
TAED	3,0
Borsäure	4,0
Perborat	18,0
Phenolsulfonat	0,1
Nebenbestandteile	auf 100

## Zusammensetzung 2

**[0366]** Eine erfindungsgemäße Kompaktgranulatgewebereinigungs-Zusammensetzung (Dichte 800 g/l) kann wie folgt hergestellt werden:

45AS	8,0
25E3S	2,0
25ES	3,0
25E3	3,0
TFAA	2,5
Zeolith A	17,0
NaSKS-6	12,0
Zitronensäure	3,0
Carbonat	7,0
MA/AA	5,0
CMC	0,4
Enzym der Erfindung	0,1
TAED	6,0
Percarbonat	22,0
EDDS	0,3
Granulatschaumunterdrücker	3,5
Wasser/Nebenbestandteile	auf 100%

## Zusammensetzung 3

**[0367]** Erfindungsgemäße Granulatgewebereinigungs-Zusammensetzungen, die beim Waschen von gefärbten Stoffen besonders nützlich sind, wurden wie folgt hergestellt:

LAS	10,7	-
TAS	2,4	-
TFAA	-	4,0
45AS	3,1	10,0
45E7	4,0	-
25E3S	-	3,0
68E11	1,8	-
25E5	-	8,0
Citrat	15,0	7,0
Carbonat	-	10
Zitronensäure	2,5	3,0
Zeolith A	32,1	25,0
NA-SKS-6	-	9,0
MA/AA	5,0	5,0
DETPMP	0,2	0,8
Enzym der Erfindung	0,10	0,05
Silicat	2,5	-
Sulfat	5,2	3,0
PVP	0,5	-

Poly(4-vinylpyridin)-N-oxid

/Copolymer von Vinylamidazol

und Vinylpyrrolidon - 0,2

Perborat 1,0 -

Phenolsulfonat 0,2 -

Wasser/Nebenbestandteile auf 100%

## Zusammensetzung 4

**[0368]** Erfindungsgemäße Granulatgewebereinigungs-Zusammensetzungen, die die Fähigkeit des „Weichmachens der Wäsche“ bereitstellen, können wie folgt hergestellt werden:

45AS - 10,0

LAS 7,6 -

68AS 1,3 -

45E7 4,0 -

25E3 - 5,0

Cocoalkyldimethylhydroxy-

ethylammoniumchlorid 1,4 1,0

Citrat 5,0 3,0

Na-SKS-6 - 11,0

Zeolith A 15,0 15,0

MA/AA 4,0 4,0

DETPMP 0,4 0,4

Perborat 15,0 -

Percarbonat - 15,0

TAED 5,0 5,0

Smektit-Ton 10,0 10,0

HMWPEO - 0,1

Enzym der Erfindung 0,10 0,05

Silicat 3,0 5,0

Carbonat 10,0 10,0

Granulatschaumunterdrücker 1,0 4,0

CMC 0,2 0,1

Wasser /Nebenbestandteile auf 100%

## Zusammensetzung 5

**[0369]** Erfindungsgemäße Hochleistungs-Flüssiggewebereinigungs-Zusammensetzungen können wie folgt hergestellt werden:

	I	II
LAS, Säureform	-	25,0
Zitronensäure	5,0	2,0
25AS Säureform	8,0	-
25AE2S Säureform	3,0	-
25AE7	8,0	-
CFAA	5	-
DETPMP	1,0	1,0
Fettsäure	8	-
Oleinsäure	-	1,0
Ethanol	4,0	6,0
Propandiol	2,0	6,0
Enzym der Erfindung	0,10	0,05
Cocoalkyldimethylhydroxy- ethylammoniumchlorid	-	3,0
Smektit-Ton	-	5,0
PVP	2,0	-
Wasser/Nebenbestandteile	auf 100%	

Zusammensetzung 6  
Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 5 – 7 EO	6	4
Alkylbenzolsulfonat; C <sub>11-13</sub>	5	20
Lineares Alkylsulfat; C <sub>16-18</sub> (z. B. Sulfopon)	5	0
Seife	1	4
Natriumcarbonat	10	0
Zeolith Na-A	25	35
Natriumsilicat; Na <sub>2</sub> O:SiO <sub>2</sub> = 3	2	2
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1	20
Polycarboxylat; (Sokalan-CP5)	5	5
Carbonsäuren (Sokalan DCS)	0	4
Natriumperborattetrahydrat	20	0
TAED	6	0
Schaumunterdrücker	5	0
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1	0,0001 – 0,1

Zusammensetzung 7  
Eine Bleiche enthaltende Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Primäres Alkoholsulfat (CocoPAS)	5	6
Nichtion, 3EO (z. B. Alkoholethoylat C <sub>12-15</sub> ; 3EO)	5	0
Nichtion, 7EO (Alkoholethoylat C <sub>12-15</sub> ; 7EO)	8	14
Sokalan HP22*	0,7	0,8
Seife	1,3	0
Zeolith MAP	39	39
Natriumcitrat	4	5

Natriumcarbonat	3,3	1
Wasser/Salze	0,4	0,5
Antischäumungs-/Fluoreszenzmittel/Parfum	4	5
TAED	5	5
Mn-Katalysator	1,7	1,7
Percarbonat	21	21
EDTMP	0,4	0,4
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1	0,0001 – 0,1

\* ein Pfpopf-Copolymer wie beschrieben in WO 95/22593

#### Zusammensetzung 8

Eine Detergenzzusammensetzung ohne Bleiche, formuliert als Granulat

Primäres Alkoholsulfat (Coco-PAS)	6	6	11	9	6	6
Nichtion, 3EO (z. B. Alkoholethoylat C <sub>12-15</sub> ; 3EO)	6	0	4	4	6	0
Nichtion, 7EO (z. B. Alkoholethoylat C <sub>12-15</sub> ; 7EO)	6	14	6	6	9	15
Sokalan HP22*	0,7	0,7	0,6	0,7	0,5	0,5
Seife	2	2	2	2	2	2
Zeolith MAP	39	39	30	32	40	40
Natriumcitrat	25	25	30	32	22	22
Natriumcarbonat	1	1	2	2	1	1
Natrium CMC	0	0	0	0	0,7	0,7
Wasser/Salze	5	6	5	6	6	6
Antischäumungsmittel/ PVP/Parfum	3	3	4	4	3	3
EDTMP	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1
--	--------------

\* ein Pfpopf-Copolymer wie beschrieben in WO 95/622593

Zusammensetzung 9  
Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> , 5EO	0,5	0	0
Alkylglycosid, C <sub>12-14</sub> - Polymerisationsgrad: 1,4	5	5	10
Lineares Alkylsulfat C <sub>16-18</sub> (z. B. Sulfofon, Henkel)	10	18	15
Seife	1	6	6
Natriumcarbonat	12	0	0
Zeolith Na-A	23	50	33
Natriumsilicat (SiO <sub>2</sub> :Na <sub>2</sub> O = 3,0)	5	0	3
Polycarboxylat (Sokalan CP5)	6	0	0
Carbonsäuren (Sokalan DCS)	0	4	0
Natriumpercarbonat	0	0	15
TAED	6	0	5
Schaumunterdrücker	6	6	6
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1		
Wasser	auf 100		

Zusammensetzung 10  
Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Zeolith A	38	38	0	0	0
Natriumdisilicat (z. B. SKS-6,	0	0	25	30	30

Hoechst)					
Amorphes Natriumsilicat $\text{Na}_2\text{O}:\text{SiO}_2 = 1:2,0$	5,5	5,5	0	0	0
Natriumcarbonat	3	3	3	5	0
Polycarboxylat (Sokalan CP5)	0	2	6	5	5
Gemisch aus 80% Alkoholethoxylat $\text{C}_{12-18}$ , 5 EO und 20% Alkohole- thoxylat $\text{C}_{12-14}$ , 3 EO (Dehydol LST 80/20)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Alkoholethoxylat $\text{C}_{16-18}$ ; 14 EO (z. B. Dehydol TA 14)	2	2	2	2	2
Natriumalkylbenzolsulfonat; $\text{C}_{12}$	0	0	2	0	0
Alkylsulfat; $\text{C}_{16-18}$	7,5	7,5	5,5	7,5	7,5
Perboratetetrahydrat	25	25	25	25	25
TAED	2	2	2	2	2
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines En- zymprotein)	0,0001 – 0,1				
Wasser, Parfum, Schaumunterdrück- er etc.	auf 100				

Zusammensetzung 11  
Eine Detergengzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Lineares Alkylbenzolsulfonat	9
Nichtionischer ethoxylierter Alkohol 7EO (z. B. Synperonic A7)	2
Nichtionischer ethoxylierter Alkohol, 1:1 Gemisch aus Synpe- rionic A3 & A7 (3/7 EO-Gruppen)	5
Zeolith 4A	29



Polycarboxylat (z. B. Sokalan CP5)	4
Natriumcarbonat	7
Granulatsnatriumsilicat	4
TAED	8
Natriumperboratmonohydrat	16
EDTMP (Ethylenediamintetramethylenphosphonsäure)	0,4
Nichtionisches Material, enthaltend mindestens 25 EO-Gruppen (z. B. Lutensol AT- BASF und BRIJ-ICI)	0 – 1
Nebenbestandteile (Fluoreszenzmittel, CMC, Salze, Antischäumungsgranulat, Parfum)	4
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1
Feuchtigkeit	auf 100

Zusammensetzung 12  
Eine Detergengzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Natrium-primäres Alkylsulfate (PAS)	6
Nichtionischer ethoxylierter Alkohol 3EO (z. B. Synperonic A3)	7
Nichtionischer ethoxylierter Alkohol, 7EO(z. B. Synperonic A7)	6
Zeolith MAP	36
Stearinsäure	2
Talg 80 EO	0,2
Natriumsilicat	3
TAED	5
Mangankatalysator	2
Natriumpercarbonat	21
Dequest 2047	0,4

Nebenbestandteile (Fluoreszenzmittel, CMC, Salze, Antischäumungsgranulat, Parfum)	4
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1
Feuchtigkeit	auf 100

Zusammensetzung 13  
Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Decyliden- oder Dodecylidendiglycerin	17	0
Decyliden- oder Dodecylidentriglycerin	0	9
C <sub>12-15</sub> EO 7-Ethoxylat		9
Zeolith	32	32
Natriumcarbonat	12	12
Alkalisches Natriumsilicat	1	1
Fettsäureseife	2	2
Natriumcarboxymethylcellulose	1	1
Natriumperboratmonohydrat	15	15
TAED	7	7
Bleichstabilisator (EDTMP)	0,4	0,4
Siliconschaumunterdrücker	0,4	0,4
Fluoreszenzmittel/Parfum	1	1
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1	
Feuchtigkeit	auf 100	

Zusammensetzung 14  
Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als Granulat

Alkylbenzolsulfonat C <sub>10-13</sub>	18	13	15	11	15	3
--	----	----	----	----	----	---

Lineares Alkylsulfat; C <sub>16-18</sub> (z. B. Sulfopon)		3		3	4	14
Alkoholethoxylat; C <sub>16-18</sub> ; 5 EO	1,5	0,5		0,5		
Cetyl/Oleylalkohol 5 EO	1,5	1		0,7	1,4	
Cetyl/Oleylalkohol 10 EO	1,5	1		0,7	1,4	
Alkoholethoxylat C <sub>14-15</sub> ; 7 EO (Dobanol 45-7)			2			0,5
Alkoholethoxylat C <sub>14-15</sub> ; 4 EO (Dobanol 45-4)			6			0,5
Zeolith Na-A	50	15	42	15	51	42
Na-Silicat			5			5
Na-Carbonat			12			12
Na-Sulfat	1	45	1	42		
Polycarboxylat (Sokalan CP5)	5	3	5	2	5	4
Na-Hydrogensulfat		3				
Org. Säure (Sokalan DCS)	3					1,5
Wasser	14,5	11,8	10,1	14,5	16,0	13,1
Seife; C <sub>12-18</sub>	3	3	1	3	4	3
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1					

Zusammensetzung 15  
Eine pulverförmige Detergenzzusammensetzung

Natriumalkylbenzolsulfonat C <sub>11-13</sub>	11	11,5	7	11	15	
Alkoholethoxysulfat (sulfatiertes Alfonic 1412-70)		5,5				
Primäres Alkoholsulfat	10			9	5	
Alkoholethoxylat (z. B. Neodol 25-		3		2	3	10

9)						
Seife	1				1	
Natriumtripolyphosphat					25	
Aluminiumsilicate, z. B. Zeolith 4A	10– 35	0–15	5–20	0 - 12		
Polycarboxylat (z. B. CP5)	0 - 3					
MA/AA/hydrophobe Terpolymere*	2–25	2–25	2–25	2–25	5	2-20
Alkalisches Silicat	2 – 5	20	5	3–20	15	15
Natriumcarbonat	18	18	15	30	20	40
Quartäre Amine			2,4			
Ethoxylierte Amine (z. B. Varonic U202)			2			
Quellton			10			
Fluoreszenzmittel (Tinopal AMS)	0,15	0,2	0,25	0,15	1,5	1,5
Parfum	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 - 0,1					
Natriumsulfat	zum Ausgleich					

\* wie beschrieben in US 5,308,530

Zusammensetzung 16  
Ein wässriges Flüssig-Detergent

Alkylbenzolsulfonat; C <sub>10-13</sub> ; Monoethanolaminsalz	0	0	0	0	9	17	0	0	0
Alkylethersulfat, C <sub>12-14</sub> ; 2 EO	16	10	10	21	11	0	14	38	21
Natriumlaurylsulfat	0	5	5	0	0	0	4	0	0
Seife (C <sub>12-18</sub> -Fettsäure)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Alkoholethoxylat C <sub>12-15</sub> ; 7	22	30	30	30	30	30	20	25	30

EO									
Alkylglycosid, C <sub>8-10</sub> - Oligomerisationsgrad: 1,6	15	0	7	0	0	0	0	0	0
Alkylglycosid, C <sub>12-16</sub> - Oli- gomerisationsgrad: 1,4	0	5	0	5	5	5	10	0	5
1,2-Propandiol	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Ethanol	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (be- rechnet als reines Enzym- protein)	0,0001 - 0,1								
Wasser	auf 100								

Zusammensetzung 17  
Eine wässrige Detergenzzusammensetzung

Fettsäuremonoglycerid (z. B. Cutina AGS, Henkel)	0,5
C <sub>12-18</sub> Fettsäure (z. B. Edenor K 12-18, Henkel)	5
Alkoholethoxylat C <sub>12-18</sub> ; 7EO	20
Alkylglycosid, C <sub>12-18</sub> , Polymerisationsgrad: 1,4	20
Alkylsulfat C <sub>16-18</sub> (z. B. Sufopon K35, Henkel)	5
Ethanol	5
1,2-Propylenglycol	8
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1
Wasser	auf 100

## Zusammensetzung 18

Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als nichtwässriges Flüssig-Detergenz

Alkoholethoxylat C <sub>10-12</sub> ; 7EO	28
Alkoholethoxylat C <sub>10-12</sub> ; 3EO	23
Glycerintriacetat	6
Silicon-Antischäumungsmittel	1,5
Alkylbenzolsulfonsäure	7
Natriumcarbonat	20
Calcit	7
Antikeimbildungspolymer	2
Silica	4
Carboxymethylcellulose	2
Persäuren*	0 – 1
Aufheller	0,2
Parfum	0,6
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1

\*wie beschrieben in WO 95/06104

## Zusammensetzung 19

Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als nichtwässriges Flüssig-Detergenz

Decylden- oder Dodecylidendiglycerin	25
C <sub>10-15</sub> EO 7 Ethoxylat	25
Natriumcarbonat	17
Natriumperboratmonohydrat	11
Alkylbenzolsulfonsäure	6

Calciumcarbonat	6
Silica (Dispersionsmittel)	4
Silicon-Schaumunterdrücker	3
Fluoreszenzmittel/Antiaschebildungspolymer/Antiwiederablagerungspolymer	3
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1

## Zusammensetzung 20

Eine Detergenzzusammensetzung, formuliert als wässriges Flüssig-Detergenz

Decyl- oder Dodecylidentriglycerin	25	0
Decyl- oder Dodecylidendiglycerin	0	12,5
C <sub>10-15</sub> EO 7, Ethoxylat	0	12,5
Fettsäure	4,5	4,5
Kaliumhydroxid	10	10
Zeolith	15	15
Zitronensäure	8	8
Glycerin	2	2
Borax	1,5	1,5
Polymer	1	1
Siliconöl	0,3	0,3
Parfum	0,5	0,5
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1	
Wasser	auf 10	

Zusammensetzung 21  
Eine Flüssig-Iletergenzzusammensetzung, umfassend

Natrium-C <sub>11</sub> -C <sub>15</sub> -alkylbenzol	8	17	10			7
Alkoholethoxysulfat (C <sub>12-14</sub> , 60 Gew.-% Ethylenoxid)	12		6			1
Alkoholethoxylat (C <sub>12-14</sub> -Alkohol)ethoxylat	8	7	8	16	8	4
Alkylpolyglycosid					16	15
Trinatriumcitrat	0-15	0-15	0-10	0-20	10	10
Seife	0-10	0-15			5	4
Carboxymethylenoxysuccinat, Trinatrium					10	0-20
Oxysuccinat – Tetranatrium						6
MA/AA/hydrophobe Terpolymere*	5-15	2-20	2-15	1-10	5	2-15
Monoethanolamin	1	2	2	0-4		2
Triethanolamin			2		4	4
Natriumcarbonat						1
Boraxpentahydrat			3,5		4	4
Glycerin			4		6	5
Propylenglycol	10			10	2	5
Ameisensäure	1			1		1
Calciumchlorid	1		1	1	1	1
Quartäre Amine				2		
Ethoxyliertes Amin	1			2	1	
Alkyldimethylaminoxid				1,5		
Na-Xylolsulfonate	3	6	3	2		3
Ethanol	10		2	8	3	3
Fluoreszenzmittel	0,25	0,2	0,25	0,25	0,2	0,15
Parfum	0,2	0,15	0,1–0,3	0,2	0,25	0,1–0,25



Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 - 0,1
Natriumsulfat	zum Ausgleich

(wie beschrieben in der Erfindung US 5,308,530)

Zusammensetzung 22  
Eine wässrige Flüssig-Detergenzzusammensetzung

Silicon-Antischäumungsmittel	0,3
Zitronensäure	8
Glycerin	2
Borax	2
KOH	10
Zeolith 4A	8
Polymer: Antiausflockungspolymer mit der chemischen Struktur wie Polymer A11 in EP 346 995	1,0
QCC 200: Bentonite-Ton	8
Oleinsäure	5
LAS-Säure	17
Synperonic A3	5
Synperonic A7	5
PVP	0,3
Parfum	0,5
Enzyme, einschließlich lipolytische Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1
Wasser	auf 100

Geschirrspülzusammensetzung

**[0370]** Die Geschirrspülzusammensetzung umfasst einen oberflächenaktiven Stoff, der anionisch, nichtionisch, kationisch, amphoter oder ein Gemisch dieser Typen sein kann. Das Geschirrspülmittel enthält 0 bis 90% des nichtionischen oberflächenaktiven Stoffs, wie gering- oder nichtschäumende ethoxylierte, propoxylierte, geradkettige Alkohole.

**[0371]** Das Geschirrspülmittel kann Geschirrspülmittelgerüststoffsalze von anorganischen und/oder organischen Typen enthalten. Die Geschirrspülmittelgerüststoffe können in phosphorhaltige und nichtphosphorhaltige Typen unterteilt werden. Die Geschirrspülmittelzusammensetzung enthält gewöhnlich 1–90% Geschirrspülmittelgerüststoffe.

**[0372]** Beispiele für phosphorhaltige organische alkalische Geschirrspülmittelgerüststoffe schließen, falls sie vorliegen, die wasserlöslichen Salze, insbesondere Alkalimetallpyrophosphate, Orthophosphate, Polyphos-

phate und Phosphonate ein. Beispiele für nichtphosphorhaltige anorganische Gerüststoffe schließen, wenn sie vorliegen, wasserlösliche Alkalimetallcarbonate, Borate und Silicate sowie die verschiedenen Typen von wasserlöslichen kristallinen oder amorphen Aluminiumsilicaten, unter welchen Zeolithe die bekanntesten Vertreter sind, ein.

**[0373]** Beispiele für geeignete organische Gerüststoffe schließen die Alkalimetall-, Ammonium- und substituierten Ammoniumcitrate, -succinate, -malonate, -fettsäuresulfonate, -carboxymethoxysuccinate, Ammoniumpolyacetate, -carboxylate, -polycarboxylate, -aminopolycarboxylate, -polyacetylcarboxylate und -polyhydroxysulfonate ein.

**[0374]** Andere geeignete organische Gerüststoffe schließen die Polymere und Copolymere mit höherem Molekulargewicht, von welchen bekannt ist, dass sie Gerüststoffeigenschaften aufweisen, z. B. geeignete Polyacrylsäure, Polymalein und Polyacryl/Polymaleinsäure-Copolymere und deren Salze, ein.

**[0375]** Die Geschirrspülzusammensetzung kann Bleichmittel vom Chlor-Bromtyp oder vom Sauerstofftyp enthalten. Beispiele für organische Bleichen vom Chlor-/Bromtyp sind Lithium-, Natrium- oder Calciumhypochlorid und -hypobromid, sowie chloriertes Trinatriumphosphat. Beispiele für organische Bleichen vom Chlor-Bromtyp sind heterocyclische N-Brom- und N-Chlorimide, wie Trichlorisocyanur-, Tribromisocyanur-, Dibromisocyanur- und Dichlorisocyanursäuren und Salze davon mit wasserlöslichen Kationen wie Kalium und Natrium. Hydantoinverbindungen sind ebenso geeignet.

**[0376]** Die Sauerstoffbleichen, z. B. in Form eines organischen Persalzes, vorzugsweise mit einer Bleichvorstufe oder als Peroxysäureverbindung sind bevorzugt. Typische Beispiele für geeignete Peroxoidbleichverbindungen sind Alkalimetallperborate, sowohl Tetrahydrate als auch Monohydrate, Alkalimetallpercarbonate, -persilikate und -perphosphate. Bei bevorzugten Aktivatormaterialien handelt es sich um TAED und Glycerintriacetat.

**[0377]** Die Geschirrspülzusammensetzung der Erfindung kann unter Verwendung von herkömmlichen Stabilisierungsmitteln für das (die) Enzym(e), z. B. eines Polyols, wie z. B. von Propylenglycol, eines Zuckers oder eines Zuckeralkohols, von Milchsäure, Borsäure oder eines Borsäurederivats, z. B. eines aromatischen Boratesters stabilisiert werden.

**[0378]** Die Geschirrspülzusammensetzung kann auch andere Enzyme, insbesondere eine Amylase, eine Protease und/oder eine Cellulase umfassen.

**[0379]** Die Geschirrspülzusammensetzung der Erfindung kann auch andere herkömmliche Geschirrspülsätze, z. B. ein Anti-Ausflockungsmaterial, einen Füllstoff, Schaumunterdrücker, ein Antikorrosionsmittel, Schmutzsuspensionsmittel, Maskierungsmittel, Antischmutzwiederablagerungsmittel, Dehydrierungsmittel, Farbstoffe, Bakterizide, Fluoreszenzmittel, Verdickungsmittel und Parfums enthalten.

**[0380]** Das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung kann in gewöhnlich in Detergenzien eingesetzten Konzentrationen eingebracht werden. Es wird gegenwärtig erwogen, dass das lipolytische Enzym in der Detergenzzusammensetzung der Erfindung in einer Menge, entsprechend 0,00001–1 mg (berechnet als reines Enzymprotein) lipolytisches Enzym pro Liter Waschlauge zugesetzt werden kann.

**[0381]** Nachstehend sind speziell bevorzugte Geschirrspülzusammensetzungen veranschaulicht:

## 1) PULVERZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff	0,4 – 2,5%
Natriummetasilicat	0 – 20%
Natriumdisilicat	3 – 20%
Natriumtriphosphat	20 – 40%
Natriumcarbonat	0 – 20%
Natriumperborat	2 – 9%
Tetraacetylenhydriamin (TAED)	1 – 4%
Natriumsulfat	5 – 33%
Enzyme	0,0001 – 0,1%

## 2) PULVERZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff (z. B. Alkoholethoxylat)	1 – 2%
Natriumdisilicat	2 – 30%
Natriumcarbonat	10 – 50%

Natriumphosphonat	0 – 5%
Trisodiumcitratdihydrat	9 – 30%
Nitilotrinatriumacetat (NTA)	0 – 20%
Natriumperboratmonohydrat	5 – 10%
Tetraacetylenhydriamin (TAED)	1 – 2%
Polyacrylatpolymer (z. B. Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer)	6 – 25%
Enzyme	0,0001 – 0,1%
Parfum	0,1 – 0,5%
Wasser	5 - 10

## 3) PULVERZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff	0,5 – 2,0%
Natriumdisilicat	25 – 40%
Natriumcitrat	30 – 55%
Natriumcarbonat	0 – 29%
Natriumbicarbonat	0 – 20%
Natriumperboratmonohydrat	0 – 15%
Tetraacetylenhydriamin (TAED)	0 – 6%
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	0 – 5%
Ton	1 – 3%
Polyaminosäuren	0 – 20%
Natriumpolyacrylat	0 – 8%
Enzyme	0,0001 – 0,1%

## 4) PULVERZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff	1 – 2%
Zeolith MAP	15 – 42%

Natriumdisilicat	30 – 34%
Natriumcitrat	0 – 12%
Natriumcarbonat	0 – 20%
Natriumperboratmonohydrat	7 – 15%
Tetraacetylenhydriamin (TAED)	0 – 3%
Polymer	0 – 4%
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	0 – 5%
Organisches Phosphonat	0 – 4%
Ton	1 – 2%
Enzyme	0,0001 – 0,1%
Natriumsulfat	Ausgleich

## 5) PULVERZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff	1 – 7%
Natriumdisilicat	18 – 30%
Trisodiumcitrat	10 – 24%
Natriumcarbonat	12 – 20%
Monopersulfat ( $2 \text{ KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ )	15 – 21%
Bleichstabilisator	0,1 – 2%
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	0 – 6%
Diethylentriaminpentaacetat, Pentanatriumsalz	0- 2,5%
Enzyme	0,0001 – 0,1%
Natriumsulfat, Wasser	Ausgleich

## 6) PULVER- UND FLÜSSIGGESCHIRRSPÜLZUSAMMENSETZUNG MIT EINEM OBERFLÄCHENAKTIVEN REINIGUNGSSYSTEM

Nichtionischer oberflächenaktiver Stoff	0 – 1,5%
---	----------

Octadecyldimethylamin-N-oxid-Dihydrat	0 – 5%
80:20 Gew. eines C <sub>18</sub> /C <sub>16</sub> -Gemischs von Octadecyldimethylamin-N-oxid-Dihydrat und Hexadecyldimethylamin-N-oxid-Dihydrat	0 – 4%
70:30 Gew. eines C <sub>18</sub> /C <sub>16</sub> -Gemischs von Octadecylbis(hydroxyethyl)amin-N-oxid-Anhydrat und Hexadecylbis(hydroxyethyl)amin-N-oxid-Anhydrat	0 – 5%
C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> -Alkylethoxysulfat mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 3	0 – 10%
C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> -Alkylethoxysulfat mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 3	0 – 5%
C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> -ethoxylierter Alkohol mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 12	0 – 5%
Ein Gemisch von C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> -ethoxylierten Alkoholen mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 9	0 – 6,5%
Ein Gemisch von C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> -ethoxylierten Alkoholen mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 30	0 – 4%
Natriumdisilicat	0 – 33%
Natriumtripolyphosphat	0 – 46%
Natriumcitrat	0 – 28%
Zitronensäure	0 – 29%
Natriumcarbonat	0 – 20%
Natriumperboratmonohydrat	0 – 11,5%
Tetraacetylenethyldiamin (TAED)	0 – 4%
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	0 – 7,5%
Natriumsulfat	0 – 12,5%
Enzyme	0,0001 – 0,1%

## 7) NICHTWÄSSRIGE FLÜSSIGZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Flüssiger nichtionischer oberflächenaktiver Stoff (z. B. Alkoholethoxylate)	2,0 – 10,0%
Alkalimetallsilicat	3,0 – 15,0%
Alkalimetallphosphat	20,0 – 40,0%
Flüssiger Träger, ausgewählt aus höheren Glycolen, Polyglycolen, Polyoxiden, Glycolethern	25,0 – 45,0%
Stabilisator (z. B. Teilester von Phosphorsäure und einem C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> -Alkanol)	0,5 – 7,0%
Schaumunterdrücker (z. B. Silicon)	0 – 1,5%
Enzyme	0,0001 – 0,1%

## 8) NICHTWÄSSRIGE FLÜSSIGGESCHIRRSPÜLZUSAMMENSETZUNG

Flüssiger nichtionischer oberflächenaktiver Stoff (z. B. Alkoholethoxylate)	2,0 – 10,0%
Natriumsilicat	3,0 – 15,0%
Alkalimetallcarbonat	7,0 – 20,0%
Natriumcitrat	0,0 – 1,5%
Stabilisatorsystem (z. B. Gemische aus fein verteiltem Silicon Dialkylpolyglycolethern mit niedrigem Molekulargewicht)	0,5 – 7,0%
Polyacrylatpolymer mit niedrigem Molekulargewicht	5,0 – 15,0%
Tongelverdickungsmittel (z. B. Bentonit)	0,0 – 10,0%
Hydroxypropylcellulosepolymer	0,0 – 0,6%
Enzyme	0,0001 – 0,1%

Flüssiger Träger, ausgewählt aus höheren Glycolen, Polyglycolen, Polyoxiden, Glycolethern	Ausgleich
---	-----------

## 9) THIXOTROPISCHE FLÜSSIGZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> -Festtsäure	0 – 0,5%
Oberflächenaktives Blockcopolymer	1,5 – 15,0%
Natriumcitrat	0 – 12%
Natriumtripolyphosphat	0 – 15%
Natriumcarbonat	0 – 8%
Aluminiumtristearat	0 – 0,1%
Natriumcumolsulfonat	0 – 1,7%
Polyacrylatverdickungsmittel	1,32 – 2,5%
Natriumpolyacrylat	2,4 – 6,0%
Borsäure	0 – 4,0%
Natriumformiat	0 – 0,45%
Calciumformiat	0 – 0,2%
Natriumdecyldiphenyloxiddisulfonat	0 – 4,0%
Monoethanolamin (MEA)	0 – 1,86%
Natriumhydroxid (50%)	1,9 – 9,3%
1,2-Propandiol	0 – 9,4%
Enzyme	0,0001 – 0,1%
Schaumunterdrücker, Farbstoff, Parfums, Wasser	Ausgleich

## 10) FLÜSSIGZUSAMMENSETZUNG FÜR GESCHIRRSPÜLMASCHINEN

Alkoholethoxylat	0 – 20%
Festtsäureestersulfonat	0 – 30%
Natriumdodecylsulfat	0- 20%

Alkylpolyglycosid	0 – 21%
Oleinsäure	0 – 10%
Natriumdisilicatmonohydrat	18 – 33%
Natriumcitratdihydrat	18 – 33%
Natriumstearat	0- 2,5%
Natriumperboratmonohydrat	0 – 13%
Tetraaceylethylendiamin (TAED)	0 – 8%
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	4 – 8%
Enzyme	0,0001 – 0,1%



## 11) FLÜSSIGZUSAMMENSETZUNG, ENTHALTEND GESCHÜTZTE BLEICHTEILCHEN FÜR GESCHIRR-SPÜLMASCHINEN

Natriumsilicat	5 – 10%
Tetrakaliumpyrophosphat	15 – 25%
Natriumtriphosphat	0 – 2%
Kaliumcarbonat	4 – 8%
Geschützte Bleiteilchen, z. B. Chlor	5 – 10%
Polymerverdicker	0,7 – 1,5%
Kaliumhydroxid	0 – 2%
Enzyme	0,0001 – 0,1%
Wasser	Ausgleich

**[0382]** 12) Geschirrspülzusammensetzungen für Maschinen, wie in 1), 2), 3), 4), 6) und 10) beschrieben, wobei Perborat mit Percarbonat ersetzt ist.

**[0383]** 13) Geschirrspülzusammensetzungen für Maschinen, wie in 1)–6) beschrieben, die zusätzlich einen Mangankatalysator enthalten. Bei diesem Mangankatalysator kann es sich z. B. um eine der Verbindungen, beschrieben in „Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching“, Nature 369, 1994, S. 637–639, handeln.

**[0384]** Weiterhin kann das lipolytische Erstwaschenzym der Erfindung in Weichmacherzusammensetzungen verwendet werden:

**[0385]** Das lipolytische Enzym der Erfindung kann in Gewebeweichmachern, z. B. wie in Surfactant and Consumer Products, herausgegeben von J. Falbe, 1987, S. 295–296; Tenside Surfactants Detergents, 30 (1993), 6, S. 394–399; JAOCS, Bd. 61 (1984), 2, S. 367–376; EP 517 762; EP 123 400; WO 92/19714; WO 93/19147; US 5,082,578; EP 494 769; EP 544 493; EP 543 562; US 5,235,082; EP 568 297; EP 570 237 beschrieben, verwendet werden.

## MATERIALIEN UND VERFAHREN

## Lipaseaktivität (LU)

**[0386]** Ein Substrat für Lipase wurde durch Emulgieren von Glycerintributyrat (MERCK) unter Verwendung von Gummi Arabicum als Emulgator hergestellt. Die Lipaseaktivität wird bei einem pH-Wert von 7 unter Verwendung von pH-Stat-Verfahren getestet. Eine Lipaseaktivitätseinheit (LU) ist als die Menge definiert, die zum Freisetzen von einem Mikromol Fettsäure pro Minute benötigt wird.

## Stämme und Plasmide

**[0387]** *Humicola lanuginosa* DSM 4109, erhältlich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig, Deutschland (EP 305 216); *Saccharomyces cerevisiae* YNG318:MATa Dpep4[cir<sup>+</sup>]ura3-52, leu2-D2, his 4-539; *Aspergillus oryzae* IFO4177; *A. oryzae* A1560-T40, ein an Protease mangelndes Derivat von *A. oryzae* IFO 4177 (WO 91/17243); *A. oryzae* JaL 125: *Aspergillus oryzae* IFO 4177, erhältlich von Institute for Fermentation, Osaka; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-ku, Osaka, Japan, mit dem alkalischen Protease-Gen mit der Bezeichnung „alp“ (beschrieben von Murakami K et al., (1991), Agric. Biol. Chem. 55, S. 2807–2811), deletiert durch einen Schritt eines Genersatzverfahrens (beschrieben von G. May in „Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi“ (1992), S. 1–25, Hrsg. J. R. Kinghorn und G. Turner; Blackie Academic and Professional) unter Verwendung des pyrG-Gens von *A. oryzae* als Markierung; *Absidia reflexa* ATCC 44896 ist erhältlich von ATCC (American Type Culture Collection, 12301, Parklawn Drive,

Rockville, Maryland 20852, USA) als *Absidia reflexa* ATTC 44896 und von IFO (Institute for Fermentation, 17-85 Jusohorrmachi 2-chomee, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan) als *Absidia reflexa* IFO 5874, wie beschrieben in WO 96/113578 (Novo Nordisk A/S).

Hefezelle YPH499 (Stratagene)

*E. coli* DH10B (Gibco)

pTiK04: konstruiert aus pJSO37, einschließlich des reifen Lipase-Gens NL 127

Ab. reflexa mit einer SPIRR-kodierenden Verlängerung stromaufwärts zum Anfang des Lipase-Gens.

pTiK05: als pTiK04 ohne die SPIRR-Verlängerung

pTiK06: pTiK04 mit der MFα1-Signalsequenz

pTiK07: pTiK05 mit der MFα1-Signalsequenz

pYESHL ist ein Schiffchenvektor von Hefe von *E. coli*, der einen geringen Gehalt des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* in Hefe exprimiert. Insbesondere ist pYESHL ein Derivat von pYES2, in welches der GAL1-Promotor ausgeschnitten wurde und das lipolytische Enzym-Gen von *N. lanuginosa* und der TPI-Promotor (Triosephosphatisomerase) von *S. cerevisiae* (Alber, T. und Kawasaki, G., J. Mol. Appl. Genet. 1, 419-434 (1982) zwischen die SphI- und XbaI-Stellen geklont wurde. Eine Restriktionsabbildung von pYESHL ist in [Abb. 1](#) dargestellt.

pJSO37 (Expressionsplasmid von *S. cerevisiae*) (J. S. Okkels, (1996) „A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. Recombinant DNA Biotechnology III: The Integration of Biological and Engineering Sciences“, Bd. 782 von Annals of the New York Academy of Sciences). Spezieller ist das Expressionsplasmid pJSO37 von pYES 2.0 durch Ersetzen des induzierbaren GAL1-Promotors von pYES 2.0 mit dem konstituierend exprimierten TPI-Promotor (Triosephosphatisomerase) von *Saccharomyces cerevisiae* (Albert und Kawasaki, (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1, 419-434) und Deletieren des URA3-Promotors abgeleitet. Eine Restriktionsabbildung von pJSO37 ist in [Abb. 6](#) dargestellt.

pYES 2.0 (Invitrogen Corp., UK)

P960 Expressionsplasmid von *A. oryzae* (beschrieben in EP 305 21 6)

PUC19 (Yanish-Perron et al. (1985) Gene 33, 103-119)

PHD414 (Expressionsvektor von *Aspergillus*, bei welchem es sich um ein Derivat des in EP 238 023 beschriebenen Plasmids p775 handelt. Die Konstruktion von pHD414 ist ferner in WO 93/11249 beschrieben.

PJVi245 (siehe [Abb. 8](#))

PCaHj383 (siehe [Abb. 8](#))

PCaHj385 (siehe [Abb. 8](#))

#### Filtertest mit geringem Calcium

##### Verfahren

1. SC-Ura-Replikationsplatten (nützlich zum Selektieren von Stämmen, die einen Expressionsvektor tragen) mit einem ersten Proteinbindungsfiler (Nylonmembran) und einem zweiten Niedrigproteinbindungsfiler (Celluloseacetat) auf dem oberen Teil werden bereitgestellt.
2. Hefezellen, enthaltend ein lipolytisches Stammenzym-Gen oder ein fragliches mutiertes lipolytisches Enzym, werden auf den Doppelfilter gespült und für eine Dauer von 2 bis 3 Tagen bei 30°C inkubiert.
3. Die Kolonien werden durch Überführen des oberen Filters auf eine neue Platte auf dem oberen Filter gehalten.
4. Der Proteinbindungsfiler wird auf eine leere Petrischale entfernt.
5. Eine Agaroselösung, umfassend eine Olivenöl-Emulsion (2% P. V. A.: Olivenöl = 3 : 1), Brilliant Green (Indikator, 0,004%), 100 mM Tris-Puffer pH9 und EDTA (Endkonzentration 5 mM), wird auf den Bodenfilter gegossen, so dass lipolytische Aktivität exprimierende Kolonien in Form von blaugrünen Flecken identifiziert werden.
6. Die in Schritt 5 gefundenen Kolonien mit einer herabgesetzten Abhängigkeit von Calcium, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, werden identifiziert.

#### Dobanol® 25-7-Filtertest

**[0388]** Das Screenen nach verbesserter Toleranz gegenüber einer Detergenzkomponente wird unter Verwendung eines Filtertests, entsprechend dem vorstehenden, außer der Tatsache, dass die in 5) definierte Lösung ferner 0,02% Dobanol® 25-7 umfasst, durchgeführt.

Ein alternativer Screeningtest lautet wie folgt

1. SC-Ura-Platten (die zum Selektieren von einen Expressionsvektor tragenden Stämmen nützlich sind) werden mit einem ersten Proteinbindungsfilter (z. B. Nylon), gefolgt von einem Nichtproteinbindungsfilter (z. B. Celluloseacetat) auf dem oberen Teil bereitgestellt.
2. Die ein Stammlipase-Gen oder ein mutiertes Lipase-Gen enthaltenden Zellen werden auf den Filter gesprüht und es wird für eine Dauer von 3 bis 4 Tagen bei 30°C inkubiert.
3. Die Kolonien werden auf dem oberen Filter durch Überführen des oberen Filters auf eine neue Platte gehalten.
4. Der Proteinbindungsfilter wird in eine Petrischale, enthaltend eine Agaroselösung, umfassend eine Olivenöl-Emulsion (2% P. V. A.: Olivenöl = 2 : 1), Brilliant Green (Indikator, 0,004%), 100 mM Tris-Puffer pH10 und das Detergenz oder die Detergenzkomponente, z. B. PCS-Platten, entfernt. Der Proteinbindungsfilter sollte so aufgebaut sein, dass die Kolonieseite der Screeningplatte gegenüberliegt.
5. Kolonien, die Lipase-Aktivität exprimieren, werden in Form von in Schritt 4) gefundenen blaugrünen Flecken identifiziert.

**[0389]** In einer anderen Ausführungsform kann der Nichtproteinbindungsfilter (oder Proteinbindungsfilter), der die Hefekolonien trägt, direkt auf der Screeningplatte verwendet werden.

### Konstruktion von zufällig mutagenisierten Genbanken

#### a) Grundprinzipien und Mathematik des Aufbaus von zufällig mutagenisierten Genbanken

**[0390]** Das Gesamtgrundprinzip für die Zufallsmutagenese ist es, die Evolution der Natur nachzuahmen, in welcher eine geringe kontinuierliche Mutagenese mit einer kontinuierlichen Selektion nach einem besseren Mutanten, der dann weiter mutagenisiert wird, gekoppelt ist. Gleichermaßen wurden die in der Literatur beschriebenen gegenwärtigen Evolutionsstudien in vitro mit aufeinander folgenden Mutageneserunden unter Erhöhung des Auswahldrucks durchgeführt (für eine Übersicht siehe Joyce 1992). Wir passten dies unter Verwendung des wt-Gens in den ersten Mutageneserunden an. Verbesserte Varianten werden dann in den nächsten Mutageneserunden verwendet (zum Verbessern durch kleine Schritte). Wir screenen unter mit der Wäsche verbundenen Bedingungen, die nur zum Herausfinden der wt-Enzym-Aktivität oder verbesserten Variantenaktivität ausreichend sind. Dies bedeutet, dass wir die Strenge des Screenens erhöhten, als immer bessere Varianten isoliert wurden.

**[0391]** Zur Erhöhung der Anzahl an Veränderungen und zum Erhöhen der Wahrscheinlichkeit des Findens von verbesserten Varianten wurde auch eine lokalisierte Zufallsmutagenese durchgeführt. Wichtige Regionen, die aus der Lipolasestruktur gefolgert wurden und aus der zielgerichteten Mutagenese resultierten, wurden selektiert. Zum Beispiel wurde die gesamte Lipidkontaktzone, insbesondere die Abdeckregion und die Abdeckkontaktregionen als zur Verbesserung wichtig befunden. Die Lipidkontaktzone entspricht 7 Regionen auf dem Gen, die mutiert wurden. Kombinationen der Regionen wurden ebenso durchgeführt.

#### b) Zufallsmutagenese eines gesamten lipolytischen Enzymkodierungs-Gens

**[0392]** Das Plasmid pYESHL wird für eine Dauer von 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 12 M Ameisensäure behandelt. Das erhaltene, das lipolytische Enzym kodierende Gen wird dann von dem mit Ameisensäure behandelten Plasmid unter Verwendung von PCR unter mutagenen Bedingungen (0,5 mM MnCl<sub>2</sub> und 1/5 der normalen Menge von ATP, siehe z. B. Leung et al., 1989) amplifiziert. Es ist zu erwarten, dass diese Behandlung einen breiten Bereich an Mutationen liefert, da Ameisensäure hauptsächlich Transversionen und PCR-gebildete Mutationen hauptsächlich Transitionen liefert.

**[0393]** Die erhaltenen PCR-Fragmente werden entweder durch doppelte Rekombination (Muhlrad et al., 1992) in vivo in den Schiffchenvektor oder durch Aufschluss oder Bindung in den Schiffchenvektor und Transformation von E. coli geklont.

**[0394]** Acht zufällig aufgenommene Klone wurden sequenziert, und es wurde gefunden, dass sie durchschnittlich 2–3 Mutationen – sowohl Transversion als auch Transitionen – enthielten.

**[0395]** Durch Verwendung dieses Verfahrens wurden 7 Genbanken hergestellt, die 10.000 bis 140.000 Klone enthielten.

## c) Lokalisierte Zufallsmutagenese

**[0396]** Ein mutagener Primer (Oligonukleotid) wird synthetisiert, der dem zu mutagenisierenden Teil der DNA-Sequenz entspricht, außer, dass das (die) Nukleotid(e) dem (den) zu mutagenisierenden Aminosäure-Kodon(s) entspricht (entsprechen). Anschließend wird der erhaltene mutagene Primer in einer PCR-Reaktion mit einem geeigneten Gegen-Primer verwendet. Das erhaltene PCR-Fragment wird gereinigt und aufgeschlossen und in den Schiffchenvektor geklont. In einer anderen Ausführungsform und, falls nötig, wird das erhaltene PCR-Fragment in einer zweiten PCR-Reaktion als Primer mit einem zweiten geeigneten Gegen-Primer verwendet, so dass der Aufschluss und das Klonen der mutagenisierten Region in den Schiffchenvektor gewährt wird. Die PCR-Reaktionen werden unter normalen Bedingungen durchgeführt.

**[0397]** Beim Synthetisieren der Oligonukleotide, die für die lokalisierte Zufallsmutagenese verwendet werden, ist eine Berechnung des Aufpuschungsgrads zum Bestimmen der Mutagenesequenz wichtig. Die Frequenz der Oligonukleotid-Auswechslung kann unter Verwendung der binomischen Verteilungsformel berechnet werden:

$$\frac{N!}{i!(N-i)!}$$

$$P(i) = \frac{N!}{i!(N-i)!} \times p^i \times (1-p)^{N-i}$$

wobei N = die Anzahl an aufgepuschten Oligonukleotiden, p = die Fraktion von Nicht-wt-Nukleotiden; i = die Anzahl an Nukleotid-Auswechslungen; P(i) = die Wahrscheinlichkeit für die i-Anzahl an Auswechslungen. Es ist schwierig, die genaue Anzahl an AS-Auswechslungen aus der Anzahl an Nukleotid-Auswechslungen zu berechnen, da es sich bei der dritten Position in einem Kodon für den Hauptteil der AS sich um zwei oder alle vier Nukleotide ohne Ändern der AS handeln kann. Gleiches gilt für den Fall der ersten oder zweiten Position für die drei AS mit 6 Kodons. Zur Bestimmung der Anzahl von AS-Auswechslung ist eine Monte-Carlo-Simulation geeigneter. Zum Beispiel führt das Programm, genannt RAMHA (beschrieben in Siderovski und Mak 1993) eine solche Simulation durch. Dieses Programm simuliert die Synthese z. B. von 10.000 Oligonukleotiden mit der gewünschten Aufpuschung und berechnet die Frequenz von 0 bis n-AS-Auswechslungen.

## Ein Aufpusch-Beispiel

**[0398]** Bei der Beziehung zwischen dem Aufpuschen und den AS-Auswechslungen in einer Region von 13 Kodons handelt es sich um Folgendes (berechnet unter Verwendung einer Monte-Carlo-Simulation):

Pro- zent Auf- pusch- grad	0	1	2	3	4	5	6	7
Muta- tionen								
5%	0,2	0,35	0,27	0,13	0,05	0	0	0
10%	0,04	0,13	0,24	0,25	0,19	0,11	0,05	0
15%	0,005	0,03	0,10	0,20	0,24	0,23	0,13	0,07

**[0399]** Die mögliche Anzahl an Kombination von AS-Auswechslungen für 13 AS kann unter Verwendung der folgenden Formel berechnet werden:

y!

 $20^x$  $N = x!(y-x)!$  y = Anzahl an AS mutagenisiert

x = Anzahl an AS-Auswechslungen

---

 1 AS-Auswechslung in 13 AS = 260 mögliche Auswechslungen

2 - - - = 31200 - Kombinationen

3 - - - =  $2.3 \times 10^6$  - -

**[0400]** Daraus folgt, dass beim Screenen von z. B. 100.000 Kolonien einer Genbank, die mit 10% in 13 Kodons aufgepuscht wurde, der Erhalt der in der vorstehenden Tabelle dargestellten Verteilung ein Screenen von etwa 13.000 mit einer AS-Auswechslung (13%) bedeutet. Es gibt jedoch nur 260 mögliche Auswechslungen einer AS, wobei eine so große Anzahl derselben Auswechslungen einer AS gescreent wurden. Ein höheres Aufpuschen z. B. von 15% (in der vorstehenden Tabelle) ergibt weniger Auswechslungen einer AS (etwa 3%), jedoch werden die Auswechslungen von zwei AS auf einen Grad (10%) vermindert, der kein Screenen der 31.200 möglichen Kombinationen mit einer Screen-Kapazität um 100.000 ermöglicht.

**[0401]** Schließlich werden die AS-Auswechslungen durch den Ursprung der wt-Aminosäure verzerrt. Zum Beispiel braucht man nur eine Nukleotid-Auswechslung zum Ändern von Glu in Ala, jedoch drei von Glu in Phe. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für die AS-Auswechslungen, die zwei oder drei Nukleotid-Auswechslungen geringer ist als für diejenigen, die eine Nukleotid-Auswechslung erfordern. Deshalb erlaubten wir in manchen Fällen mehr als eine AS an Positionen, in welchen wir wussten, dass es möglich ist. Wir wählten immer G/C an der dritten Position der Kodons mit 4 oder 6 Kodons aus. Dies vermindert die Verzerrung des wt-Kodons und auch die Wahrscheinlichkeit eines Stopp-Kodons (von 4,7% auf 3,1%, wenn vollständig verschlüsselt). Für eine Berechnung der Wahrscheinlichkeit, ob eine vorgegebene Poolgröße, die wahrscheinlichsten und weniger wahrscheinlichen Ersatzmutanten enthält, siehe Palzkill et al. 1994.

#### Berechnung der Populations-Verteilung beim Screenen von amplifizierten Genbanken

**[0402]** Eine andere Erwägung kann berücksichtigt werden. Die meisten der hier dargestellten Genbanken werden in E. coli amplifiziert, bevor sie in Hefe transformiert werden. Dies bedeutet, dass eine Wahrscheinlichkeit zum Screenen derselben amplifizierten Klons von mehr als einmal vorliegt – siehe Kasten I.

---

**Kasten I**

---

Screenen nach einer amplifizierten zufällig mutagenisierten Genbank von z. B. 100.000 verschiedenen Klonen:

64% der Genbank werden gescreent, wenn 100,000 Kolonien gescreent wurden.

90% - - - - - 230,000 - .

95% - - - - - 300,000 - .

Dies setzt voraus, dass alle 100.000 Klone gleichmäßig amplifiziert werden. Die folgende Formel kann zum Berechnen dessen verwendet werden:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-1/D)}$$

N ist die Anzahl an gescreenten Klonen, P ist die Fraktion von verschiedenen gescreenten Klonen und D ist die Gesamtzahl an verschiedenen Klonen.

---

**Anti-Terminierungs-Strategien**

**[0403]** Zum Vermeiden von unreifen, abgeschnittenen Proteinen sollten unsinnige Mutationen in den Kodons mit einer Möglichkeit zur Bildung von Stopp-Kodons vermieden werden. Für Kodons, die mit alternativen Kodons ohne die Möglichkeit der Bildung von Stopp-Kodons substituiert werden können, können die folgenden Strategien verwendet werden.

Gly: GGA	GG(G,C,T)
Leu: TT(A,G)	CTN
Arg: (A,C)GA	(A,C)GG oder CG(C,T)
Ser: TC(A,G)	TC(C,T) oder AG(C,T)

**[0404]** Die folgenden AS können jedoch nur mit Kodons spezifiziert werden, die eine Stopp-Kodon-Möglichkeit zeigen: Cys, Glu, Lys, Gln, Trp und Tyr. Deshalb kann nur die Aufpuschung als Abgrenzung des zufälligen Ersatzes von Nukleotiden, die Stopp-Kodons herstellen, bezeichnet werden. Zum Beispiel:

Glu (ähnlich wie Lys und Gln): (90% G/5%C,A) (90% A/3.3%C,G,T) (90% A/3.3%C,G,T). Kein TAA oder TAG = STOPP.

Tyr (ähnlich zu Cys): (90% T/3.3%A,C,G) (90% A/3.3%C,G,T) (90% C/10%T). Kein TAG oder TAA = STOPP.

Trp: (90% T/3.3%A,C,G) (90% G/5%C,T) (90% G/5%C,T). Kein TGA oder TAG = STOPP.

**[0405]** Eine solche Strategie beseitigt natürlich bestimmte AS-Auswechslungen. Unter Verwendung dieser Strategien wird die Anzahl an unreifen, abgeschnittenen Proteinen drastisch verringert.

In vivo Rekombination von Lipasevarianten von *Humicola lanuginosa* (Gen-Schieben)

**[0406]** Die DNA-Sequenzen einer Anzahl von Lipasevarianten von *Humicola lanuginosa* können in vivo im selben Gemisch rekombiniert werden.

**[0407]** Vektoren werden aus den Lipasevarianten durch Bindung in den Hefe-Expressionsvektor pJSO37 hergestellt. Alle Vektoren werden mit NruI aufgeschnitten.

**[0408]** Die DNA-Fragmente aller homologer DNA-Sequenzen werden durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Standardverfahren hergestellt.

**[0409]** Die DNA-Fragmente und die geöffneten Vektoren werden gemischt und in die Hefe YNG318 von *Saccharomyces cerevisiae* durch Standardverfahren transformiert. Die Rekombinationswirtszelle wird wie vorstehend beschrieben gezüchtet und gescreent. Auftretende Transformanten werden isoliert und unter Verwendung der vorstehend beschriebenen auf verbesserte Waschleistung Filtertestverfahren getestet.

**[0410]** Bei positiven Transformanten handelt es sich um Varianten mit verbesserter Waschleistung, die aus dem Gen-Schieben von homologen DNA-Sequenzen resultieren.

#### Zielgerichtete in vitro Mutagenese eines lipolytischen Enzyms

**[0411]** Ein Zugang, der zum Einbringen von Mutationen in das lipolytische Enzymgen verwendet werden kann, ist von Nelson & Long, *Analytical Biochemistry*, 180, 147–151 (1989) beschrieben. Er beinhaltet die 3-stufige Bildung eines PCR-(Polymerase-Kettenreaktion)-Fragments, das die gewünschte Mutation enthält, die unter Verwendung eines chemisch synthetisierten DNA-Strangs wie einer der Primer in die PCR-Reaktionen eingebracht wird. Die Konstruktion eines PCR-Fragments kann gemäß auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren durchgeführt werden. Aus dem PCR-gebildeten Fragment kann ein die Mutation tragendes DNA-Fragment durch Spaltung mit Restriktionsenzymen isoliert und wieder in das Expressionsplasmid eingefügt werden. In den [Abb. 4](#) und [Abb. 5](#) ist das Verfahren weiter umrissen.

**[0412]** Ein alternatives Verfahren zur Konstruktion von Varianten eines lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* beinhaltet die Verwendung des im Handel erhältlichen Bausatzes Bausatz für Chamäleon-Doppelstrang-zielgerichtete-Mutagenese gemäß den Anleitungen des Herstellers.

**[0413]** Das das fragliche lipolytische Enzym kodierende Gen wird in das Plasmid pHD414 eingefügt. Gemäß den Anleitungen des Herstellers wird die Scal-Stelle des Ampicillins von pHD414 in eine MluI-Stelle unter Verwendung des folgenden Themas geändert:

**Primer 3:** AGAAATCGGGTATCCTTTCAG

**[0414]** Der das fragliche lipolytische Gen umfassende pHD414-Vektor wird dann als Template zur DNA-Polymerase und für die Oligos 7258 und 7770 verwendet, wobei die Sequenzen davon in den nachstehenden Beispielen offenbart sind. Die gewünschte Mutation (z. B. der N-Terminus des lipolytischen Gens) wird in das fragliche lipolytische Gen durch Addition eines geeigneten Oligos, umfassend die gewünschte Mutation, eingebracht. Wird eine N-terminale Peptidaddition angebracht, kann sie durch mutierende Kodons der den Pro- oder Präpro-Teil des lipolytischen Stammenzyms kodierenden DNA-Sequenz erzielt werden.

**[0415]** PCR-Reaktionen werden gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

**[0416]** Das DNA-Sequenzieren wurde unter Verwendung des ABI-DNA-Sequenzmodell 373A von Applied Biosystems gemäß dem Protokoll des ABI-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Bausatzes durchgeführt.

#### Expression eines lipolytischen Enzyms von *Humicola lanuginosa* in *Aspergillus oryzae*

**[0417]** Das Klonen eines lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* ist in EP 305 216 beschrieben. Sie beschreibt auch die Expression und Charakterisierung des Enzyms in *A. oryzae*. Das verwendete Expressionsplasmid wird als p960 bezeichnet.

**[0418]** Das in dieser Anmeldung verwendete Expressionsplasmid ist außer mit geringfügigen Modifikationen mit dem p960 direkt an 3' der Lipasekodierungsregion identisch. Die Modifikationen wurden in folgender Weise durchgeführt: p960 wurde mit NruI- und BamHI-Restriktionsenzymen aufgeschlossen. Zwischen diesen beiden Stellen wurde das BamHI/NheI-Fragment von Plasmid pBR322, in welches das NheI-Fragment mit Klenow-Polymerase eingefügt war, geklont, womit Plasmid pAO1 ([Abb. 2](#)) gebildet wurde, das einheitliche BamHI- und NheI-Stellen enthält. Zwischen diesen einheitlichen Stellen wurden BamHI/XbaI-Fragmente von p960 geklont, um pAHL ([Abb. 3](#)) zu erhalten.

Transformation von *Aspergillus oryzae* (allgemeines Verfahren)Transformation von *Aspergillus oryzae* (allgemeines Verfahren)

**[0419]** 100 ml YPD (Sherman et al., (1981), Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) werden mit Sporen von *A. oryzae* beimpft und unter Schütteln für eine Dauer von etwa 24 Stunden inkubiert. Das Myzelium wird durch Filtration durch Miracloth geerntet und mit 200 ml 0,6 M  $\text{MgSO}_4$  gewaschen. Das Myzelium wird in 15 ml 1,2 M  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,8, suspendiert. Die Suspension wird auf Eis gekühlt und 1 ml Puffer, enthaltend 120 mg Novozym® 234, Charge 1687, wird zugesetzt. Nach 5 Minuten wird 1 ml 12 mg/ml BSA (Sigma Typ H25) zugesetzt und die Inkubation unter sanftem Rühren für eine Dauer von 1,5–2,5 Stunden bei 37°C fortgesetzt, bis eine große Anzahl an Protoplasten in einer unter dem Mikroskop betrachteten Probe sichtbar wird.

**[0420]** Die Suspension wird durch Miracloth filtriert, das Filtrat in ein steriles Röhrchen überführt und mit 5 ml 0,6 M Sorbit, 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 überschichtet. Eine Zentrifugation wird für eine Dauer von 15 Minuten bei 1.000 g durchgeführt, und die Protoplasten werden vom oberen Teil des  $\text{MgSO}_4$ -Puffers aufgefangen. 2 Volumen STC (1,2 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) werden der Protoplastsuspension zugesetzt, und das Gemisch wird für eine Dauer von 5 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Das Protoplastpellet wird in 1 ml STC resuspendiert und wieder in Pelletform gebracht. Dies wird wiederholt. Schließlich werden die Protoplasten in 0,2 bis 1 ml STC resuspendiert.

**[0421]** 100 µl Protoplastsuspension werden mit 5 bis 25 µg p3SR2 (ein ein Plasmid tragendes amdS-Gen von *A. nidulans*, beschrieben in Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., Bd. 3, Nr. 8, 1430–1439, August 1983) in 10 µl STC gemischt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur für eine Dauer von 25 Minuten stehengelassen. 0,2 ml 60%-iger PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 werden zugesetzt und vorsichtig gemischt (zweimal), und schließlich werden 0,85 ml derselben Lösung zugesetzt und vorsichtig gemischt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur für eine Dauer von 25 Minuten stehengelassen, bei 2500 g für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 1,2 M Sorbit resuspendiert. Nach einer weiteren Abscheidung werden die Protoplasten zum Hemmen von Hintergrundwachstum auf Minimalplatten (Cove, (1966), Biochem. Biophys. Acta 113, 51–56), enthaltend 1,0 M Saccharose, pH 7,0, 10 mM Acetamid als Stickstoffquelle und 20 mM CsCl gesprüht. Nach Inkubation für eine Dauer von 4 bis 7 Tagen bei 37°C werden Sporen aufgenommen, in sterilem Wasser suspendiert und für einzelne Kolonien aufgesprüht. Dieses Verfahren wird wiederholt und die Sporen einer einzigen Kolonie nach der zweiten Re-Isolation als definierter Transformant aufbewahrt.

Transformation von *A. oryzae* A 1560-T40

**[0422]** Das Plasmid, das eine eine Variante dieser Erfindung kodierende DNA-Sequenz trägt, wird in *Aspergillus oryzae* A1560-T40, einem an Protease mangelnden Derivat von *A. oryzae* IFO 4177 unter Verwendung von Selektion auf Acetamid durch Cotransformation mit pToC 90, beherbergend das amdS-Gen von *A. nidulans* als ein XbaI-Fragment mit 2,7 kb (Corrick et al. (1987), GENE 53, 63–71), auf einen pUC 19-Vektor (Yannisch-Perron et al. (1985), GENE 33, 103–119) transformiert. Die Transformation wird wie in EP 238 023 beschrieben durchgeführt.

## Zufütterungs-Fermentation

**[0423]** Die Zufütterungs-Fermentation wird in einem Medium durchgeführt, das Maltodextrin als Kohlenstoffquelle, Harnstoff als Stickstoffquelle und Hefeextrakt enthält. Die Zufütterungs-Fermentation wird durch Beimpfen einer Schüttelkolben-Kultur mit fraglichen Wirtszellen von *A. oryzae* in einem Medium, umfassend 3,5% der Kohlenstoffquelle und 0,5% der Stickstoffquelle, durchgeführt. Nach 24-stündigem Züchten bei pH 5,0 und 34°C wird die kontinuierliche Zufuhr von zusätzlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen initiiert. Die Kohlenstoffquelle wird als der Beschränkungsfaktor gehalten, und es wird sichergestellt, dass Sauerstoff im Überschuss vorliegt. Die Zufütterungs-Züchtung wird für eine Dauer von 4 Tagen fortgesetzt, wonach die Enzyme durch Zentrifugation, Ultrafiltration, Klärfiltration und Keimfiltration gewonnen werden können. Eine weitere Reinigung kann durch auf dem Fachgebiet bekannte Anionenaustauschchromatographische Verfahren durchgeführt werden.

Reinigung von lipolytischen Enzymvarianten von *H. lanuginosa*, exprimiert in *S. cerevisiae*

**[0424]** Die Fermentationsbrühe wird steril filtriert und Ammoniumacetat (92 g) wird dem Filtrat (1400 ml) zugesetzt, um eine 0,8 M Lösung von Ammoniumacetat zu erhalten. Die Lösung wird auf eine Toyopearl-Bu-



tyl-Säule (XK 16/10) aufgebracht. Die Säule wird mit 0,8 M Ammoniumacetat gewaschen und das lipolytische Enzym in H<sub>2</sub>O mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min eluiert. Fraktionen mit 10 ml werden aufgefangen und die das lipolytische Enzym enthaltenden Fraktionen gemäß der Aktivität im standardmäßigen Lipasetitrationstest gepoolt. Der Lipase-enthaltende Pool wird filtriert und der pH-Wert auf pH 8,5 eingestellt, und dies auf eine Q-Sepharose-Säule (HPQ XK 26/10) aufgebracht. Die Säule wird mit 200 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 gewaschen und das lipolytische Enzym in einem linearen Gradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in 400 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min eluiert. Fraktionen mit 10 ml werden aufgefangen und die Lipase-enthaltenden Fraktionen gemäß der Aktivität im standardmäßigen Lipasetitrationstest gepoolt. Lipaseaktivität enthaltende Fraktionen mit einer Absorption A280/A260 nm von größer als 1,7 werden gepoolt.

Reinigung von lipolytischen Enzymvarianten von *H. lanuginosa* ohne Peptidaddition und exprimiert in *A. oryzae*

**[0425]** Der Fermentationsüberstand der Kultur von *A. oryzae* wird zentrifugiert und die Zelltrümmer verworfen. Der Überstand wird durch einen Milliporenfilter mit 0,45 µm filtriert. Dann wird mit 60% gesättigtem Ammoniumsulfat ausgefällt. Der Niederschlag wird in Wasser gelöst und festes Ammoniumacetat wird auf eine Endkonzentration von 0,8 M zugesetzt. Die Lösung wird auf eine mit 0,8 M Ammoniumacetat voräquilibrierte Butyl-Toyoperal-Säule aufgebracht. Das gebundene Enzym wird mit einem Gradienten unter Verwendung von Wasser und 50% Ethanol als Eluent eluiert.

**[0426]** Enzymaktivität enthaltende Fraktionen werden dann gepoolt und die Leitfähigkeit auf weniger als 5 mSi und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt.

**[0427]** Die Aktivität enthaltenden Pools werden dann auf eine Anionenaustauschsäule (z. B. Hochleistungs-Q-Sepharose®), voräquilibriert mit 25 mM Tris Acetatpuffer, pH 8,5, aufgebracht. Die gebundene Aktivität wird mit einem linearen Salzgradienten unter Verwendung desselben Puffers und 0,5 M Natriumchlorid eluiert. Hochaktives lipolytisches Enzym enthaltende Fraktionen werden gepoolt. Lipaseaktivität enthaltende Fraktionen mit einer Absorption A280/A260 nm von größer als 1,7 werden gepoolt.

#### Versuch zum Testen von Erstwascheffekt

**[0428]** Die Waschleistung von lipolytischen Enzymen wurde in einem Ein-Zyklus-Waschtest, durchgeführt in einem wärmeregulierten Terg-O-Tometer (TOM), gefolgt von ausgebreitetem Trocknen, getestet.

**[0429]** Die Versuchsbedingungen lauteten wie folgt:

Waschlauge: 1000 ml pro Becher;

Textilmuster: 7 Baumwoll-Textilmuster (9 × 9 cm) pro Becher;

Fleck: Schmalz, gefärbt mit Sudan-Red (Sigma) (0,75 mg Sudan-Red/g Schmalz). 50 µl Schmalz/Sudan-Red, erwärmt auf 70°C, wurden auf die Mitte jedes Textilmusters aufgebracht. Nach dem Aufbringen des Flecks wurden die Textilmuster in einem Ofen für eine Dauer von 25 Minuten bei 75°C erwärmt. Sie wurden über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Wasser: 3,2 mM Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (in einem Verhältnis von 5 : 1)

Detergenz: 5 g/l Detergenzzusammensetzung A oder Detergenz B. pH künstlich eingestellt auf 10 durch NaOH.

#### Detergenzzusammensetzung A

0,300 g/l Alkylsulfat (AS; C<sub>14-16</sub>)

0,650 g/l Alkoholethoxylat (AEO; C<sub>12-14</sub>, 6EO)

1,750 g/l Zeolith P

0,145 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

0,020 g/l Sokalan CP5

0,050 g/l CMC (Carboxymethylcellulose)

Gemischt in 3,2 mM Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (5 : 1) in Milli-Q-Wasser, pH 10,2

#### Detergenzzusammensetzung B

**[0430]** Wie Detergenzzusammensetzung A, jedoch zusätzlich enthaltend die folgenden Bleichmittel:

0,900 g/l Natriumcarbonat Peroxyhydrat

0,300 g/l TAED (Tetraacetylenethyldiamin)

**[0431]** Die Konzentration von lipolytischem Enzym (in Detergenzzusammensetzung A sowie B): 0 und 1250 oder 12.500 LU/l

Waschzeit: 20 Minuten

Waschtemperatur: 30°C

Spülen: 15 Minuten in laufendem Leitungswasser

Trocknen: über Nacht bei Raumbedingungen (etwa 20°C, 30 bis 40% RH)

Bewertung: Die Reflexion wurde bei 460 nm gemessen. Danach wurde der Fettbestandteil mit Chloroform in einer Soxhlet-Extraktionsapparatur aus den Textilmustern extrahiert, das Lösungsmittel abdestilliert und die Fettbestandteilmenge, die auf den Textilmustern zurückgelassen wurde, gravimetrisch bestimmt. Die Fettbestandteilmenge kann in einer anderen Ausführungsform unter Verwendung von Dünnschichtchromatographie (DSC)/Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt werden.

**[0432]** Der Prozentgehalt von entferntem Schmalz wird bestimmt als:

1) % Entfernung, definiert als:

[(zurückgebliebenes Fett auf Textilmustern, gewaschen mit Detergenz ohne lipolytisches Enzym) minus (zurückgebliebenes Fett auf Textilmustern, gewaschen mit Detergenz mit lipolytischem Enzym)] geteilt durch (zurückgebliebenes Fett auf Textilmustern, gewaschen mit Detergenz ohne lipolytisches Enzym) und multipliziert mit 100%, oder

2) Deltareflexion (dR), definiert als:

(R(Textilmuster, gewaschen in Detergenz mit Lipase)-R(Textilmuster, gewaschen in Detergenz ohne Lipase)). Die Reflexion (die auch Remission genannt werden kann) wird auf einer Elrepho-2000-Apparatur von Datacolor gemessen, die die Probe mit 2 Xenon-Blitzlampen bestrahlt und die Menge an reflektiertem Licht wird gemessen, so dass vollständig weiß einer 100%-igen Reflexion und vollständig schwarz einer 0%-igen Reflexion entspricht.

#### Medien und Substrate

YPD: 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, H<sub>2</sub>O auf 810 ml. Autoklaviert, Zugabe von 90 ml 20%iger Glucose (steril filtriert).

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 Liter Wasser.

FG4-Medium: 3% Sojamehl, 3% Maltodextrin, 1% Pepton, pH eingestellt auf 7,0 mit 4 M NaOH.

SC-Ura-Platten: 10% 10 × Basalsalze ohne Aminosäuren, 0,5% Casaminoäuren, 0,02% Threonin, 0,01% Tryptophan, 2% Glucose, 1,5% Agar. 10 × Basalsalze ohne Aminosäuren: 60 g NaOH, 66,8 g Hefe-Stickstoffbase, ohne Aminosäuren (Difco) und 100 g Bersteinsäure in 1 Liter Wasser.

Litex Agarose HSB 2000 (CAT NO: F90472)

BG-Reagens: 4 mg/ml Brilliant Green (BG), gelöst in Wasser

Substrat 1:

10 ml Olivenöl (Sigma CAT NO. 0-1500)

20 ml 2%iger Polyvinylalkohol (PVA)

**[0433]** Das Substrat wird für eine Dauer von 15 bis 20 Minuten homogenisiert.

#### PCS-Detergenz

10 g/l:

SDS	0,52 g
Dobanol 25-3	0,60 g
Dobanol 25-1	0,58 g
NaBO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	1,50 g

**[0434]** Auf ein Volumen von 1 Liter 0,1 M Tris-Puffer (pH 9) und weiter verdünnt mit dem Tris-Puffer zur Verdopplung der Konzentration der gewünschten Konzentration auf den PCS-Platten.

PCS-Platten  
Lösung zur Herstellung von PCS-Platten

Brilliant Green (BG-Reagens)	10 ml
Substrat 1	24 ml
PCS-Detergenz	500 ml
2% Agarose (in TRIS-Puffer (pH 9))	500 ml
Lipasesubstrat (Sigma Katalognr. 800-1)	
Brilliant Green (Merck, Art. Nr. 1.01310)	

BEISIPELE

BEISPIEL 1

Konstruktion von zufälligen lipolytischen Enzymvarianten

**[0435]** Zufällig mutagenisierte Genbanken des vollständigen lipolytischen Enzymgens von *H. lanuginosa* und der Aminosäuren (AS) 91–97 und 206–211 davon wurden wie vorstehend in Materialien und Verfahren beschrieben hergestellt.

**[0436]** Die Aminosäureregionen 91–97 und 206–211 wurden für die erste Runde der lokalisierten Mutagenese ausgewählt, da diese Regionen für die Waschleistung als wichtig befunden wurden. Region 91–97 ist ein Teil der Abdeckregion des Enzyms und Region 206–211 bildet einen Teil der hydrophoben Spalte des Enzyms.

**[0437]** Ein Oligonukleotid wurde für jede dieser Regionen synthetisiert, umfassend 93% der Nukleotide vom Wildtyp und 2,33% jedes der anderen drei Nukleotide an Aminosäurekodons, von welchen die Mutagenisierung gewünscht wurde. Womöglich ohne Ändern der Aminosäure wurde das dritte Nukleotid (die Schwenkbase) in Kodons mit 50% G/50% C synthetisiert, um eine größere Wahrscheinlichkeit für die Änderungen in Aminosäuren mit einem oder zwei Kodons zu erhalten. Die Zusammensetzung des mutagenen Oligonukleotids von Region 91–97 ist in Tabelle 1 dargestellt.

**[0438]** Unter Verwendung dieses Oligonukleotids wird eine berechnete Mutationsfrequenz von etwa 65 bis 70% in der Genbank für eine in das lipolytische Stammenzym eingebrachte Aminosäure-Änderung erhalten. Die Mutationsfrequenz von zwei oder mehreren eingebrachten Aminosäure-Änderungen betrug weniger als 35%. Diese niedrige Mutationsfrequenz wird ausgewählt, um zu gewährleisten, dass die beobachteten Aminosäure-Änderungen in positive Klonen beim Verbessern des Enzyms beteiligt und nicht nur „neutrale“ Änderungen aufgrund einer hohen Mutationsfrequenz sind.

**[0439]** Die mutagenen Primer wurden in einer PCR-Reaktion mit einem geeigneten Gegen-Primer verwendet. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden gereinigt und, im Fall von Region 206–211 aufgeschlossen und in den Schiffchenvektor geklont. Im Fall von Region 91–97 wurde das PCR-Fragment in einer zweiten PCR-Reaktion als Primer ohne zweiten geeigneten Gegen-Primer verwendet. Dieser Schritt war nötig, um die mutagenisierte Region in den Schiffchenvektor aufschließen und klonen zu können.

**[0440]** Genbanken von Region 91–97 und von Region 206–211 wurden hergestellt, enthaltend 10.000 bis 80.000 Klone/Genbank. Die meisten Kolonien waren positiv (mehr als 90%), als sie unter Bedingungen, in welchen die Stammlipase positiv war, d. h. Lipase-Aktivität zeigte, überprüft wurden. Positive Reaktion wurde in einem Filtertest mit 2,5 mM Ca (statt 5 mM EGTA) bestimmt.

**[0441]** 450.000 Kolonien wurden unter den verschiedenen Genbanken unter Verwendung der Dobanol® 25-7- und Niedercalcium-Tests, vorstehend beschrieben in Materialien und Verfahren, gescreent. 25 Niedercalcium-Positive von der AS 91–97-Genbank (Abdeckregion) und 12 Dobanol® 25-7-Positive von den gesamten Genbanken wurden isoliert. Vierzehn der Niedercalcium-Positive aus der Mutagenese von AS 91–97 wurden sequenziert.

**[0442]** Die drei anderen Mutationen (in Kodon 83, 103, 145), außerhalb der mutagenisierten Region können durch PCR-Fehleinbringung erklärt werden, obwohl die Mutation von S83T eine Transversion ist, die für PCR-Fehleinbringungen sehr unüblich ist.

## Sequenz

<b>5'</b>	5	C	G
T	5	C	<b>3'</b>
T	7	A	
A	8	G	<u>Flasche 5:</u> 93% A; 2,33% C; 2,33% G und 2,33% T
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	<u>Flasche 6:</u> 93% C; 2,33% A; 2,33% G und 2,33% T
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	<u>Flasche 7:</u> 93% G; 2,33% A; 2,33% C und 2,33% T
5	6	G	
7	G	A	
8	AA	A	
6	T	C	<u>Flasche 8:</u> 93% T; 2,33% A; 2,33% C und 2,33% G
7			

**[0443]** Tabelle 1: Veranschaulichung der Konstruktion von Oligonukleotiden (SEQ ID Nr. 4), die für die lokalisierte Zufallsmutagenese von Aminosäuren 91–97 des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* verwendet wurden. Die in der Sequenz dargestellte Zahl bedeutet die Flaschen der Zusammensetzung, die rechts von der Sequenz erscheinen.

Tabelle 2

Stamm- nummer	Variant- typ					
59	I		G91A	N94K		D96A
60	II	S83T		N94K		D96N
61	II	S83T		N94K		D96N
62	III		E87K			D96V
63	IV		E87K	G91A		D96V
64	II	S83T		N94K		D96N
65	III		E87K			D96V
67	V			N94K	F95L	D96H
69	V			N94K	F95L	D96H
71	III		E87K			D96V
72	II	S83T		N94K		D96N

**[0444]** Tabelle 2: Stammnummer bedeutet die ursprünglich aufgenommenen Klone, die in den Expressionsvektor pAHL von *Aspergillus* geklont wurden. Varianttyp bedeutet identische Klone, die wahrscheinlich während der Amplifikation der zufällig mutagenisierten Genbank angehoben wurde. Varianttypen I und II sind in 0,01% Dobanol® 25-7 aktiv, während der Rest wie der Wildtyp inaktiv ist.

Tabelle 3

Stamm- nummer	Variant- typ	DNA-Sequenz (Aminosäure-Zahl über der Sequenz)										
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
wt		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I										C	
60	II		A								C	
61	II		A								C	
62	III						A				C	
63	IV						A				C	
64	II		A								C	
65	III						A				C	
67	V										C	
52/68	wt											
53	wt											
69	V										C	
71	III						A				C	
72	II		A								C	
73	VI											

		93	94	95	96	97	98	99	100	-103	-145
wt		CTT	AAC	TTC	GAC	TTG	AAA	GAA	ATA	-ATT	-CAT
59	I	G	G		C						
60	II	G	G		A						
61	II	G	G		A						
62	III				T						
63	IV				C					C	C
64	II	G	G		A						
65	III	G			T						
67	V		A	C	A	C					
52/68	wt										
53	wt										
69	V		A	C	A	C					
71	III	G			T						
72	II	G	A		A						
73	VI				A	?					

[0445] Tabelle 3: Die Sequenz vom Wildtyp ist an der oberen Linie dargestellt. Nur Nukleotide, die sich von wt unterschieden, sind an den Variantsequenzen aufgeschrieben. Die Base von Kodon 91 und 93 wurde mit 1 : 1 C/T bzw. T/G aufgepuscht. Sonst wurden die Nukleotide an Kodon 91–97 unter Verwendung von 93 Gew.-% und 2,33% der drei anderen Nukleotide aufgepuscht.

Ergebnisse aus dem Screenen einer zufällig mutagenisierten Genbank von AS 85–99 (der Abdeckregion) mit einem Aufpuschen auf der Basis der Ergebnisse, die von Positiven aus der Zufallsmutagenese von AS 91–97 erhalten wurden

#### Konstruktion der zufällig mutagenisierten Genbank

#### Hintergrund

[0446] Fünf verschiedene Typen von stark positiven Mutanten wurden beim Screenen der ersten Genbank der Abdeckregion (AS 91–97, siehe vorstehendes Beispiel) gefunden. D96 wurde in A, V, N oder H geändert und eine Aminosäure-Änderung E87K, G91A und N94K wurde in zwei bis drei unabhängigen Mutanten in Kombination mit einer Änderung von D96 gefunden, was ihre Wichtigkeit für die Unabhängigkeit von Calcium der Lipolase anzeigte. Da diese Mutationen in Bezug auf niedriger Calcium/Dobanol-Aktivität, verglichen mit wt in verschiedenen Tests, verbessert wurden, wurden sie als Ausgangspunkt in einer zweiten Zufallsmutagenese der gesamten Abdeckregion verwendet.

## Lokalisierte Zufallsmutagenese

**[0447]** Die Aminosäureregion AS 85–99 + 83S/7 wurde wie folgt zufällig mutagenisiert.

**[0448]** Aufpusch-Schema: S83 – 50% S/50% T; E87 – 93% K/7%X; G91 – 93% A/7% X; N94 – 50% K/50% N; D96 – 100%X; der Rest war 93% wt/7% X (die Prozentgehalte bedeuten das Aufpuschen der Kodons am Nukleotidgrad (siehe Sequenz des Oligos). Der theoretische Prozentgehalt der verschiedenen Aminosäurekodons, die aus diesen Aufpuschungen resultierten, können unter Verwendung eines Computerprogramms des Fachgebiets berechnet werden). Womöglich ohne Änderung der Aminosäure wurde das dritte Oligonukleotid (die Schwenkbase) in Kodons mit 50% G/50% C synthetisiert, um eine größere Wahrscheinlichkeit für Änderungen in Aminosäuren mit nur 1 oder 2 Kodons zu erhalten. Die Zusammensetzung des mutagenen Oligonukleotids ist in SEQ ID Nr. Oligo 2 (SEQ ID Nr. 6) dargestellt. Die nicht-mutagenisierte Nukleotidregion wurde unter Verwendung des Oligo-Programms unter Optimierung auf Stabilität und keiner sekundären Struktur ausgewählt.

**[0449]** Diese Mutagenese liefert eine berechnete Frequenz von etwa 93% Änderungen des Ausgangspunkts (nicht einschließend 583, N94 und D96) in der Genbank. Dies ist eine sehr hohe Mutationsfrequenz, die eine Chance für Hauptänderungen der Abdeckregion liefern sollte.

**[0450]** Der mutagene Primer wurde in einer PCR-Reaktion mit einem geeigneten Gegen-Primer verwendet. Das erhaltene PCR-Fragment wurde in einer zweiten PCR-Fraktion als Primer mit einem zweiten geeigneten Primer verwendet. Dieser Schritt war nötig, um die mutagenisierte Region in den Hefe-Expressionsvektor pY-ESHL aufzuschließen und zu klonen. Es ist wichtig, dass das A, das an das 3'-Ende des PCR-Fragments durch Taq-Polymerase eingefügt wurde, berücksichtigt wird, wenn ein mutagener Primer für ein solches zweistufiges PCR-Verfahren aufgebaut wird.

**[0451]** Auf diese Weise wurden zufällig mutagenisierte Genbanken der Region AS 85–99 + 83S/T hergestellt.

## Screenen

**[0452]** Der Niedercalcium-Filtertest wurde mit Dobanol und LAS verwendet. Das Screenen der Abdeck2-Genbank wurde mit 5 mM EGTA, 0,01% Dobanol und 0,006% LAS durchgeführt. Verschiedene Positive wurden nachgewiesen und isoliert, sequenziert, transformiert in Aspergillus, gereinigt und in Waschttests getestet.

## Sequenz und Waschergebnisse von selektierten Positiven

**[0453]** Unterstrichen sind die im Filtertest verwendeten Bedingungen. IF = Verbesserungsfaktor in 3-Zyklus-Waschung.

5 mM EGTA, 0.01% Dobanol, 0.006% LAS

E87K, G91A, L93I, N94K, D96A. IF = 1,3

5 mM EGTA, 0.02% Dobanol

N73D, S85T, E87K, G91A, N94K, D96A. IF = 1,1

S83T, E87K, W89G, G91A, N94K, D96V. IF = 0,8

E87K, G91A, D96R, I100V. IF = 5,2

S83T, E87K, Q249R

2 g/l PCS

E87K, G91A. IF = 5,0

## Sequenz von Oligo-Abdeckung 2 (SEQ ID Nr. 6)

5'-C ATT TAT 886 888 655 (C/G)(A/C/G/T)(A/C/G/T) 755 (C/G)88 (A/C)57

588 (C/G)76 (7/8)58 665 788 688 (8/7)58 775 ACG AG(A/T) GCC ACG-3'

Flasche 5: 93% A; 2,33% C; 2,33% G og 2,33% T.

Flasche 6: 93% C; 2,33% A; 2,33% G og 2,33% T.

Flasche 7: 93% G; 2,33% A; 2,33% C og 2,33% T.

Flasche 8: 93% T; 2,33% A; 2,33% C og 2,33% G.

## Lokalisierte Zufallsmutagenese, gleichzeitig durchgeführt von zwei Regionen

**[0454]** Zufällig mutagenisierte Genbanken von der AS-Region 56 bis 64 und 81 bis 99 + 102 wurden, wie in Materialien und Verfahren beschrieben, unter Verwendung der zwei wie in Tabelle 4 dargestellten Oligonukleotide 004 und 005 in einer PCR-Reaktion hergestellt. Oligo 004 wurde für eine AS-Region 81 bis 99 + 102 mit 93% wt-Nukleotiden und 2,33% jedes der anderen drei Nukleotiden in jeweiliger Position außer für das S83-Kodon, das aufgepuscht war, synthetisiert, um 50% S/50% T (siehe Tabelle 4) zu erhalten. Für AS mit 4 bis 6 Kodons wurde ein 50%/50%-Gemisch aus G/C oder A/C für die dritte Base (siehe Tabelle 4) verwendet. Für die dritte Base des Ile-Kodons wurde ein 50%/50%-Gemisch von Flasche 7 und 8 verwendet. D96L wurde als Ausgangspunkt in der Zufallsmutagenese verwendet, da es in vorstehenden Varianten mit guter Leistung zu finden war. Oligo 005 wurde für die AS-Region 56–64 mit 93% wt-Nukleotiden und 2,33% jedes der anderen 3 Nukleotide in jeweiliger Position synthetisiert. Für die Positionen 56, 57 und 62 wurde u. a. eine Verzerrung von positiv geladenen AS eingebracht (siehe Tabelle 4). Für AS mit 4 oder 6 Kodons wurde ein 50%/50%-Gemisch von G/C oder G/T für die dritte Base verwendet.

**[0455]** Im Allgemeinen kann die PCR-Reaktion Mutationen außerhalb der aufgepuschten Region einbringen, was ein Vorteil ist, da solche Mutationen für die Eigenschaft einer Variante nützlich sein können.

**[0456]** Das Oligo 004 wurde ebenso in Kombination mit Oligo 006 (siehe Tabelle 4), geklont durch eine Doppel-PCR-Reaktion, verwendet, was zu einer Genbank führte, die Region 81–99 + 102 und Region 248–257, 259, 263 bis 269 abdeckte. Das Oligo 006 wurde für die AS-Region 248–257, 259, 263–269 mit 93% wt-Nukleotiden und 2,33% jedes der anderen 3-Nukleotide in jeder Position synthetisiert. Für AS mit 4 oder 6 Kodons wurde ein 50%/50%-Gemisch von G/C oder A/C für die dritte Base verwendet (siehe Tabelle 4). Für die dritte Base des Ile-Kodons wurde ein 50%/50%-Gemisch aus Flasche 7 und 8 verwendet.

**[0457]** Die Oligos 005 und 006 wurden ebenso zur Konstruktion von zufällig mutagenisierten Genbanken unter Verwendung von Positiven in der Abdeckregion als Templat verwendet.

Tabelle 4

Oligo.004	102:	T	C	A
Abdeckung <sup>3</sup>		C	T	G
(Antisense)	5'-	C	G	C
AS 81-99,	G	C	C	C
G	G	5	6	A/C
G	C	C?G	5	6
A	A	5	7	7
	A	7	8	G
	A	7	8	A
	T	5	6	A
	7	5	8	A
	8	C/G	6	G
	6	8	7/8	-3'



A	8	5	<u>Flasche 5: 93% A;</u>
T	A/C	8	2,33% C; 2,33% G
T	5	C/G	og 2,33% T.
T	7	7	<u>Flasche 6: 93% C;</u>
A	5	5	2,33% A; 2,33% G
T	8	A/C	og 2,33% T.
8	8	6	<u>Flasche 7: 93% G;</u>
8	C/G	7	2,33% A; 2,33% C
6	6	A	og 2,33% T.
8	6	G	<u>Flasche 8: 93% T;</u>
8	7/8	A/T	2,33% A; 2,33% C
8	5	C/G	og 2,33% G.
6	8	6	
5	6	6	

Oligo.005 Abdeckungskontakt

AS 56-64

5'-

G

A

A

A

T

G

C

A

T

G

C

C

C

C

			G
A	5/7	8	G
G	6/8	6	G
G		T/G	C
T		7	T
A		7	T
G		G/T	C
A		7	3'-
G		8	
A		G/C	<b><u>Flasche 5:</u></b>
A		7	<b>93% A;</b>
G		7	2,33% C;
G		G/C	2,33% G og
C		6/7	2,33% T.
G		5/7	<b><u>Flasche 6:</u></b>
G		6/8	<b>93% C;</b>
A		7	2,33% A;
T		8	2,33% G og
G		G/C	2,33% T.
C		5	<b><u>Flasche 7:</u></b>
A		6	<b>93% G;</b>
A		G/C	2,33% A;
C			2,33% C og
G			2,33% T.
T			<b><u>Flasche 8:</u></b>
T			<b>93% T;</b>
T			2,33% A;
C			2,33% C og
T			2,33% G
C			
T			

A  
C  
T  
C  
G  
T  
T  
T  
7/5  
7/5  
7/5  
6/7

Oligo 006	6	A	C/G	G
C-terminal	5	C	7	C
AS 248-	A/C	C	7	C
257, 259,	7	A	5/8	-3'
263-269	8	A/C	5	<b><u>Flasche 5: 93% A;</u></b>
	C/G	5	8	2,33% C; 2,33% G
<b>5'-</b>	6	7	7	og 2,33% T.
G	6	G	8	<b><u>Flasche 6: 93% C;</u></b>
C	5/8	T	8	2,33% A; 2,33% G
C	5	G	A/C	og 2,33% T.
C	8	C/G	7	<b><u>Flasche 7: 93% G;</u></b>
T	A/C	7	7	2,33% A; 2,33% C
C	5	6	6	og 2,33% T.
T	7	A/C	8	<b><u>Flasche 8: 93% T;</u></b>
A	C/G	7	7	2,33% A; 2,33% C
G	6	7	7	og 2,33% G.
A	6	7/8	8	
C	G	5	8	
T	A	8	A	

A	A	5	T
A/C	G	8	T
5	T	6	
7			
5			

**[0458]** Einige der Positive, die aus dem Screenen dieser Genbanken auf Detergenz-haltigen Platten erhalten wurden, sind nachstehend dargestellt:

E56R + D57L + I90F + D96L + E99K

E56R + D57L + V60M + D62N + S83T + D96P + D102E

D57G + N94K + D96L + L97M

E87K + G91A + D96R + I100V + E129K + K237M + I252L + P256T + G263A + L264Q

E56R + D57G + S58F + D62C + T64R + E87G + G91A + F95L + D96P + K98I

A47V + D62G + D96L + A121T

E56G + D57G + V60E + D62G + N94K + D96L

**[0459]** Die folgenden Varianten wurden aus der Zufallsmutagenese des ganzen Gens allein (durch PCR oder PCR + Ameisensäure, wie beschrieben im Abschnitt Materialien und Verfahren) erhalten und auf Detergenz-haltigen Platten gescreent:

I34V + S54P + F80L + S85T + D96G + R108W + G109V + D111G + S116P + L124S + V132M + V140Q +

V141A + F1425 + H145R + N162T + I166V + F181P + F183S + F1205G + A243T + D254G + F262L

A19T + D167G + E210V + W221L (Zufallsmutagenese auf der Basis von D167G + E210V)

A49P + D167G + E210V (Zufallsmutagenese auf der Basis von D167G + E210V)

## BEISPIEL 2

### Konstruktion von Erstwaschvarianten des lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa*

#### 1. Domäne-Schieben durch Rekombination und Screenen

**[0460]** 20 lipolytische Enzymvarianten von *H. lanuginosa* mit sehr guter Waschleistung (wie in verschiedenen Wasch-verbundenen Tests bewertet), wobei einige davon gemäß Beispiel 1 konstruiert waren, ließ man durch ein in vivo Rekombinationsverfahren in *S. cerevisiae* YNG318 wie hier im Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben, rekombinieren. Die verwendeten lipolytischen Enzymvarianten sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Die meisten dieser Varianten wurden durch Zufalls- oder lokalisierte Zufallsmutagenese, wie im vorstehenden Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben, und Screenen nach einer herabgesetzten Abhängigkeit von Calcium und einer verbesserten Toleranz gegenüber der Detergenzkomponente Dobanol 25-7 (vgl. vorstehenden Abschnitt Materialien und Verfahren) konstruiert. Einige der Varianten sind das Ergebnis aus zwei oder mehreren aufeinanderfolgenden Mutagenese- und Screening-Runden.

**[0461]** Der durch das Restriktionsenzym geöffnete Vektor und die PCR-Fragmente, die aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich und weiter im Abschnitt Materialien und Verfahren erörtert sind, wurden in einem Mol-verhältnis von etwa 1 : 1 gemischt und zur Transformation von kompetenten Zellen von *S. cerevisiae* (hergestellt durch das Lithiumacetat-Verfahren, wie in Current Protocols in Molecular Biology, Hrsg. F. M. Ausubel et al., Kap. 13.7, John Wiley & Sons, Inc., USA beschrieben) verwendet. Die transformierten Zellen wurden auf Filtern aufgetragen und nach einer herabgesetzten Calcium-Abhängigkeit und einer erhöhten Detergenz-Toleranz unter Verwendung des im vorstehenden Abschnitt Materialien und Verfahren beschriebenen Filtertests gescreent.

**[0462]** Kolonien, die ein positives Signal lieferten, wurden zu einzelnen Kolonien auf neue Platten ausgestrichen und filtriert und wieder gescreent. Nach 2 bis 4 Wieder-Screenings wurden positive Kolonien wie folgt fermentiert:

#### Fermentation von lipolytischem Enzym und Varianten von *H. lanuginosa* in Hefe

**[0463]** 10 ml SC-Ura-Medium werden mit einer Kolonie von *S. cerevisiae* beimpft und man lässt sie bei 30°C für eine Dauer von 2 Tagen wachsen. Die 10 ml werden zum Beimpfen von 300 ml SC-Ura-Medium verwendet, das man nach Beimpfen bei 30°C für eine Dauer von 3 Tagen wachsen lässt. Die 300 ml werden zum Beimpfen

von 5 l des folgenden G-Substrats verwendet:

400 g	Amicase
6,7 g	Hefeextrakt (Difco)
12,5 g	L-Leucin (Fluka)
6,7 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
10 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
17 g	$\text{K}_2\text{SO}_4$
10 ml	Spurenelemente, vgl. nachstehend
5 ml	Vitaminlösung, vgl. nachstehend
6,7 ml	$\text{H}_3\text{PO}_4$
25 ml	20% Pluronic (Anti-Schaum)

**[0464]** In einem Gesamtvolumen von 5.000 ml.

#### Spurenelemente

6,8 g	$\text{ZnCl}_2$
54,0 g	$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
19,1 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
2,2 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
2,58 g	$\text{CoCl}_2$
0,62 g	$\text{H}_3\text{BO}_3$
0,024 g	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,2 g	KI
100 ml	HCl (konzentriert)

**[0465]** In einem Gesamtvolumen von 1 l.

#### Vitamin-Lösung

250 mg	Biotin
3 g	Thiamin
10 g	D-Calciumpantothenat
100 g	Myo-Inositol
50 g	Cholinchlorid
1,6 g	Pyridoxin
1,2 g	Niacinamid
0,4 g	Folsäure
0,4 g	Riboflavin

**[0466]** In einem Gesamtvolumen von 1 l.

**[0467]** Die Hefezellen wurden für eine Dauer von 5 Tagen bei 30°C in 5000 ml Medium fermentiert. Glucose wurde dem Fermentator mit einer Anfangsdosierung von 100 ml 70%iger Glucose und Zugabe von 400 ml 70%iger Glucose/Tag zugeführt.

**[0468]** Der pH-Wert der Fermentationsbrühe wurde bei 5,0 durch gesteuerte Zugabe einer 10%igen  $\text{NH}_3$ -Lösung gehalten.

**[0469]** Das Rühren bestand aus 300 UpM für die ersten 22 Stunden, gefolgt von 900 UpM für den Rest der Fermentation. Luft wurde mit 1 l Luft/l/min für die ersten 22 Stunden, gefolgt von 1,5 l Luft/l/min für den Rest der Fermentation zugeführt.

**[0470]** Nach Reinigung wurde die Fähigkeit der Variante zum Entfernen von Schmalz in dem im vorstehend beschriebenen Abschnitt Materialien und Verfahren beschriebenen Ein-Zyklus-Waschtest getestet. Die Ergebnisse sind nachstehend in Beispiel 2 und 3 angegeben.

Tabelle 1: Varianten, verwendet zur Rekombination

Zur Herstellung eines Vektors (geöffnet mit NruI) verwendete Lipasevarianten von *Humicola lanuginosa* zur in vivo Rekombination (Gen-Schieben)

E56R, D57L, I90F, D96L, E99K  
 E56R, D57L, V60M, D62N, S83T, D96P, D102E  
 D57G, N94K, D96L, L97M  
 E87K, G91A, D96R, I100V, E129K, K237M, I252L, P256T, G263A, L264Q  
 E56R, D57G, S58F, D62C, T64R, E87G, G91A, F95L, D96P, K98I, (K237M)  
 E210K

Lipase-Varianten von *Humicola lanuginosa*, verwendet zur Herstellung von DNA-Fragmenten (durch Standard-PCR-Amplifikation des gesamten Gens von Gen-Plasmiden, enthaltend die Variante) zur in vivo Rekombination (Gen-Schieben)

S83T, N94K, D96N  
 E87K, D96V  
 N94K, D96A  
 E87K, G91A, D96A  
 D167G, E210V  
 S83T, G91A, Q249R  
 E87K, G91A  
 S83T, E87K, G91A, N94K, D96N, D111N.  
 N73D, E87K, G91A, N94I, D96G.  
 L67P, I76V, S83T, E87N, I90N, G91A, D96A, K98R.  
 E210K  
 S83T, E87K, G91A, N92H, N94K, D96M  
 S85P, E87K, G91A, D96L, L97V.  
 E87K, I90N, G91A, N94S, D96N, I100T.  
 I34V, S54P, F80L, S85T, D96G, R108W, G109V, D111G, S116P, L124S, V132M, V140Q, V141A, F142S, H145R, N162T, I166V, F181P, F183S, R205G, A243T, D254G, F262L  
 E56R, D57L, I90F, D96L, E99K  
 E56R, D57L, V60M, D62N, S83T, D96P, D102E  
 D57G, N94K, D96L, L97M  
 E87K, G91A, D96R, I100V, E129K, K237M, I252L, P256T, G263A, L264Q  
 E56R, D57G, S58F, D62C, T64R, E87G, G91A, F95L, D96P, K98I, (K237M)

## 2. Domänen-Schieben durch traditionelles Klonen von zwei Positiven miteinander

**[0471]** Der Expressionsvektor pHD414 von *Aspergillus*, enthaltend eine DNA-Sequenz, die die Lipasevariante (D57G + N94K + D96L + L97M) von *Humicola lanuginosa* kodiert, wurde mit den Restriktionsenzymen NarI und XbaI aufgeschlossen, was zu zwei Fragmenten führte. Die Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das größte Fragment aus dem Agarosegel isoliert. Dieses Fragment wurde an das kleinste Fragment aus dem Aufschluss der Variante (S83T + G91A + Q49R) mit NarI und XbaI gebunden. Die Bindung wurde in *E. coli* transformiert und die erhaltenen Plasmidkonstruktionen aus einem der Transformanten isoliert und zum Testen des korrekten Zusammenschlusses sequenziert. Das Plasmid wurde in *Aspergillus oryzae* transformiert, fermentiert und, wie im Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben, gereinigt. Diese Variante enthielt die folgenden Mutationen D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R.

## BEISPIEL 3

Konstruktion und Expression der lipolytischen Enzymvariante HL9 von *H. lanuginosa* in *Aspergillus oryzae* JaL125

**[0472]** Die Variante HL9 enthält die folgenden Mutationen im reifen Teil: E1P + D57G + N94K + D96L + Q49R und die N-terminale Peptidaddition SPIRPR, kondensiert an E1P (was zur gesamten N-terminalen Peptidaddition SPIRPRP führt). Eine N-terminale Peptidaddition wurde an dem lipolytischen Stammenzym von *H. lanuginosa* (DSM 4109) mit der aus EP 305 216 ersichtlichen Aminosäure bzw. DNA-Sequenz angebracht und zusätzlich die folgenden Mutationen durchgeführt: D57G + N94K + D96L + Q249R in ihrem reifen Teil (eingefügt

durch herkömmliche zielgerichtete Mutagenese) in der DNA-Sequenz (EP 305 216). Die Peptidaddition SPIR-PRP wurde an den N-Terminus der Stammenzyme wie folgt angebracht:

#### Konstruktion von pIVI220

**[0473]** Das Plasmid wurde unter Verwendung des Bausatzes für Chamäleon-Doppelstrang-zielgerichtete-Mutagenese von Stratagene gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert.

**[0474]** pHL296 wurde als Plasmidtemplat verwendet. Das Plasmid enthält das Gen, das das lipolytische Enzym von *H. lanuginosa* mit den vorstehend erwähnten Mutationen (D57G + N94 K + D96L + L97M + Q249R), geklont in pHD414, kodiert.

**[0475]** Primer Nr. 7258 wurde als der Selektionsprimer verwendet.

7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3'

(Folglich wurde die im Ampicillin-Resistenz-Gen zu findende Scal-Stelle geändert und zum Schneiden einer MluI-Stelle verwendet.)

**[0476]** Primer Nr. 7770 wurde als der Selektionsprimer verwendet.

7770: 5'p tct agc cca gaa tac tgg atc aaa tc 3' (Änderungen der Scal-Stelle, gefunden im Lipase-Gen von *H. lanuginosa* ohne Ändern der Aminosäure-Sequenz).

**[0477]** Primer Nr. 8479 wurde als der mutagene Primer verwendet.

8479: 5'p gcg tgg acg gcc ttg gct agc cct att cgt cct cga ccg gtc tcg cag gat ctg

(Ersetzen des Polypeptids und des N-terminalen E1 des Stammenzym von *H. lanuginosa* (SPIRRE durch SPIRPRP).

#### Konstruktion von pIVI245

**[0478]** Das Plasmid wurde unter Verwendung des Bausatzes für Chamäleon-Doppelstrang-zielgerichtete Mutagenese von Stratagene (Kat.Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert.

**[0479]** pIVI220 wurde als Plasmidtemplat und Primer Nr. 7887 als Selektionsprimer verwendet (Ändern der eingebrachten MluI-Stelle, gefunden im Ampicillin-Resistenz-Gen und verwendet zum Schneiden an eine Scal-Stelle). 7887: 5'p-gaa tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3'

**[0480]** Primer Nr. 8932 wurde als der mutagene Primer verwendet. 8932: 5'p-g aac tgg ata gga aat ttg aag ttc ctg ttg aaa gaa ata aat gac 3' (wodurch M97 zurück zu L97 als Wildtyp geändert wurde und immer noch die zwei Mutationen N94K und D96L bewahrt wurden)).

#### 2. Konstruktion des Expressions-Plasmids pCaHj483 von *A. oryzae*

**[0481]** pCaHj483 ist in [Abb. 8](#) dargestellt. Es ist aus den folgenden Fragmenten aufgebaut:

a) Dem Vektor pToC65 (WO91/17243), geschnitten mit EcoRI und XbaI.

b) Einem XbaI-Fragment mit 2,7 kb von *A. nidulans*, tragend das amdS-Gen (C. M. Corrick et al., (1987), Gene 53, S. 63–71). Das amdS-Gen wird als selektive Markierung in Pilz-Transformationen verwendet. Das amdS-Gen wurde so modifiziert, dass die gewöhnlich vorliegende BamHI-Stelle zerstört ist. Dies wurde durch Einbringen einer stillen Punkt-Mutation unter Verwendung von Primer 3: AGAAATCGGGTATCCTT-TCAG (SEQ ID Nr. 1) durchgeführt.

c) Einem EcoRI/BamHI-Fragment mit 0,6 kb, tragend einen NA2-Promotor von *A. niger*, kondensiert an ein DNA-Fragment mit 60 by der Sequenz, die das untranslatierte 5'-Ende der mRNA des tpi-Gens von *A. nidulans* kodiert. Der NA2-Promotor wurde aus dem Plasmid pNA2 (EP 383 779) isoliert und an die tpi-Sequenz mit 60 bp durch PCR kondensiert. Der Primer (Primer 4 SEQ ID Nr. 7), der die tpi-Sequenz mit 60 bp kodiert, wies die folgende Sequenz auf

5'-

GCTCCTCATGGTGGATCCCCAGTTGTGTATATAGAGGATTGAGGAA

GGAAGAGAAGTGTGGATAGAGGTAAATTGAGTTGGAAACTCCAAG

CATGGCATCCTTGC-3'

d) Einem XbaI-Fragment mit 675 bp, tragend einen Glucoamylase-Transkriptionsterminator von *A. niger*.

Das Fragment wurde aus dem Plasmid pICAMG/Term (EP 238 023) isoliert.

Die BamHI-Stelle von Fragment c) wurde an die XbaI-Stelle vor den Transkriptions-Terminator an Fragment d) über den pIC19R-Linker (BamHI bis XbaI) gebunden.

#### Konstruktion des HL9-Expressions-Plasmids pCaHj485

**[0482]** Das Plasmid pJVi 245 wurde mit BamHI und SalI aufgeschlossen und das erhaltene Fragment mit 904 bp, das das lipolytische HL9-Enzym kodiert, wurde isoliert. PCaHj 483 wurde mit BamHI und SalI aufgeschlossen und das große Vektorfragment (6757) an das HL9-Fragment gebunden. Das Bindungsgemisch wurde zum Transformieren von DH5 $\alpha$ -Zellen von E. coli verwendet und ein Transformant, beherbergend das erwartete Plasmid, wurde isoliert. Das Plasmid wurde als pCaHj485 bezeichnet.

#### 3. Transformation von pCaHj 485 in JaL 125

**[0483]** JaL 125 von *Aspergillus oryzae* wurde mit pCaHj 485 unter Verwendung von Selektion auf Acetamid, wie in Patent EP 0 531 372 beschrieben, transformiert. Transformanten wurden zweimal Sporen-wiederisoliert. Die Sporen aus der zweiten Reisolation jedes Transformanten wurden zum Beimpfen von 200  $\mu$ l YPM (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Maltose) in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Man ließ die YPM-Kulturen für eine Dauer von 4 Tagen bei 34°C wachsen und die besten Hersteller wurden unter Verwendung eines p-Nitrophenylbutyrat-Versuchs selektiert:

Stammlösung: 18  $\mu$ l p-Nitro-Phenylbutyrat wurde in 1 ml Isopropanol gelöst.

Arbeitslösung: 0,1 ml Stammlösung wurde mit 10 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM CaCl<sub>2</sub> gemischt.

Test: 1  $\mu$ l YPM Überstand wurde mit 200  $\mu$ l Arbeitslösung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen gemischt und die Farbentwicklung wurde bei 450 nm unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts gemessen.

**[0484]** Ein Transformant wurde zur Tankfermentation ausgewählt.

#### 4. Tank-Fermentation von JaL 125/pCaHj 485

**[0485]** Die Fermentation wurde als Zufütterungs-Fermentation unter Verwendung einer konstanten Mediumtemperatur von 34°C und einem Ausgangsvolumen von 1,2 Liter durchgeführt. Der anfängliche pH-Wert des Mediums wurde auf 6,5 eingestellt. Als der pH-Wert auf 7,0 erhöht war, wurde dieser Wert durch Zugabe von 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> beibehalten. Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Medium wurde durch Variieren der Rührgeschwindigkeit und unter Verwendung einer festgelegten Rührgeschwindigkeit von 1,0 l Luft pro Liter Medium pro Minute gesteuert. Die Zufuhrgeschwindigkeit wurde bei einem konstanten Grad während der gesamten Zufütterungs-Phase beibehalten.

**[0486]** Das Chargenmedium enthielt Maltosesirup als Kohlenstoffquelle, Harnstoff und Hefeextrakt als Stickstoffquelle und ein Gemisch aus Spurenmetallen und Salzen. Die kontinuierlich während der Zufütterungs-Phase zugesetzte Zufuhr enthielt Maltosesirup als Kohlenstoffquelle, wohingegen Hefeextrakt und Harnstoff verwendet wurden, um eine ausreichende Stickstoffzufuhr bereitzustellen.

#### 5. Reinigung des lipolytischen Erstwasch-Enzyms

1) Der Fermentations-Überstand wurde durch einen Milliporenfilter, Kat. Nr. P2504700 Filtertyp AP25, filtriert.

2) Der Fermentations-Überstand wurde noch einmal durch einen sterilen Filter vom Milliporenmembrantyp GS 0,22 Mikron filtriert.

3) Der Fermentationsüberstand wurde dann auf 0,8 M Ammoniumacetat durch Zugabe von festem Ammoniumacetat eingestellt.

4) Hydrophobe Chromatographie über einer Säule des Typs TSK-Gel-Butyl-Toyopearl 650. 50 ml Säule wurden mit der Butyl-Toyopearl-Matrix bepackt. Die Säule wurde gewaschen und mit 0,8 M Ammoniumacetat äquilibriert. Ein Liter Fermentationsüberstand, eingestellt mit Ammoniumacetat, wurde dann auf die Butylsäule aufgebracht. Die Säule wurde mit 0,8 M Ammoniumacetat gewaschen, bis das gesamte ungebundene Material ausgewaschen war. Das gebundene Material wurde dann mit Wasser und 50% Ethanol hintereinander eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen und die Lipaseaktivität unter Verwendung eines Standard-LU-Tests analysiert. Fraktionen, die Lipaseaktivität enthalten, wurden gepoolt und verdünnt, um die Leitfähigkeit des Pools unter 4 mSi und den pH auf 8,5 einzustellen.

5) Anionenaustauschchromatographie über Hochleistungs-Q-Sepharose (Pharmacia, Code Nr. 17-1014-01). 50 ml Säule wurden gepackt und mit 50 mM Boratpuffer pH 8,5 gewaschen. Der lipolytische



Enzymaktivität enthaltende Pool wurde dann auf die Hochleistungs-Q-Sepharose-Säule aufgebracht. Ungebundenes Material wurde mit Boratpuffer, pH 8,5, ausgewaschen. Die gebundene Aktivität wurde dann mit einem linearen Gradienten unter Verwendung eines Boratpuffers, enthaltend 1 M Natriumchlorid, pH 8,5, eluiert.

Die Fraktionen wurden aufgefangen und auf Lipaseaktivität getestet. Lipaseaktivität enthaltende Fraktionen mit einem UV-Absorptionsverhältnis bei A280 und A260 von mehr als 1,7 wurden gepoolt.

#### BEISPIEL 4

##### Konstruktion von N-terminalen Additionen durch Zufallsmutagenese

**[0487]** Die Zufallsmutagenese des Teils der DNA-Sequenz, die die N-terminale Addition SPIRPRP kodiert, die an dem ersten Aminosäurerest des reifen lipolytischen Enzyms von *H. lanuginosa* (erhältlich von DSM 4109) und enthaltend die folgenden weiteren Mutationen in seinem reifen Teil: D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R, addiert ist, wurde durchgeführt. Die Mutationen im reifen Teil des lipolytischen Stammenzyms wurde durch PCR-geleitete zielgerichtete Mutagenese unter Verwendung der geeigneten Primersequenzen unter Verwendung des in WO 95/26215 beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Die Peptidaddition SPIRPRP wurde wie in Beispiel 3 beschrieben angebracht (d. h. das letzte P ersetzt E1).

**[0488]** Das Nukleotid-Aufpuschschemata für die SPIRPRP-Kodons lautete wie folgt:

**Oligo 1: 5'- GCG TGG ACG GCC TTG GCC 86(T/A) 66(A/T) 58(T/A) 67(T/A)**  
**66(T/A) 575 66(T/A) GAG GTC TCG CAG GAT CTG -3' (57-mer) (SEQ ID**  
**Nr. 11),**

wobei die Zahlen bedeuten, welcher der folgenden Flaschen verwendet wurde.

Flasche 5: 80% A; 6,66% C; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 6: 80% C; 6,66% A; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 7: 80% G; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% T.

Flasche 8: 80% T; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% G.

**[0489]** Das zweistufige PCR-Reaktionsprotokoll wurde verwendet: Die erste Stufe mit dem vorstehenden Primer als 5'-Primer und mit dem Primer 2056 (5' gca cgt aat gtt tgt acc 3') als der 3'-Primer wurde unter Verwendung von pHL296 als das Plasmidtemplat durchgeführt. Das Produkt der ersten PCR-Runde wurde in einer neuen PCR mit 4699 (5' cgg tac ccg ggg atc cac 3') als der 5'-Primer (zum Einbringen der BamHI-Stelle und des ersten Teils der Kodierungssequenz) und mit dem PCR-Produkt als 3'-Primer unter Verwendung desselben Templats verwendet. Das erhaltene Produkt wurde auf Spin 100 (von Clontech Lab., Inc.) gereinigt und mit BamHI und PvuII abgeschnitten. Das erhaltene DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel mit SpinX (Costar) gereinigt und an den Hefe-Expressionsvektor pJSO37, enthaltend das lipolytische Enzym-Gen von *H. lanuginosa* von pHL296, geklont als BamHI-XbaI-Fragment, abgeschnitten mit BamHI und PvuII, gebunden. Die erhaltene DNA wurde in DH10/DH12-Zellen von *E. coli* (Gibco/BRG Lifetechnologies) unter Verwendung der herkömmlichen Technik elektrotransformiert.

**[0490]** Nach der Transformation in *E. coli* und Amplifikation wurde das Plasmid gereinigt und in *S. cerevisiae* YNG 318 transformiert. Die erhaltenen Zellen von *S. cerevisiae* wurden in den alternativen Detergenzhaltigen (3 g/l PCS) Lipase-Filtertests auf gute Leistung gescreent. Die Positiven wurden sequenziert, und es wurde gefunden, dass sie die folgenden Peptidadditionen enthielten: GPIRPRP, SHSRHNA, TAIRPRK, SALRRRP, STRRPRP, SPRRPRT, SPIPPGP, LPFRQRP, SPFRPKL und SALRRP (jeweils bezeichnet als HL10s1-10).

**[0491]** Die Ein-Zyklus-Waschleistung von jedem der HL10s1-6 wurde wie vorstehend im Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben (Test zum Testen des Erstwasch-Effekts) bei einer Temperatur von 30°C und unter Verwendung von 5 g/l Enzym-inaktiviertem Ariel Futur als Detergenz getestet. Die Fettbestandteilmenge, der von jedem der modifizierten Enzyme entfernt wurde, ist nachstehend dargestellt:

Lipase-Variante	Nieder- dosierung	% entferntes Schmalz	Hochdosierung	% entferntes Schmalz
HLv10s1	1250 LU/l	26	12500 LU/l	54
HLv10s2	1250 LU/l	22	12500 LU/l	53
HLv10s3	1250 LU/l	34	12500 LU/l	55
HLv10s4	1250 LU/l	33	12500 LU/l	55
HLv10s5	1250 LU/l	23	12500 LU/l	47
HLv10s6	1250 LU/l	30	12500 LU/l	53

**[0492]** Die Tendenz bestand darin, dass diejenigen mit der besten Leistung mehr positiv geladene Aminosäuren in der N-terminalen Addition aufwiesen.

**[0493]** Analog dazu wurde eine Zufallsmutagenese der N-terminalen Addition RPRPRPRP, addiert an die Lipasevariante E1\* + D57G + N94K + D96L + L97M + Q49R plus andere Varianten von *H. lanuginosa*, durchgeführt. Das Nukleotid-Aufpuschschemata für die RPRPRPRP-Kodons lautete wie folgt:

Oligo 2: 5'-GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG GCG GCG CCA CCT CCA

67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) (6/7)(7/8)(C/G)

57(C/G) C57 (5/7)5(C/G) CTG TTT AAC CAG TTC AAT CTC-3' (93-mer)

Flasche 5: 80% A; 6,66% C; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 6: 80% C; 6,66% A; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 7: 80% G; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% T.

Flasche 8: 80% T; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% G.

**[0494]** APPP wird an den N-Terminus des zufällig mutagenisierten RPRPRPRP und vor das Signalpeptid addiert, um die N-terminale Addition vor proteolytischer Zersetzung zu schützen. Dies muss nicht erforderlich sein. E1 wurde deletiert, um eine negativ geladene Aminosäure zu entfernen. Die Aminosäuren in Position 2 bis 5 der reifen Lipasesequenz von *H. lanuginosa* wurde ebenso mutagenisiert, um verbesserte Mutanten in diesem nicht-strukturellen Teil der Lipase zu finden. Ansonsten ist das Verfahren wie vorstehend für die Zufallsmutagenese von SPIRPRP angegeben.

**[0495]** Die folgenden N-terminalen Peptidadditionen wurden erhalten:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser (APPPRPRLLPIS) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzliche Mutation D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro (APPPTRQRQSP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2L, S3T und D5V in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro (APPPRTIPRSSP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2L, S3R und D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2G und D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2GL, S3T, Q4P und D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPPKASPRQRP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2GL, D5Q und L6M in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

## BEISPIEL 5

## Erstwaschaktivität von lipolytischen Enzymen der Erfindung

**[0496]** Die Erstwaschaktivität von lipolytischen Enzymen wurde unter Verwendung des vorstehend im Abschnitt Materialien und Verfahren beschriebenen „Tests zum Testen von Erstwascheffekt“ mit Detergenzzusammensetzung A oder B getestet. Wenige der neuen Erstwasch-Lipasen werden mit dahingehend verglichen, was als der gegenwärtige Stand des Fachgebiets mit lipolytischen Enzymen für Detergenzien erachtet wird.

## Anmerkung:

- ✖ werden in *Aspergillus oryzae* wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt  
 \* werden in Hefe wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt

Detergenzzusammensetzung A		
Lipolytisches Enzym	% Entfernung bei 1250 LU/l	% Entfernung bei 12500 LU/l
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+ Q249R	15%	49%
Lumafast <sup>TM</sup> (Ps. mendocina)	0%	2%
Lipomax <sup>TM</sup> (Ps. pseudoalcaligenes L21M)	0%	9%
<i>Fusarium solani pisi</i>	0%	0%
Lipolase	0%	0%
Lipolase Ultra	0%	0%

Detergenzzusammensetzung B		
Lipolytisches Enzym	% Entfernung bei 1250 LU/l	% Entfernung bei 12500 LU/l
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+ Q249R	15%	46%
Lumafast <sup>TM</sup> (Ps. mendocina)	6%	6%
Lipomax <sup>TM</sup> (Ps. pseudoalcaligenes L21M)	0%	0%
Liposam <sup>TM</sup>	4%	7%
<i>Fusarium solani pisi</i>	2%	5%
Lipolase	5%	6%
Lipolase Ultra	6%	0%

## Zusätzliche Beispiele

Detergenzzusammensetzung A	
Lipolytisches Enzym	% Entfernung bei 12500 LU/l
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S170P+Q249R *	42%
SPIRR+A49P+D167G+E210V *	44%
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+D102Y+E210K *	36%
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+I252L+P256T+G263A+L264Q *	41%

## BEISPIEL 6

## Aktivität in Detergenztest (AiD)

**[0497]** Bei dem AiD-Test handelt es sich um einen analytischen Test, der zum Selektieren von lipolytischen Stammenzymen, die bei der Konstruktion eines wie hier beschriebenen lipolytischen Erstwaschenzyms verwendet werden sollen, nützlich ist.

Ausrüstung: Wasserbad mit Becher mit 150 ml. Das Rühren wird durch einen Rührer erzielt.

Lipolytische Enzymdosierung: 12.500 LU/l

Substrat: 6 Stücke (3,5 × 3,5 cm) Baumwolle mit 6 µl Olivenöl für einen Test.

Detergenz: 0,5 g/l Modell-FlüssigDetergenz(•Detergenzformulierung nachstehend), gelöst in 0,36 mM Ca<sub>2</sub>/Mg<sub>2</sub> (5 : 1), eingestellt auf pH 10, 100 ml pro Becher.

**[0498]** Nach Rühren der Probe für eine Dauer von 60 Minuten bei 30°C wird das restliche Detergenz auf den Textilmustern durch Zugabe von Leitungswasser für eine Dauer von 15 Minuten entfernt. Die Textilmuster werden in eine Flasche, enthaltend 10 ml Tetrahydrofuran und 6,25 ml 4 M HCl, gegeben und über Nacht eingedampft, wonach die Probe in Tetrahydrofuran wiedergelöst wird. Die Fettzusammensetzung wird durch DSC/FID bestimmt und die Menge an prozentualer FFA (freie Fettsäuren) zum Unterscheiden der lipolytischen Enzyme verwendet.

## Anmerkung:

□ werden in *Aspergillus oryzae* wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt

\* werden in Hefe wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt

AiD-Test	
Lipolytisches Enzym	% FFA
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P+S170P+Q249R *	20%
SPIRR+A49P+D167G+E210V *	25%
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+D96L+	25%

D102Y+E210K *	
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+D234Y+I252L +P256T+G263A+L264Q *	20%
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	27%
Lumafast™ (Ps. mendocina)	5%
Lipomax™Cos (Ps. pseudoalcaligenes)	31%
Fusarium solani <i>pisi</i>	6%
Lipolase	5%
Lipolase Ultra	5%

Modell-Flüssigwaschmittel:	
Komponente	Gew. %
LAS	17,50
AEO	14,40
DTSA	10,00
Ölsäure	3,00
Kokosnussöl	5,00
MEA	14,50
MPG	10,70
Ethanol	1,40
Phosphonat	1,00
Borsäure	0,80
Zitronensäure	3,90
Natriumchlorid	0,13
Kaliumchlorid	0,38
Salzsäure 4 M	6,00
Wasser	9,7

## BEISPIEL 7

**[0499]** Die Erstwaschaktivität einer großen Anzahl an potenziellen lipolytischen Erstwaschenzymen wurde unter Verwendung des vorstehend im Abschnitt Materialien und Verfahren beschriebenen „Tests zum Testen von Erstwascheffekt“ mit einem spezifischen, im Handel erhältlichen Detergenz – Ariel Futur (im Handel erhältliche Chargen-Nr. 4279 B 23:35) getestet. Die schon in den Detergenzien vorliegenden Enzyme wurden durch Wärme (4 Minuten bei 85°C im Mikroofen) vor der Waschung inaktiviert.

**[0500]** Die erste Tabelle kann zum Vergleichen von Beispiel 5 und 6 verwendet werden. Anschließend werden die Ergebnisse wie folgt unterteilt:

- a) % Entfernung beim Dosieren nach LU-Einheiten (siehe Materialien und Verfahren zur Definition)

- b) % Entfernung beim Dosieren nach Milligramm von reinem Enzymprotein  
 c) Delta-Reflexion beim Dosieren nach LU-Einheiten (siehe Materialien und Verfahren zur Definition)  
 d) Delta-Reflexion beim Dosieren nach Milligramm von reinem Enzymprotein

Anmerkung:

- α werden in *Aspergillus oryzae* wie in Beispiel 2 beschrieben, hergestellt  
 \* werden in Hefe wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt

**[0501]** Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:

Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz		
Lipolytisches Enzym	% Entfernung bei	
	1250 LU/l	12500 LU/l
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+ S116P+S170P+Q249R *	12%	37%

SPIRR+A49P+D167G+E210V *	8%	38%
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+ D96L+D102Y+E210K *	8%	34%
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+ D234Y+I252L+P256T+G263A+L264Q *	11%	37%
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+ Q249R□	27%	53%
Lumafast™ (Ps. mendocina)	3%	3%
Lipomax™ (Ps. pseudoalcaligenes L21M)	1%	0%
Fusarium solani <i>pisi</i>	0%	1%
Lipolase	0%	0%

## a) Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz

Lipolytisches Enzym	% Entfernung bei		
	1250 LU/l	2500 LU/l	1250 0 LU/l
SPIRR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R *	12%	n.d.	38%
SPIRR+N94K+D96L+Q249R*	13%	n.d.	45%
SPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A*	n.d.	27%	48%
SPIRR+D137G+D167G+D210V+W221L*	13%	n.d.	47%
SHSRHNA+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	n.d.	22%	53%
GPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	n.d.	26%	54%
TAIRPRK+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	n.d.	34%	55%

## b) Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz

Lipolytisches Enzym	% Entfernung bei	
	0.25 mg/l	2.50 mg/l
I90F+D96L+E99K+V187A□	1%	26%

E1PSPiRPR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	21%	51%
--------------------------------------	-----	-----

c) Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz			
Lipolytisches Enzym	Delta-Reflexion (dR)		
	1250 LU/l	5000 LU/l	12500 LU/l
A47V+D92G+D96L+A121T□	1	n.d.	2
D57G+N94K+D96L+P256T□	0	n.d.	2
N94K+D96A+Q249R□	0	n.d.	2
SPIRR+Lipolase <sup>TM*</sup>	n.d.	n.d.	3
D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S116P□	1	n.d.	3
D57G+N94K+D96L+L97M+D167G+E210V□	1	n.d.	3
QPIRR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	1	n.d.	3
SPIR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	n.d.	n.d.	4
SHWQQ+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	1	n.d.	4
I90F+D96L+E99K+V187A+D234Y□	1	4	n.d.
E1AWWPSPiRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	2	6	n.d.



SPIRR+A19T+D167G+E210V+W221L*	1	n.d.	6
SPIRR+D57G+N94K+D96L+P256T*	1	n.d.	6
SPIRR+E56K+D57G+D62R+S83T+S85F+ D96L+D102Y+E210K*	4	n.d.	11
SPIRR+N94K+F95L+D96H+N101S+F181L+ D234Y+Y252L+P256T+G263A+L264Q*	4	n.d.	11
SPIRR+D57G+G59V+N94K+D96L+L97M+S 116P+S170P+Q249R*	5	n.d.	11
SPIRR+A49P+D167G+E210V*	3	n.d.	12
SPIRR+N94K+D96L+Q249R*	4	n.d.	13
SPIRR+D137G+D167G+E210V+W221L*	5	n.d.	13
SPIRR+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	6	n.d.	13
SPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A*	6	n.d.	15

## d) Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz

Lipolytisches Enzym	Delta-Reflexion (dR)		
	0.25 mg/l	1.00 mg/l	2.50 mg/l
D57G+N94K+D96L+L97M+D167G+E210V□	1	n.d.	3
S3R.D137G+D167G+E210V+W221L□	0	2	2
D57G+N94K+D96L+L97M+E210K□	n.d.	n.d.	3
E1SPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+D167G +V187A+Q249R□	n.d.	4	n.d.
E87K+G91A+D167G+E210V□	n.d.	n.d.	4
E87K+G91A+E210K□	1	n.d.	4
I90F+D96L+E99K□	0	2	5
APPPRTRPRPRP+E1S+V2G+S3T+Q4P+D5E +D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	0	2	n.d.
N94K+D96L+L97M+N233R+Q249R□	0	3	n.d.
SPIRKSPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A□	1	3	5

D137G+D167G+E210V+W221L+N233R□	1	3	5
SPIRRSPIRR+I90F+D96L+E99K+V187A□	1	3	6
D167G+E210V+N233R+Q249R□	1	3	n.d.
E1W+V2P+N94K+D96L+Q249R□	1	3	n.d.
D96L+E99K+V187A□	1	3	n.d.
E1SPPWWPRW+N94K+D96L+Q249R□	2	3	n.d.
N94K□	2	3	n.d.
D96L+D137G+D167G+E210V□	2	3	n.d.
E1SQRIKQRIK+I90F+D96L+E99K+V187A□	0	4	n.d.
E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R□	0	4	n.d.
I90F+D96L+E99K+V187A+D234Y+Q249R□	0	4	n.d.
I90F.D96L+E99K+V187A+N233R□	1	4	n.d.
E1A+S3R+N94K+D96L+Q249R□	1	4	n.d.
d) Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz			
Lipolytisches Enzym	Delta-Reflexion (dR)		
	0.25 mg/l	1.00 mg/l	2.50 mg/l
S3R+I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R□	1	4	n.d.
E1A+I90F+D96L+E99K+V187A□	1	4	7
I90F+D96L+E99K+V187A□	1	4	8
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L□	2	4	n.d.
E1SPPWWP.N94K+D96L+Q249R□	2	4	n.d.
SPIRK+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	4	10
SPIRRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	n.d.	11
I90F+D96L+E99K+V187A+Q249R□	1	5	8
I90F+D96L+E99K+V187A+T231R□	2	5	n.d.
E1SPPRWP+N94K+D96L+Q249R□	2	5	n.d.
E1SPPRWPWR+N94K+D96L+Q249R□	2	5	n.d.
N94K+D96L+E99K□	2	5	n.d.

E1A+I90F+D96L+E99K+Q249R*	1	6	n.d.
E1K+D96L+D167G+E210V+N233R+Q249R□	2	6	n.d.
E1SPIRKPRIK+I90F+D96L+E99K+V187A□	2	6	n.d.
SHWRK++D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	6	n.d.
SPIRKAWWP+I90F+D96L+E99K+V187A□	2	7	10
N94K+D96L+E99K+Q249R□	2	7	n+d.
E1SPPWRPRR+N94K+D96L+Q249R□	2	7	n.d.
E1SPPRWPRR+N94K+D96L+Q249R□	2	7	n.d.
D137G+D167G+E210V+W221L+D234R□	2	7	n.d.
P-4C+N94K+D96L+E239C+Q249R□	3	7	n.d.
E1SPIRPRPSPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	3	7	n.d.
E1APPPRPRPRPRP+V2G+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	4	7	n.d.
d) Enzym-inaktiviertes, im Handel erhältliches europäisches Detergenz			
Lipolytisches Enzym	Delta-Reflexion (dR)		
	0.25 mg/l	1.00 mg/l	2.50 mg/l
E1SPPWPRPRP+N94K+D96L+Q249R□	2	8	n+d.
E1SPKRKPRP+D137G+D167G+E210V+W221L□	3	8	n.d.
E1SPPRRP+D96L+E99K+D137G+D167G+V187A+Q249R□	4	8	n.d.
E1SPPRRP+D57G+N94K+D96L+Q249R□	4	9	11
E1SPIRPRP+N94K+D96A+Q249R□	4	9	n.d.
E1SPPRRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	5	9	n.d.
E1SPPRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A□	5	9	n.d.
E1SPPRRP+Y53C+D57G+N94K+D96L+K127C+Q249R□	5	9	n.d.

E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+D137G+V187A+Q249R□	4	10	n.d.
E1SPRRRP+N94K+D96L+Q249R□	5	10	n.d.
E1SPRRRP+N94K+D96L+E99K□	5	10	n.d.
E1SPRRRP+N94K+D96L+E99K+Q249R□	5	10	n.d.
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+Q249R□	6	10	13
E1SPRRRP+I90F+D96L+E99K+V187A□	6	10	15
E1SPIRPRP+N94K+D96L+L97M+Q249R□	6	10	n.d.
E1SPRRRP+N94K+D96L+Q249R□	6	10	n.d.
APPPRPRLLPIS+D5E+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R*	6	10	n.d.
E1SPIRPRP+D137G+D167G+E210V+W221L□	7	10	13
E1SPPPRRRP+N94K+D96L+L97M+Q249R□	7	10	n.d.
E1SPIRPRP+N94K+D96L+Q249R□	7	11	n.d.
E1SPIRPRP+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R□	7	13	16

## BEISPIEL 8

**[0502]** Die Erstwaschaktivität eines lipolytischen Erstwaschenzyms wurde unter Verwendung des vorstehend im Abschnitt Materialien und Verfahren beschriebenen „Test zum Testen auf Erstwascheffekt“ mit einer Anordnung von im Handel erhältlichen Detergenzien getestet. Die schon in den Detergenzien vorliegenden Enzyme wurden durch Wärme (4 Minuten bei 85°C im Mikroofen) vor der Waschung inaktiviert.

**[0503]** Die Lipolasevariante E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R, die wie in Beispiel 2 beschrieben in *Aspergillus oryzae* hergestellt wurde, wurde verwendet.

**[0504]** Die folgenden verschiedenen geographischen Bedingungen wurden verwendet:

Europa: Zeit: 20 min.  
 Temperatur: 30°C  
 Wasserhärte: 3,2 mM Ca<sup>2</sup>/Mg<sup>2</sup> (5:1) bei 18°dH

USA: Zeit: 10 min.  
 Temperatur: 30°C  
 Wasserhärte: 1,07 mM Ca<sup>2</sup>/Mg<sup>2</sup> (5:1) bei 6°dH

<b>E1SPIRPRP+D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R<sup>□</sup></b> <b>in US-Detergenzien</b>		
Detergenz	dR bei 0,25mg/l	dR bei 1,00 mg/l
Wisk HDL (2 g/l)	3	5
Wisk mit Bleiche (1 g/l)	3	7
Surf mit Bleiche (1 g/l)	1	4
Tide HDL (2 g/l)	1	4
Tide mit Bleiche (1 g/l)	2	5

<b>E1SPIRPRP+D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R<sup>□</sup></b> <b>in europäischen Detergenzien</b>		
Detergenz	dR at 0,25mg/l	dR at 1,00 mg/l
Ariel Futur (5 g/l) UBA 06731122	6	12
Ariel Futur color (5 g/l) UBA 06730101	7	11
Tandil Ultra Plus (5 g/l) UBA 02500191	4	12

Tandil Ultra Plus Color (5g/l) UBA 05761612	5	13
Sunil Aktiv (5.5 g/l) UBA 05580168	4	15
Sunil Aktiv Citrus (5.5 g/l) UBA 05580168	3	13
Sunil Aktiv Color (5.5 g/l) UBA 05580169	4	13
Persil Megapearls (5 g/l) UBA 04163661	2	12
Persil Megapearls Color (5 g/l) UBA 04163662	3	16

## BEISPIEL 9

HERSTELLUNG EINER ERSTWASCHLIPASE IN *F. GRAMINARUM*

## Stämme und Medien

**[0505]** Der Ausgangsstamm ist *Fusarium graminearum* A3/5 (ATCC 20334).

**[0506]** COVE-Platten bestehen aus 343,3 g Saccharose, 20 ml COVE-Salzlösung, 10 ml 1 M Acetamid, 10 ml 3 M CsCl und 25 g Edel-Agar pro Liter. Die COVE-Salze (50X)-Lösung; besteht aus 26 g KCl, 26 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 76 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 50 ml COVE-Spurenmetalllösung. COVE-Spurenmetalllösung besteht aus 0,04 g  $\text{NaB}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ , 0,040 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,70 g  $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,80 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  und 10 g  $\text{ZnSO}_4$  pro Liter.

**[0507]** M400Da-Medium besteht aus 50 g Maltodextrin, 2,0 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,0 g Zitronensäure, 8,0 g Hefeextrakt, 2,0 g Harnstoff, und 0,5 ml Spurenmetalllösung pro Liter. Das Medium wird auf pH 6,0 mit 5 N NaOH eingestellt. Die Spurenmetalllösung besteht aus 14,3 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 13,8 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 8,5 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , und 3,0 g Zitronensäure pro Liter.

Konstruktion der lipolytischen Enzymvariante HL A von *H. lanuginosa* (EISPIRPRP + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R) Expressionsplasmid für *Fusarium graminearum*

**[0508]** Die Konstruktion eines Expressionsplasmids für *Fusarium graminearum* ist in [Abb. 7](#) umrissen.

**[0509]** Insbesondere wird eine *Fusarium*-Expressionskassette unter Verwendung der Technik von überlappender PCR (Higuchi R., In Innis, M. G. Gelfond, D. H., Snisky J. J., und White T. J., Hrsg., PCR-Protocols: A Guide to Methods and Applications, S. 177–183, Academic Press, Inc., New York) zum Kondensieren des Trypsin-Promotors mit 1,24 kb von *Fusarium oxysporum* an den Trypsin-Terminator mit 1,1 kb von *Fusarium oxysporum* (Royer et al., 1995 Bio/Technology 13: 1479–1483) hergestellt. Eine Polylinker-Region, enthaltend Swal, KpnI und PacI-Restriktionsstellen wird zwischen den Promotor und Terminator als Teil der überlappenden PCR-Reaktion eingefügt. An das 5'-Ende des Promotors wird eine XhoI-Stelle gefügt, und die native EcoRI-Stelle wird geschützt. An das 3'-Ende des Terminators werden EcoRI-, HindIII- und NsiI-Stellen durch PCR-Reaktion eingebracht.

**[0510]** Ein PCR-Fragment, enthaltend –1208 bis –1 des Trypsin-Promotors von *Fusarium oxysporum* plus einen Polylinker mit 25 bp, wird aus Plasmid pJRoy20 (Royer et al., 1995, vorstehend) unter Verwendung der folgenden Primer gebildet:

*XhoI* *EcoRI* 5'- Promotor-Ende

Vorwärts-Primer 1: 5'-gagctcgagGAATTCTTACAAACCTTCAAC-3'

*PacI* *KpnI* *SwaI* 3'- Promotor-Ende

Rückwärts- Primer 2: 5'-

ttaattaaggtacctgaatttaaatGGTGAAGAGATAGATATCCAAG-3'

**[0511]** Bei den Großbuchstaben handelt es sich um die native Sequenz des Trypsin-Promotors von *Fusarium oxysporum*.

**[0512]** Die verwendeten PCR-Bedingungen sind 95°C für eine Dauer von 3 Minuten, gefolgt von 25 Zyklen, jeder bei 95°C für eine Dauer von 30 Sekunden, 50°C für eine Dauer von 1 Minute und 72°C für eine Dauer von 1 Minute. Der Endverlängerungs-Zyklus erfolgt bei 72°C für eine Dauer von 5 Minuten. Pwo-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) wird mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

**[0513]** Ein PCR-Fragment, enthaltend -5 bis -1 des Trypsin-Promotors von *Fusarium oxysporum*, den Polylinker mit 25 bp und die 3'-untranslatierte Region mit 1060 bp des Trypsin-Gens von *Fusarium oxysporum* (Terminator-Region), wird aus Plasmid pJRoy20 unter Verwendung der folgenden Primer gebildet:

Promotor *SwaI* *KpnI* *PacI* 5'-Terminator-Ende

Vorwärts-Primer 3: 5'-TCACCatttaaattcaggtaccttaattaa-  
ATTCCTTGTTGGAAGCGTCGA-3'

*NsiI* *HindIII* *EcoRI* 3'- Terminator-Ende

Rückwärts-Primer 4: 5'-tggtatgcataagcttgaattc-  
AGGTAAACAAGATATAATTT-3'

**[0514]** Bei den Großbuchstaben handelt es sich um die native Sequenz des Trypsin-Promotors und -Terminators von *Fusarium oxysporum*. Die verwendeten PCR-Bedingungen sind wie vorstehend beschrieben.

**[0515]** Das endgültige überlappende PCR-Fragment mit 2,3 kb, das -1208 bis -1 des Trypsin-Promotors von *Fusarium oxysporum*, den Polylinker mit 25 bp und den Trypsin-Terminator mit 1060 bp von *Fusarium oxysporum* enthält, wird unter Verwendung von 0,2 µl der ersten PCR (Promotor)-Reaktion und 3 µl der zweiten (Terminator) Reaktion als Templat und der Primernummer 1 und 4 hergestellt. Die verwendeten PCR-Bedingungen sind 95°C für eine Dauer von 3 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen, jeder bei 95°C für eine Dauer von 30 Sekunden, 62°C für eine Dauer von 1 Minute und 72°C für eine Dauer von 3 Minuten. Der letzte Verlängerungszyklus ist 5 Minuten bei 72°C. Pwo-DNA-Polymerase wird ebenso für diese Reaktion verwendet.

**[0516]** Die erhaltene Bande mit 2,3 kb wird mit *XhoI* und *NsiI* abgeschlossen und in Plasmid pBaNe6 geklont, das teilweise mit *NsiI* und zur Vollendung mit *Sall* aufgeschlossen wird. Eigentlich werden die Promotor- und Terminatorsequenzen von *Aspergillus* von pBaNe6 mit dem Trypsin-Promotor und den Terminatorsequenzen von *Fusarium oxysporum* ersetzt. Das erhaltene Konstrukt (pDM174.3) wird mit *SwaI* und *PacI* aufgeschlossen.

**[0517]** Die nachstehend dargestellten DNA-Primer HLIP-A und HLIP-B werden in einer PCR-Reaktion. zum Amplifizieren des HLA-Lipase-Gens von Plasmid pJVi220 verwendet:

HLIP-A (Primer 5): 5'-cccatttaaATGAGGAGCTCCCTTGTGCTG-3'

HLIP-B (Primer 6): 5'-cccttaattaaCTAAAGACATGTCCCAATTAA-3'

**[0518]** Die Großbuchstaben stellen die Sequenzen im Lipasegen dar.

**[0519]** Die PCR wird in einer Reaktion mit 50 µl, enthaltend 50 ng pHLA, 0,05 mM jedes von dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 100 pmol jedes von HLIP-A und HLIP-B, 1X PwoI-Puffer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) und 2,5 Einheiten PwoI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind 95°C für eine Dauer von 3 Minuten, 30 Zyklen, jeder bei 95°C für eine Dauer von 1 Minute, 60°C für 1 Minute und 72°C für eine Dauer von 1,5 Minuten und dann 72°C für eine Dauer von 5 Minuten. Das PCR-Reaktionsgemisch wird über ein Agarosegel geleitet und die HLA-DNA-Bande mit ca. 0,9 kb exzidiert. Die DNA wird durch Anlösung der Agarose mit 3 Volumen Qia-ex-Anlösungspuffer (Qiagen, Los Angeles, CA), gefolgt von einer Qiaquick-PCR-Spin-Säule gemäß den Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Los Angeles, CA) gereinigt. Die DNA wird in 50 µl 1 mM EDTA-10 mM Tris pH 8 wiedergewonnen. Ein Aliquot mit 20 µl der DNA wird in ein Endvolumen von 25 µl, enthaltend 1X Restriktionsenzym-Puffer und Restriktionsenzyme PacI und SmaI, wie vom Hersteller vorgeschlagen, geschnitten. Das Reaktionsgemisch wird dann bei 80°C für eine Dauer von 10 Minuten erwärmt. Ein µl des PacI/SmaI-geschnittenen HLA-Lipase-Gens wird in PacI/SmaI-geschnittenes Plasmid pBAnE6 gebunden. Das Bindungsgemisch wird zum Transformieren von Stamm-DH5a von *E. coli* verwendet. Das Plasmid, enthaltend pBAnE6 und die HLA-Sequenzen, wird als pJeRS33 bezeichnet.

**[0520]** Das SmaI/PacI-HLA-Fragment mit 0,9 kb von pJeRS33 wird in den SmaI/PacI-aufgeschlossenen pDM174.3-Vektor zum Bilden von Plasmid pDM177 geklont.

#### Transformation von *Fusarium graminearum*

**[0521]** Den Stamm A3/5 von *Fusarium graminearum* (ATCC 20334) lässt man auf Petrischalen mit 10 × 15 mm an Vogel-Medium (Vogel, 1964, Am. Nature 98: 435–446) plus 1,5% Glucose und Agar für eine Dauer von 3 Wochen bei 25°C wachsen. Conidia (etwa 10<sup>8</sup> pro Platte) werden in 10 ml sterilem Wasser unter Verwendung einer Transfer-Schlinge entfernt und durch Filtration durch vier Schichten Käsestoff und schließlich durch eine Schicht Miracloth gereinigt. Conidiale Suspensionen werden durch Zentrifugation eingengt. 50 ml YPG-Medium, zusammengesetzt aus 1% Hefeextrakt, 2% Bactopepton und 2% Glucose, werden mit etwa 100 Conidia beimpft und für eine Dauer von 14 Stunden bei 24°C, 150 UpM, inkubiert. Die erhaltenen Hyphen werden auf sterilen Filtern mit 0,4 mm aufgefangen und aufeinanderfolgend mit sterilem destilliertem Wasser und 1,0 M MgSO<sub>4</sub> gewaschen. Die Hyphen werden in 10 ml einer Lösung (2–10 mg/ml in 1,0 M MgSO<sub>4</sub>) von NOVOZYM 234™ (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dänemark) resuspendiert und für eine Dauer von 15 bis 30 Minuten bei 34°C mit einer Rührung bei 30 UpM aufgeschlossen. Unaufgeschlossenes hyphales Material wird aus der erhaltenen Protoplastsuspension durch aufeinander folgende Filtration durch 4 Schichten Käsestoff und Miracloth entfernt. 20 ml 1 M Sorbit werden durch den Käsestoff und Miracloth geleitet und mit der Protoplastlösung kombiniert. Nach Mischen werden die Protoplasten (etwa 5 × 10<sup>8</sup>) durch Zentrifugation in Pelletform gebracht und aufeinanderfolgend durch Resuspension und Zentrifugation in 20 ml 1 M Sorbit und in 20 ml STC (0,8 M Sorbit, 0,05 M Tris pH 8,0, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>) gewaschen. Die gewaschenen Protoplasten werden in 4 Teilen STC und einem Teil SPTC (0,8 M Sorbit, 40% PEG 4000, 0,05 M Tris, pH 8,0, 0,05 M CaCl<sub>2</sub>) mit einer Konzentration von 1 bis 2 × 10<sup>8</sup>/ml resuspendiert. 100 µl Protoplast-Suspension werden zu 3 µg pDM177-DNA und 5 µl Heparin (5 mg/ml in STC) in Polypropylen-Röhrchen (17 × 100 mm) zugeetzt und auf Eis für eine Dauer von 30 Minuten inkubiert. 1 ml SPTC wird sanft in die Protoplastsuspension gemischt und die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Dauer von 20 Minuten fortgesetzt. 15 ml geschmolzene Lösung (abgekühlt auf 40°C), bestehend aus COVE-Salzen, 0,8 M Saccharose und 1% niedrig schmelzender Agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) werden mit den Protoplasten gemischt und dann auf eine COVE-Agar enthaltende Petrischale mit 150 mm aufgetragen. Die Inkubation wird bei Raumtemperatur für eine Dauer von 10 bis 14 Tagen fortgesetzt.

#### Expression von Lipaseaktivität

**[0522]** 5 pDM177-Transformanten von *Fusarium graminearum* A3/5 werden auf M400Da-Medium in Schüttelkolben für eine Dauer von 7 Tagen bei 30°C gezüchtet. Als Kontrollkultur lässt man einen A3/5-Transformanten von Plasmid pDM155 (Royer et al., 1995 Bio/Technology 13: 1479–1483), der die Lipase vom Wildtyp von *Humicola lanuginosa*, eingefügt zwischen dem Trypsin-Promotor und Terminator von *Fusarium oxysporum*, enthält, gleichzeitig unter denselben Bedingungen wachsen.

#### Erstwaschaktivität von HLA

**[0523]** Die vorstehend hergestellte Lipase sowie die analoge Lipase (tragend dieselben Mutationen, jedoch hergestellt in *A. oryzae*) wurden im hier beschriebenen „Test zum Testen von Erstwascheffekt“ unter Verwendung von Enzym-inaktiviertem Ariel Futur getestet. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:



	dR bei	
	1250 LU/l	12500 LU/l
<i>A. oryzae</i>	8	15
<i>F. graminearum</i>	9	14

## BEISPIEL 10

Konstruktion von Mutanten von *Absidia reflexa*

## Materialien und Verfahren

**[0524]** Die Stämme und Plasmide sind in dem den Beispielen vorangehenden Abschnitt Materialien und Verfahren aufgelistet.

**[0525]** Primer: Primer TiK57, Primer TiK58, Primer TiK59, Primer TiK60, Primer TiK 61, Primer TiK62, Primer TiK64, Primer Tik66, Primer TiK72, Primer TiK74, Primer Tik75, Primer TiK76.

Bausätze, Lösungen, Medien und dergleichen:

Taq-DNA-Polymerase (Promega)

LB-Medium, ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin

DNA-Maxi-Prep-Kit (QIAGEN)

Polyethylenglycol/LiOAc-Hefe-Transformations-Kit (Yeastmaker, Clontech).

Hefe-Stickstoff-Base w/o [= without] Aminosäuren (Difco 0919-15-3)

Casaminosäuren (Difco 0230-01-1)

Bacto-Agar (Difco)

YPG-Medium (20 g Kasein-Pepton und 10 g Hefeextrakt (Difco))

LB-Medium, ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin

## Ausrüstung

Applied Biosystems 373 DNA-Sequenzierer

Celluloseacetat-Filter (Schleicher-Schüll)

## SYC-Platten

**[0526]** 13,6 g NaOH und 22,6 g Bernsteinsäure werden in 500 ml H<sub>2</sub>O gelöst, 15 g Hefe-Stickstoff-Base w/o (ohne) Aminosäuren (Difco 0919-15-3), 10 g Casaminosäuren (Difco 0230-01-1), 20 ml einer 2%igen Threoninlösung und 20 ml einer 1%igen Tryptophanlösung werden zugesetzt. Die Lösung wird auf 1 Liter mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Zur Herstellung des Flüssigmediums wird 1 Liter SYC durch Zugabe von 200 ml einer 20%igen Glucoselösung und 800 ml H<sub>2</sub>O verdünnt. Zur Herstellung von Agarplatten wird 1 Liter SYC bei 60°C mit 800 ml Bacto-Agar (37,5 g Bacto-Agar (Difco)), gelöst in 1 Liter H<sub>2</sub>O und 200 ml einer 20%igen Glucoselösung, verdünnt.

## Brilliant-Green-Test

**[0527]** Zur Herstellung von BG-Agarplatten werden 10 g Agarose durch Erwärmen in 500 ml eines 100 mM Tris-Cl-Puffers, pH 9,0, gelöst. Diese Agaroselösung wird bei 60°C mit 24 ml einer Olivenölemulsion (8 ml Olivenöl (Sigma) und 16 ml einer 2%igen Polyvinylalkohollösung (Sigma) in H<sub>2</sub>O gemischt und gründlich auf Eis mit einem Ultra-Turrax T25 homogenisiert), 10 ml einer Brilliant-Green-Stammlösung (4 mg/ml H<sub>2</sub>O), 465 ml 100 mM Tris-Cl-Puffer, pH 9,0, enthaltend 6,45 g des Detergenzes und 1,4 ml einer 250 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt.

**[0528]** Man lässt transformierte Hefekolonien für eine Dauer von 3 Tagen bei 30°C auf sterilen Celluloseacetatfiltern (Schleicher-Schüll) auf SYC-Agarplatten wachsen. Die Filter werden dann auf die BG-Agarplatten überführt und für eine Dauer von 2–8 Stunden bei 37°C inkubiert. Kolonien, die einen grünen Fleck im Agar bilden, werden als positiv bewertet.

## Restriktionsenzym-Analyse und Sequenzieren von Mutanten-Genbanken

**[0529]** Die wiedergewonnene Plasmid-DNA wurde dem NcoI-Aufschluss unterzogen. Korrekte Klone ergaben zwei Fragmente mit 2,9 und 3,1 kb. Die Plasmid-DNA wurde anschließend entweder durch den Farbstoff-Terminator-PCR-Zyklus sequenziert oder auf einer DNA-Sequenzierapparatur des Typs Applied Biosystems 373 sequenziert. Im Falle von Klonen, die von den Genbanken 3 und 4 (Tabelle 1) isoliert wurden, wurden die Oligonukleotide TiK61 und TiK66 zum Doppelstrang-Sequenzieren verwendet, wohingegen für die Genbanken 7 und 8 TiK62 und TiK72 angewandt wurden.

## Beispiel 10A

Konstruktion von Lipaseexpressionsvektoren von *Absidia reflexa* ATTC 44896

**[0530]** Zwei Vektoren wurden zur Expression der Lipase vom Wildtyp von *Absidia reflexa* ATTC 44896 (mit/ohne SPIRR-Peptidverlängerung) in *Saccharomyces cerevisiae* konstruiert.

**[0531]** Der cDNA-Klon, der die reife Lipase von *Absidia reflexa* ATTC 44896 (SEQ ID Nr. 13 und [Abb. 1](#)) kodiert, wurde ( $T_a = 50^\circ\text{C}$ , 25 Zyklen, 5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase) unter Verwendung entweder des Primerpaars TiK57/59 (bereitstellend eine N-terminale SPIRR-Verlängerung) oder des Primerpaars TiK58/59 (ohne SPIRR-Verlängerung) PCR-amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden über NheI/XbaI-Stellen in den Hefe-Expressionsvektor pJSO37 (mit einer NheI-Stelle eingebracht, stromabwärts des Signalpeptids) gebunden, die die Region beherbergte, die eine aktive Lipase von *H. lanuginosa* in der ursprünglichen BamHI/XbaI-Klonstelle kodiert.

**[0532]** Das die aktive Lipase von *H. lanuginosa* kodierende Gen wurde durch die Einbringung einer NheI-Stelle stromabwärts der BamHI-Stelle (siehe [Abb. 2](#)) modifiziert. Da die NheI- und XbaI-Stellen kompatibel sind, wurde der Vektor vor der Bindung mit alkalischer Phosphatase behandelt. Schließlich wurden zwei Vektorkonstrukte, nämlich pTiK04, der die SPIRR-Verlängerung nur stromaufwärts des Starts des reifen Lipase-Gens einschließt, und pTiK05, der keinen die SPIRR-Verlängerung kodierenden Teil enthält, erhalten. In beiden Fällen wurde die ursprüngliche Signalsequenz der Lipase von *Humicola lanuginosa* zwischen den BamHI- und NheI-Stellen konstant gehalten.

MF $\alpha$ 1-Signalsequenzkonstrukte

**[0533]** Die Lipasesignalsequenz von *H. lanuginosa* wurde durch den Paarungsfaktor  $\alpha$ 1-Signal ersetzt.

**[0534]** Die Genom-DNA des Hefestamms YPH499 (Stratagene) wurde gemäß Standardprotokollen hergestellt (Ausubel et al., (1995). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons). Ein  $\mu\text{g}$  genomischer DNA wurde einer PCR ( $T_a = 50^\circ\text{C}$ , 25 Zyklen, 5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase) mit dem Primerpaar TiK74/75 unterzogen. Das amplifizierte MF $\alpha$ 1-Signalsequenzfragment ([Abb. 3](#)) wurde in pTiK04 und pTiK05 über die BamHI- und NheI-Stellen eingefügt, um pTiK06 bzw. pTiK07 zu erhalten.

## Beispiel 10B

Konstruktion von Lipasevarianten von *Absidia reflexa* ATTC 44896 durch Mutagenese mit aufgespuschten Oligonukleotiden

**[0535]** Vier Genbanken wurden mit aufgespuschten Oligonukleotiden konstruiert.

**[0536]** In den Genbanken A und B (siehe nachstehende Tabelle 1) wurden zufällige Mutationen der mutmaßlichen Abdeckregion der Lipase ATTC 44896 eingebracht. In Genbank A wurde die SPIRR-Sequenz konstant gehalten, in Genbank B wurde sie weggelassen.

**[0537]** Die Genbanken C und D wurden mit Mutationen in zwei mutmaßlichen Lipidkontaktzonen in den N-Terminus von *Absidia reflexa* ATTC 44896 konstruiert. In Genbank C wurde die SPIRR-Sequenz wieder konstant gehalten.

**[0538]** Die Mutagenese der mutmaßlichen Abdeckregion des Lipase-Gens von *Absidia reflexa* ATTC 44896 (Aminosäurepositionen 82–99) wurde durch Standard-PCR (Sambrook et al., (1989), Molecular cloning – A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) mit 5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase durchgeführt.

lymerase mit dem Primer-Paar TiK60/TiK64 bei  $T_a = 50^\circ\text{C}$  und 25 Zyklen unter Verwendung von pTiK05 als Template durchgeführt. In einer zweiten Standard-PCR unter Verwendung von Primer TiK62 und des mit Agarosegel gereinigten DNA-Fragments, gebildet in der ersten PCR, wurde das gesamte Lipase-Gen von *Absidia reflexa* ATTC 44896 unter Verwendung derselben Amplifikationsbedingungen wie für die erste PCR wiederhergestellt. Im Gegensatz zu der ersten PCR wurden pTiK04 oder pTiK05 als Template ausgewählt, so dass Genbanken (mit/ohne SPIRR N-terminaler Verlängerung) erhalten wurden.

**[0539]** Zur Mutagenese der Aminosäurepositionen 30 bis 45 wurden die Primer TiK76 und TiK64 für die erste PCR verwendet. Die zweite PCR war im Prinzip mit der vorstehend beschriebenen identisch.

**[0540]** Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden in pJSO37 über die BamHI/XbaI-Stellen gebunden. Die Transformation von *E. coli* und anschließend von kompetenten YNG318-Hefezellen wurde wie vorstehend beschrieben durchgeführt.

Tabelle 1: Zusammenfassung der konstruierten und gescreenten Mutant-Genbanken von *Absidia reflexa* ATTC 44896

Nr.	Kommentare und mutagenisierte Regionen	Genbank-Größe in <i>E. coli</i>	Gescreente Kolonien von <i>S. cerevisiae</i>	Positive in BG-Test bei X g/l Detergenz	Positive in BG-Test bei X g/l 2. Runde	Restriktionsenzym-Analyse
A	Abdeckung (Pos. 82-99) (.SPIRR)	$8 \times 10^6$	180000	21 bei 3 g/l	9 bei 3 g/l	6
B	Lid (pos.)	$7 \times 10^6$	200000	1 bei 6 g/l	0 bei 6 g/l	-

	82-99)			5 bei 3 g/l	2 bei 3 g/l	2
C	Pos. 30-45 (.SPIRR)	$1 \times 10^6$	160000	38 bei 3 g/l	4 bei 3 g/l	3
D	Pos. 30-45	$6 \times 10^5$	170000	27 bei 3 g/l	2 bei 3 g/l	1

Beispiel 10C

Screenen der Lipasemutant-Genbanken von *Absidia reflexa* ATTC 44896 und Gewinnung von Plasmiden von positiven Kolonien

**[0541]** Transformierte Hefezellen, die wie in Beispiel 10B beschrieben erhalten wurden, wurden auf einen Zelluloseacetatfilter auf einer SYC-Agarplatte mit 14 cm gesprüht. Nach selektivem Wachstum von Transformanten und Überführen des Filters auf BG-Agarplatten wurden positive Kolonien aufgenommen, in  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und wieder auf Zelluloseacetatfilter auf SYC-Agarplatten gesprüht, um eine zweite Konfirmationsrunde des BG-Tests zu gewähren (siehe Abschnitt Materialien und Verfahren).

**[0542]** Positive Klone aus der zweiten Runde wurden in 20 ml SYC-Medium überführt und für eine Dauer von 2 Tagen bei  $30^\circ\text{C}$  geschüttelt. Plasmid-DNA wurde von 1,5 ml dieser gesättigten Hefekultur gemäß dem Stan-

dard Phenol/Glasperlen-Verfahren (Ausubel et al., (1995), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons) hergestellt.

**[0543]** Ein Aliquot des Plasmidpräparats wurde in DH10B-Zellen von *E. coli* elektrophoriert, die dann auf LB-Agarplatten, ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin, aufgetragen wurden. Die DNA der Kolonien wurde isoliert und für eine Restriktionsenzym-Analyse und Sequenzieren, wie vorstehend im Abschnitt Materialien und Verfahren beschrieben, angewandt.

#### Sequenzieren

**[0544]** Das Sequenzieren von 15 zufällig aufgefangenen Klonen in Genbank A und B zeigte, dass das ausgewählte Aufpuschen von 10% schließlich zu Folgendem führte:

20% vom Wildtyp,  
13% mit einer Aminosäureauswechslung,  
20% mit 2 Auswechslungen,  
13% mit 3,  
20% mit 4,  
0% mit 5 und  
13% mit 6 Aminosäureauswechslungen pro Molekül.

**[0545]** Aus Genbank A wurden 6 Klone von  $1,8 \times 10^5$  gescreenten Kolonien mit 3 g/l Detergenz im BG-Test (einer pro jeweils  $3 \times 10^4$  gescreent) isoliert, und aus Genbank B wurden zwei Klone von  $2,0 \times 10^5$  gescreenten Kolonien (eine pro jeweils  $1,5 \times 10^5$  gescreent, Tabelle 1) isoliert. Die zur Kenntnis genommenen Sequenzunterschiede dieser 8 Klone sind in nachstehender Tabelle 2 dargestellt.

**[0546]** Wie vorstehend erwähnt, wurden die Genbanken C und D mit Mutationen in zwei mutmaßlichen Lipidkontaktzonen im N-Terminus der Lipase von *Absidia reflexa* ATTC 44896 konstruiert. Das Sequenzieren von 13 zufällig aufgenommenen Klonen zeigte, dass das ausgewählte Auspuschen von 10% zu Folgendem führte:

8% vom Wildtyp,  
15% mit einer Aminosäureauswechslung,  
46% mit 2 Auswechslungen,  
15% mit 3 und  
15% mit 4 Auswechslungen pro Molekül.

**[0547]** Aus Genbank C wurden 3 Klone aus  $1,6 \times 10^5$  gescreenten Kolonien bei 3 g/l Detergenz im BG-Versuch (1 Positive pro jeweils 53333 gescreenten) erhalten, und aus Genbank D konnte ein positiver Klon von  $1,7 \times 10^5$  (Tabelle 1) isoliert werden. Die Sequenzen dieser 4 Klone sind ebenso in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Sequenzen von verbesserten Varianten von *Absidia reflexa* ATTC 44986  
Zielsequenz

[illegible]

		30	45
		<u>R T V I P G G R W S C P H C G</u>	<u>V</u>
C	701	WN	
	702	WN	
	703		C
	...Q4R		
D	801		

...V95E

### Beispiel 10D

## Expression von Varianten von *Absidia reflexa* ATTC 44896 und Messung der Lipaseeinheiten

**[0548]** Vier der verbesserten Mutanten, die aus Genbank A identifiziert wurden, wurden der Messung von LU, abgegeben in das Kulturmedium, sowie LU-Messung der rohen Cytosol/Membran-Fraktion unterzogen.

**[0549]** 10 ml YPG-Medium wurden in 900 ml H<sub>2</sub>O gelöst, autoklaviert und 100 ml einer 20%igen Glucoselösung zugesetzt, wurden mit 1 ml einer gesättigten Hefekultur in SYC-Medium beimpft. Die Kultur wurde bei 30°C für eine Dauer von 2 Tagen geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 Minuten × 4000 g) geerntet und der Überstand auf Eis zur LU-Messung aufbewahrt. Das Zellpellet wurde mit Novozym™234 zur Spheroplast-Herstellung behandelt und unter Verwendung des Glasperlen-Verfahrens (Ausubel et al., (1995), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons) lysiert. Die erhaltene rohe Cytosolfraktion, die auch die Membranfraktion einschloss, wurde sofort für die LU-Messung (siehe den Abschnitt Materialien und Verfahren) angewandt, um die proteolytische Zersetzung zu minimieren.

**[0550]** Das Ergebnis ist in Tabelle 3 dargestellt. Die vier Klone zeigten eine schwache, aber deutliche LU in der Cytosol/Membran-Fraktion. Außerdem konnten von zwei dieser vier Klone schwache LU-Signale aufgezeichnet werden. Alle Daten, die sich von 0,0 LU/ml unterschieden, sind deutliche Enzymaktivitäten, wie durch wiederholte Messungen festgestellt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der erhaltenen Lipaseeinheit, abgegeben in ein Medium oder gemessen von der Cytosolfraktion der Varianten von ATTC 44896 aus Genbank A

**[0551]** Die Standardabweichung beträgt 10%.

Probe	Lipaseeinheiten im Überstand (LU/ml)	Lipaseeinheiten in Cytosol (LU/ml)
YNG318 (Negativkontrolle)	0,0	0,0
303	0,0	1,0
309	0,0	0,5
312	1,7	0,6
321	0,6	1,0

## BEISPIEL 12

## Substrataffinität für lipolytische Enzyme

**[0552]** Ein Verfahren wurde für einen einfachen Vergleich der Fähigkeit von lipolytischen Enzymen zum Akkumulieren auf/in eine Substratphase (Olivenöl, einschließlich FFA) bei alkalischem pH-Wert (pH 9,0) und in Gegenwart des nichtionischen oberflächenaktiven Mittels Dobanol 25-7 (100 ppm) (d. h. ein Maß für Substrataffinität) entwickelt.

## Verfahren

1. Zwei identische Pufferlösungen (5 ml) werden in 20 ml verschließbaren Flaschen hergestellt („Probe“ (s) und „Bezug“ (r)).
2. Enzym wird der „Probe“ und dem „Bezug“ zugeführt und die Lipasekonzentration bestimmt (X LU/ml).
3. Olivenöl wird der „Probe“ zugeführt und beide Lipaselösungen werden kräftig geschüttelt. Inkubation bei 4°C über Nacht.
4. Die übrige Lipasekonzentration in den wässrigen Phasen wird nach Inkubation bestimmt (Y<sub>i</sub> LU/ml; i = r, s).

## Zusammenfassung der Inkubationsbedingungen

Puffer: 100 mM Glycin (5 ml).

pH: 9,0.

Substrat: Olivenöl (5 ml).

Dobanol 25-7: 100 ppm.

T: 4°C.

Lipase: 5–10 LU/ml.

Inkubation: über Nacht (24–26 Stunden).

## Bewertung der Daten

**[0553]** Das Ergebnis nach dem Experiment wird durch Vergleichen des Aktivitätsverlusts durch Inkubation in der wässrigen Phase in Kontakt mit Olivenöl mit dem Aktivitätsverlust in der wässrigen Phase in Abwesenheit von Olivenöl berechnet:

$$\alpha = Y_s/Y_r \text{ (siehe vorstehend)}$$

Ergebnisse  
Tabelle 11

Lipase	$\alpha$ (%)
--------	--------------

---

Lipolase <sup>TM</sup>	95%
D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R	65%
SPIRPR+E1P+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R	45%
SALRPRK+D57G+N94K+D96L+L97M+Q249R	25%
SPIRPR+E1P+D137G+D167G+E210V+W221L	50%

---

**[0554]** Ein Vergleich der vorstehend dargestellten Ergebnisse mit den in den Beispielen 5 bis 8 offenbarten Waschdaten zeigt deutlich, dass Lipolasevarianten mit erhöhter Erstwaschleistung im Allgemeinen eine erhöhte Substrataffinität, verglichen mit Lipolase, aufweisen.

## BEISPIEL 13

Lokalisierte Zufallsmutagenese der Lipase von *Pseudomonas* sp. (Liposam)

**[0555]** Ein geeignetes Aufpuschschemata zur Verwendung zum Einbringen von Mutationen, von welchem erwogen wird, dass es zu einer Erstwaschaktivität der vorstehenden Lipase führt, kann lokalisierte Zufallsmutagenese in dem gesamten oder in Teilen einer oder mehrerer der folgenden Regionen umfassen. 93 Gew.-%/7% zufällig bedeutet, dass die jeweiligen Kodons mit 93 Gew.-% Nukleotiden und 7% der anderen 3 Nukleotide in den zum Konstruieren der zufällig mutagenisierten Genbank verwendeten Oligonukleotide synthetisiert werden. Gleichmaßen für 90 Gew.-%/10% zufällig.

In der Aminosäureregion 17–37:

Aminosäureposition 17–18 + 20–24 + 26–29 + 32–37: 93 Gew.-%/7% zufällig M19: aufgepuscht zum Erhalt von vorzugsweise L, I, F

In derselben Region 109–161:

Aminosäureposition 109–118: 93 Gew.-%/7% zufällig

Aminosäureposition 120 + 123–137 + 139–161: 90 Gew.-%/10% zufällig

In der Aminosäureregion 208–239:

Aminosäureposition 208–212 + 214–215 + 217–231 + 233–239: 90 Gew.-%/10% zufällig

In der Aminosäure-Region 253–271:

Aminosäureposition 253 + 255 + 259–268 + 270–271: 90 Gew.-%/10% zufällig

V258: 90 Gew.-%/10% zufällig, jedoch so aufgepuscht, dass es keine positiv geladene Aminosäure ist.

**[0556]** Die lokalisierte Zufallsmutagenese kann wie im Abschnitt Materialien und Verfahren und in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt werden, und die erhaltenen Mutanten können auf eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine erhöhte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente und nach Erstwaschaktivität gescreent werden. Anschließend und gegebenenfalls kann eine lokalisierte Zufallsmutagenese der erhaltenen Mutanten wiederholt und/oder die Gene können dem hier offenbarten Gen-Schieben unterzogen werden.

## IN DER BESCHREIBUNG ZITIERT LITERATURANGABEN

Muhlrad et al., 1992, Yeast, Bd. 8, 79–82

Shimada, Y., et al. (1989), cDNA Molecular Cloning of *Geotrichum candidum* Lipase, J. Biochem., 106, 383–388,

Hunkapiller et al., 1984, Nature 310: 105–111

R. Higuchi, B. Krummel, and R. K. Saiki (1988), A general method of in vitro preparation and specific mutagen-

- nesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, Nucl. Acids Res. 16: 7351–7367,
- Yamaguchi. S, et al. (1991), Cloning and structure of the mono- and diglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150, Gene 103, 61–67,
- Hass. M. J. et al. (1991), Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*, Gene 109. 107–113,
- Kugimiya. W. et al. (1992), Cloning and Sequences Analysis of DNA encoding *Rhizopus niveus* Lipase, Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716–719.
- Dartois. V. et al. (1993), Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168, Biochemica et Biophysica acta 1131, 253–260,
- Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989,
- R. K. Saiki et al., Science 239, pp. 487–491, 1988,
- Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22, S. 1859–1869, 1981,
- Matthes et al., The EMBO J, 3, S. 801–805, 1984,
- J. O. Deshler, (1992) A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction, GATA 9 (4): 103–106
- Leung et al., Technique, Bd. 1, Nr. 1, S. 11–15, 1989
- Fowler et al., Molec. gen. Genet., 133, S. 179–191, 1974,
- Brady et al., "A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase", Nature 343, 1990, S. 767–770, 1990,
- Tilbeyrgh. H, van Egloff M.-P., Martinez. C., Rugani, N., Verger, R. and Cambillau (1993) Nature 362, S. 814–820, Interfacial activation of the lipase-prolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.
- Hudson et al., Practical Immunology, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989
- Alber. T. und Kawasaki, G., J. Mol. Appl. Genet 1, 419–434 (1982)
- Joyce, G. F.: Directed Molecular Evolution. Scientific American December 1992, S. 48–55.
- Siderovski, D. P., und Mak T. W.: RAMHA: A pc-based monte-carlo simulation of random saturation mutagenesis. Comput. Biol. Med. 23 (6), S. 463–474, 1993.
- Palzkill T., Le Q.-Q., Venkatachalam K. V., LaRocco M. and Ocera H.: Evolution of antibiotic resistance: several different amino acid substitutions in an active site loop alter substrate profile of b-lactamase. Molecular Microbiology 12 (2), S. 217–229, 1994.
- Ollis, D. L. et al (1992) Prot. Eng. 5, S. 197.
- Svendsen, A. et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta. 1259, S. 9.
- Grochulski, P. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, p. 12843.



## (1) Allgemeine Information:

- (i) Anmelder:
  - (A) Name: Novo Nordisk A/S
  - (B) Strasse: Novo Alle
  - (C) Stadt: Bagsvaerd
  - (E) Land: Dänemark
  - (F) Postleitzahl (PLZ): DK-2880
  - (G) Telefon: +45 4444 8888
  - (H) Telefax: +45 4449 3256
- (ii) Titel der Erfindung: Neuartige lipolytische Enzyme
- (iii) Anzahl der Sequenzen: 100
- (iv) (iv) Computer-lesbare Form:
  - (A) Mediumtyp: Diskette
  - (B) Computer: IBM PC kompatibel
  - (C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPO)

## (2) Information für SEQ ID Nr: 1:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) Länge: 21 Basenpaare
  - (B) Typ: Nukleinsäure
  - (C) Strangart: einzeln
  - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure
  - (A) Beschreibung: /desc = "Primer 3"
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID No. 1:

AGAAATCGGG TATCCTTTCA G

21

## (2) Information für SEQ ID Nr: 2:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) Länge: 30 Basenpaare
  - (B) Typ: Nukleinsäure
  - (C) Strangart: einzeln
  - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure
  - (A) Beschreibung: /desc = "Primer 7258"
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 2:

gaatgacttg gttgacgcgt caccagtcac

30

## (2) Information für SEQ ID Nr: 3:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) Länge: 26 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangart: einzeln

(D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure

(A) Beschreibung: /desc = "Primer 7770"

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 3:

tctagcccag aatactggat caaatc

26

## (2) Information für SEQ ID Nr:4:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) Länge: 53 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangart: einzeln

(D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure

(A) Beschreibung: /desc = "random 1"

(B) Flasche 5: 93% A; 2.33% C; 2.33% G and 2.33% T  
 Flasche 6: 93% C; 2.33% A; 2.33% G and 2.33% T  
 Flasche 7: 93% G; 2.33% A; 2.33% C and 2.33% T  
 Flasche 8: 93% T; 2.33% A; 2.33% C and 2.33% G

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 4:

5'	5	C	G
T	5	C	3'
T	7	A	
A	8	G	
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	
5	6	G	
7	G	A	
8	AA	A	
6	T	C	
7			

## (2) Information für SEQ ID Nr: 5:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) Länge: 93 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strangart: einzeln
- (D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure

- (A) Beschreibung: /desc = "Oligo 2"

Flasche 5: 80% A; 6,66% C; 6,66% G og 6,66 % T.

Flasche 6: 80% C; 6,66% A; 6,66% G og 6,66 % T.

Flasche 7: 80% G; 6,66% A; 6,66% C og 6,66 % T.

Flasche 8: 80% T; 6,66% A; 6,66% C og 6,66 % G.

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 5:

GTCTCTGCGT GGACGGCCTT GGCGGCGCCA CCTCCA67(T/A)  
 66(T/A) 575 66(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) (6/7)(7/8)(C/G)  
 57(C/G) C57 (5/7)5(C/G) CTGT TTAACCAGTT CAATCTC

93

## (2) Information für SEQ ID Nr: 6:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) Länge: 64 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strangart: einzeln
- (D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure

- (A) Beschreibung: /desc = "Oligo lid2"

Flasche 5: 93% A; 2,33% C; 2,33% G og 2,33 % T.

Flasche 6: 93% C; 2,33% A; 2,33% G og 2,33 % T.

Flasche 7: 93% G; 2,33% A; 2,33% C og 2,33 % T.

Flasche 8: 93% T; 2,33% A; 2,33% C og 2,33 % G.

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 6:

CATTTAT886 888655(C/G)(A/C/G/T)(A/C/G/T)7 55(C/G)88(A/C)5758  
 8(C/G)76(7/8)58665 788688(8/7)587 75ACGAG(A/T)GC CACG

64

## 2) Information für SEQ ID Nr: 7:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) Länge: 105 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strangart: einzeln
- (D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäuren

- (A) Beschreibung: /desc = "Primer 4"

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 7:

GCTCCTCATG GTGGATCCCC AGTTGTGTAT ATAGAGGATT  
 GAGGAAGGAA GAGAAGTGTG GATAGAGGTA AATTGAGTTG  
 GAAACTCCAA GCATGGCATC CTTGC

105

## (2) Information für SEQ ID Nr: 8:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) Länge: 54 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangart: einzeln

(D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure

(A) Beschreibung: /desc = "Primer 8479"

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 8:

GCGTGGACGG CCTTGGCTAG CCCTATTCGT CCTCGACCGG TCTCGCAGGA TCTG 54

## (2) Information für SEQ ID Nr: 9:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) Länge: 30 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangart: einzeln

(D) Topologie: linear

## (ii) Molekültyp: andere Nukleinsäure

(A) Beschreibung: /desc = "Primer 7887"

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr: 9:

GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC 30

## (2) Information für SEQ ID Nr: 10:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) Länge: 46 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 8932"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr: 10:

GAACTGGATA GGAAATTTGA AGTTCCTGTT GAAAGAAATA AATGAC 46

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 11:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 57 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligo 1"

Flasche 5: 80% A; 6.66% C; 6.66% G og 6.66 % T.

Flasche 6: 80% C; 6.66% A; 6.66% G og 6.66 % T.

Flasche 7: 80% G; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % T.

Flasche 8: 80% T; 6.66% A; 6.66% C og 6.66 % G.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

GCGTGGACGG CCTTGGCC86(T/A) 66(A/T) 58(T/A) 67(T/A) 66(T/A)  
575 66(T/A) GAGGTC TCG CAGGATC TG

57

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 2056"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

GCACGTAATG TTTGTACC

18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 4699"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr: 13:

CGGTACCCGG GGATCCAC

18

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Forward Primer 1"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr: 14:

GAGCTCGAGG AATTCTTACA AACCTTCAAC

30

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 15:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Reverse Primer 2"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

TTAATTAAGG TACCTGAATT TAAATGGTGA AGAGATAGAT ATCCAAG

47

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 16:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 51 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Forward Primer 3"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr: 16:

TCACCATTTA AATTCAGGTA CCTTAATTAA ATTCCTTGTT GGAAGCGTCG A

51

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 17:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Reverse Primer 4"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

TGGTATGCAT AAGCTTGAAT TCAGGTAAAC AAGATATAAT TT

42

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 18:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "HLIP-A Primer 5"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr: 18:

CCCATTATAA TATGAGGAGC TCCCTTGTGC TG

32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 19: .

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "HLIP-B Primer 6"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

CCCTTAATTA ACTAAAGACA TGTCCCAATT AA

32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 20:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 21:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

Ser-Pro-Ile-Arg-Met  
5

5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 22:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg  
5

6

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 23:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 23:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg  
5

6

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 24:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 24:

Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg  
5

6

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 25:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 25:

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys  
5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 26:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 26:

Ser-Pro-Ile-Lys-Lys  
5

5



## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 27:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 27:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro

5

6

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 28:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 28:

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg

5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 29:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 29:

Ser-Pro-Iso-Pro-Arg

5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 30:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 30:

Ser-Pro-Arg-Pro-Arg

5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 31:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 31:

Ser-Pro-Ile-Arg

4

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 32:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 32:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg

5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 33:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 33:

Ser-Cys-Ile-Arg-Arg

5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 34:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 34:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

7

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 35:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 35:

Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 36:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 36:

Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 37:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 37:

Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 38:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 38:

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 39:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 39:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 40:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 40:

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 41:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 41:

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 42:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 42:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 43:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 43:

Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 44:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 44:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 45:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 45:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 46:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 46:

Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 47:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 47:

Ser-His-Trp-Arg-Lys  
5

5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 48:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 48:

Ser-His-Trp-Arg-Arg  
5

5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 49:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 49:

Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys  
5

7

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 50:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 50:

Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 51:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 51:

Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 52:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 52:

Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 53:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 53:

Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asp-Ala  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 54:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 54:

Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg  
5

7

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 55:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 55:

Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

7

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 56:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 56:

Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys  
5

7

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 57:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 57:

Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg  
5

6

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 58:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 58:

Glu-Pro-Ile-Arg-Arg  
5

5



## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 59:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 59:

Ser-His-Trp-Glu-Glu  
5

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 60:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 60:

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 61:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 61:

Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys  
5 10

11

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 62:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 62:

Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro  
5 10

11

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 63:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 63:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro 12

5 10

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 64:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 64:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser 12

5 10

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 65:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 65:

Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro 8

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 66:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 66:

Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys 9

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 67:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 67:

Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 68:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 68:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg  
5 10

10

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 69:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 69:

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro  
5

9

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 70:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 70:

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro  
5 10

12

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:71:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 71:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg 15

5                      10                      15

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 72:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 72:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg 8

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 73:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 73:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp 8

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 74:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 74:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg 8

5

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 75:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 75:

Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 76:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 76:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 77:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 77:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 78:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 78:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 79:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 79:

Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro  
5

8

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 80:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptidzusatz
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 80:

Ser -Ser- Lys-Gln- Asp- Tyr- Arg  
5

7

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 81:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 57"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 81:

CTTGGCTAGC CCTATACGTA GATCATCCAC ACAAGATTAT CG

42

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 82:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 58"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 82:

CTTGGCTAGC TCCACACAAG ATTATCGTAT TG

32

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 83:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 59"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 83:

GCCCTCTAGA CTATAAACAG AGACCAGTGT TC

32

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 84:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 83 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 60"
  - (B) 5: 90% A und 3,33% von jedem C, G, T.  
6: 90% C und 3,33% von jedem A, G, T.  
7: 90% G und 3,33% von jedem A, C, T.  
8: 90% T und 3,33% von jedem A, C, G.
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 84:

GTAGTTTTTC GTGGT5CA57 (C/G)TCA58(5/8)67(C/G)  
 556(7/8)(6/7)(C/G)58(5/8)7 6(T/G)75658(5/8)78  
 (T/G)88878(T/G)66(G/C) 78(C/G)55885TC CACCTGTAA TGG

83

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 85:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 61"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 85:

AGAACAGCTG TTGCACC

17

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 86:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure

- (C) STRANGART: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 62"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 86:

CCGGGGA TCCACCATG

19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 87:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 64"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 87:

GCCCTCTAGA CTATAAACAG

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 88:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 66"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 88:

CTGCAGAACT GTCATTC

17

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 89:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 72"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 89:

TTGAGCTTGT ACCACG

16

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 90:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare



- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRANGART: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 74"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 90:

CCGGGGATCC ACCATGAGAT TTCCTTCTAT TTTTAC

36

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 91:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 75"
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 91:

TGGAGCTAGC TCTTTTATCC AAAGAAACAC C

31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 92:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 85 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer TiK 76"
  - (B) 5: 90% G und 3,33% von jedem C, G, T.
  - 6: 90% A und 3,33% von jedem A, G, T.
  - 7: 90% T und 3,33% von jedem A, C, T.
  - 8: 90% C und 3,33% von jedem A, C, G.
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 92:

CAGCCAATGC ATACTGC655 6885776778 8755755765  
575565875T 88786775T5 57577GCATC CAATTTGCAA  
ATTAC

85

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 93:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 1115 Basenpaare
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) STRANGART: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (vi) Ursprungsquelle:

(B) Strang: Absidia reflexa ATTC 44896

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 93:

AAAGGCATTC TCATTTTGTA GTCTTATTGC TAGCAGTATT CATCTGCATG TGCTCTGTAT	60
CGGGTGTGCC ACTGCAAATT GATCCACGCG ATGACAAGAG CTATGTTCCCT GAACAATATC	120
CTTTGAAGGT GAATGGTCCT TTGCCAGAAG GTGTAAGCGT GATCCAAGGC TATTGTGAAA	180
ACTGTACCAT GTATCCTGAA AAAAAATAGTG TATCGGCATT CTCGTCATCA TCCACACAAG	240
ATTATCGTAT TGCAAGCGAG GCAGAGATTA AGGCACACAC ATTTTACACA GCATTGTCAG	300
CCAATGCATA CTGCAGAACT GTCATTCCTG GTGGTCGATG GAGCTGTCCC CACTGTGGTG	360
TTGCATCCAA TTTGCAAATT ACCAAGACTT TCAGCACCTT AATCACTGAT ACTAATGTCT	420
TGGTGGCTGT TGGCGAAAAG GAGAAGACCA TCTATGTAGT TTTTCGTGGT ACAAGCTCAA	480
TTCGCAACGC CATTGCTGAC ATTGTTTTTG TACCAGTGAA TTATCCACCT GTTAATGGAG	540
CCAAAGTACA CAAAGGATTT CTTGATAGCT ATAACGAAGT CCAGGATAAA CTTGTTGCTG	600
AAGTCAAGGC ACAACTTGAT CGTCATCCAG GATACAAGAT CGTCGTCACT GGACATTCCT	660
TGGGAGGTGC AACAGCTGTT CTCAGTGCAC TTGACCTTTA TCACCATGGC CATGCCAATA	720
TCGAAATCTA TACTCAAGGT CAGCCACGTA TAGGTACTCC AGCATTTGCA AACTATGTGA	780
TAGGCACCAA GATTCCATAC CAACGTCTTG TCCATGAGCG TGACATTGTT CCTCACCTTC	840
CACCTGGTGC ATTTGGTTTC TTGCATGCTG GTGAAGAGTT TTGGATCATG AAAGATAGCT	900
CGTTGCGCGT ATGTCCAAAT GGCATTGAAA CTGACAACTG CAGCAACTCC ATTGTTCCCT	960
TCACTAGTGT CATTGACCAT TTAAGCTATC TTGACATGAA CACTGGTCTC TGTTTATAAT	1020
CTTTAGTATC ATCCACTCCT CCTCTTTAAT GCAATACTTT TTAAGATAAA TCACAAGTAT	1080
ACTTTGTACA AAACCAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	1115

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 94:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1020 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: kreisförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Hefe-Expressionsvektor  
pTik05"

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: CDS

(B) Ort:3..1020

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 94:

CA CAT ACA GGA ATT CAT TCA AGA ATA GTT CAA ACA AGA AGA TTA CAA	47
His Thr Gly Ile His Ser Arg Ile Val Gln Thr Arg Arg Leu Gln	
1                      5                      10                      15	
ACT ATC AAT TTC ATA CAC AAT ATA AAC GAC GGT ACC CGG GGA TCC ACC	95
Thr Ile Asn Phe Ile His Asn Ile Asn Asp Gly Thr Arg Gly Ser Thr	
20                      25                      30	
ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG	143
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu	
35                      40                      45	
GCT AGC TCC ACA CAA GAT TAT CGT ATT GCA AGC GAG GCA GAG ATT AAG	191
Ala Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys	
50                      55                      60	
GCA CAC ACA TTT TAC ACA GCA TTG TCA GCC AAT GCA TAC TGC AGA ACT	239
Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr	
65                      70                      75	
GTC ATT CCT GGT GGT CGA TGG AGC TGT CCC CAC TGT GGT GTT GCA TCC	287
Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala Ser	
80                      85                      90                      95	
AAT TTG CAA ATT ACC AAG ACT TTC AGC ACC TTA ATC ACT GAT ACT AAT	335
Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn	
100                      105                      110	
GTC TTG GTG GCT GTT GGC GAA AAG GTT GTT TTT GTA CCA GTG AAT TAT	383
Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Val Val Phe Val Pro Val Asn Tyr	
115                      120                      125	
CCA CCT GTT AAT GGA GCC AAA GTA CAC AAA GGA TTT CTT GAT AGC TAT	431
Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe Leu Asp Ser Tyr	
130                      135                      140	
AAC GAA GTC CAG GAT AAA CTT GTT GCT GAA GTC AAG GCA CAA CTT GAT	479
Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys Ala Gln Leu Asp	
145                      150                      155	
CGT CAT CCA GGA TAC AAG ATC GTC GTC ACT GGA CAT TCC TTG GGA GGT	527

Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly Gly	
160                                      165                                      170                                      175	
GCA ACA GCT GTT CTC AGT GCA CTT GAC CTT TAT CAC CAT GGC CAT GCC	575
Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr His His Gly His Ala	
180                                      185                                      190	
AAT ATC GAA ATC TAT ACT CAA GGT CAG CCA CGT ATA GGT ACT CCA GCA	623
Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg Ile Gly Thr Pro Ala	
195                                      200                                      205	
TTT GCA AAC TAT GTG ATT GGC ACC AAG ATT CCA TAC CAA CGT CTT GTC	671
Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro Tyr Gln Arg Leu Val	
210                                      215                                      220	
CAT GAG CGT GAC ATT GTT CCT CAC CTT CCA CCT GGT GCA TTT GGT TTC	719
His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro Gly Ala Phe Gly Phe	
225                                      230                                      235	
TTG CAT GCT GGT GAA GAG TTT TGG ATC ATG AAA GAT AGC TCG TTG CGC	767
Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys Asp Ser Ser Leu Arg	
240                                      245                                      250                                      255	
GTA TGT CCA AAT GGC ATT GAA ACT GAC AAC TGC AGC AAC TCC ATT GTT	815
Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys Ser Asn Ser Ile Val	
260                                      265                                      270	
CCC TTC ACT AGT GTC ATT GAC CAT TTA AGC TAT CTT GAC ATG AAC ACT	863
Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr Leu Asp Met Asn Thr	
275                                      280                                      285	
GGT CTC TGT TTA TAG TCT AGA GGG CCG CAT GAT GTA ATT AGT TAT GT	911
Gly Leu Cys Leu * Ser Arg Gly Pro His Asp Val Ile Ser Tyr Val	
290                                      295                                      300	
ACG CTT ACA TTC ACG CCC TCC CCC CAC ATC CGC TCT AAC CGA AAA GGA	959
Thr Leu Thr Phe Thr Pro Ser Pro His Ile Arg Ser Asn Arg Lys Gly	
305                                      310                                      315	
AGG AGT TAG ACA ACC TGA AGT CTA GGT CCC TAT TTA TTT TTT TAT AGT	1007
Arg Ser * Thr Thr * Ser Leu Gly Pro Tyr Leu Phe Phe Tyr Ser	
320                                      325                                      330                                      335	
TAT GTT AGT ATT A	1020
Tyr Val Ser Ile	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 95:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 339 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 95:

His Thr Gly Ile His Ser Arg Ile Val Gln Thr Arg Arg Leu Gln Thr  
 1 5 10 15

Ile Asn Phe Ile His Asn Ile Asn Asp Gly Thr Arg Gly Ser Thr Met  
 20 25 30

Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu Ala  
 35 40 45

Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys Ala  
 50 55 60

His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr Val  
 65 70 75 80

Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala Ser Asn  
 85 90 95

Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn Val  
 100 105 110

Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Val Val Phe Val Pro Val Asn Tyr Pro  
 115 120 125

Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe Leu Asp Ser Tyr Asn  
 130 135 140

Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys Ala Gln Leu Asp Arg  
 145 150 155 160

His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala  
 165 170 175

Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr His His Gly His Ala Asn  
 180 185 190

Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg Ile Gly Thr Pro Ala Phe  
 195 200 205

Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro Tyr Gln Arg Leu Val His  
 210 215 220

Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro Gly Ala Phe Gly Phe Leu  
 225 230 235 240

His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys Asp Ser Ser Leu Arg Val

245                      250                      255  
 Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro  
 260                      265                      270  
 Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr Leu Asp Met Asn Thr Gly  
 275                      280                      285  
 Leu Cys Leu \* Ser Arg Gly Pro His Asp Val Ile Ser Tyr Val Thr  
 290                      295                      300  
 Leu Thr Phe Thr Pro Ser Pro His Ile Arg Ser Asn Arg Lys Gly Arg  
 305                      310                      315                      320  
 Ser \* Thr Thr \* Ser Leu Gly Pro Tyr Leu Phe Phe Tyr Ser Tyr  
 325                      330                      335  
 Val Ser Ile

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 96:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 255 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

## (vi) Ursprungsquelle:

(A) Organismus: MF $\alpha$ 1 Signalsequenz (**Paarungsfaktor "mating factor"**)

(B) Strang: Hefestrang YPH499

## (ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: sig\_peptide

(B) Ort:1..255

## (ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: CDS

(B) Ort:1..255

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 96:

ATG AGA TTT CCT TCT ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCT GCT TCC TCC 48  
 Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1                      5                      10                      15

GCT TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACC ACT GAA GAT GAA ACG GCT CAA 96  
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
 20                      25                      30

ATT CCA GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC CTT GAT TTA GAA GGT GAT TTC 144  
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
 35                      40                      45

GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC TCC ACC AAT AAC GGT TTA TTG 192  
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60

TTT ATC AAT ACT ACT ATT GCC TCC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGT GTT 240  
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
 65 70 75 80

TCT TTG GAT AAA AGA 255  
 Ser Leu Asp Lys Arg  
 85

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 97:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 85 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 97:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
 20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
 35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
 50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
 65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg  
 85

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 98:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 98:

MRFYSVVSLLAVSICTYGVSGVPVQIGPRDKSYVPEQ YPLKMNGPLPEGVSVIQGYCEN-

CTMYPEENSVTALSSSKQDYRTASETEIQAHTFYTALSANAYCRN-  
 VIPGGRWSCPHCDVTSNLKITKTFSTLITDTNVAVAVGEKEKTIYIVFRGTNSIRNAIA-  
 DIVFVPVDYPPVDGAKVHKGF LDSYNEVQDQLVAEVKKQLDNHPPGYKIVVAGHSLGGATAVL-  
 CALDLYHHGHHNIEIYTQGGQPRVGTPAFAYVIGTKIPYQRLVNERDIVPHLPPGAFGLHA-  
 GEEFWIMKDDSLRVCPNGIETDDCSNSIVPFTSVIDHLSYLDMMNTGLCL\*

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 99:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 864 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRANGART: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

## (vi) Ursprungsquelle:

(B) Strang: Pseudomonas sp.

## (ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: mat\_peptide

(B) Ort:1..864

## (ix) Merkmal:

(A) NameE/Schlüssel: CDS

(B) Ort:1..864

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 99:

TTC GGC TCC TCG AAC TAC ACC AAG ACC CAG TAC CCG ATC GTC CTG ACC	48
Phe Gly Ser Ser Asn Tyr Thr Lys Thr Gln Tyr Pro Ile Val Leu Thr	
1                      5                      10                      15	
CAC GGC ATG CTC GGT TTC GAC AGC CTG CTT GGA GTC GAC TAC TGG TAC	96
His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Leu Leu Gly Val Asp Tyr Trp Tyr	
20                      25                      30	
GGC ATT CCC TCA GCC CTG CGT AAA GAC GGC GCC ACC GTC TAC GTC ACC	144
Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Lys Asp Gly Ala Thr Val Tyr Val Thr	
35                      40                      45	
GAA GTC AGC CAG CTC GAC ACC TCC GAA GCC CGA GGT GAG CAA CTG CTG	192
Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Ala Arg Gly Glu Gln Leu Leu	
50                      55                      60	
ACC CAA GTC GAG GAA ATC GTG GCC ATC AGC GGC AAG CCC AAG GTC AAC	240
Thr Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Pro Lys Val Asn	
65                      70                      75                      80	
CTG TTC GGC CAC AGC CAT GGC GGG CCT ACC ATC CGC TAC GTT GCC GCC	288
Leu Phe Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala	
85                      90                      95	
GTG CGC CCG GAT CTG GTC GCC TCG GTC ACC AGC ATT GGC GCG CCG CAC	336
Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Ile Gly Ala Pro His	
100                      105                      110	



AAG GGT TCG GCC ACC GCC GAC TTC ATC CGC CAG GTG CCG GAA GGA TCG Lys Gly Ser Ala Thr Ala Asp Phe Ile Arg Gln Val Pro Glu Gly Ser 115 120 125	384
GCC AGC GAA GCG ATT CTG GCC GGG ATC GTC AAT GGT CTG GGT GCG CTG Ala Ser Glu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Val Asn Gly Leu Gly Ala Leu 130 135 140	432
ATC AAC TTC CTT TCC GGC AGC AGT TCG GAC ACC CCA CAG AAC TCG CTG Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Pro Gln Asn Ser Leu 145 150 155 160	480
GGC ACG CTG GAG TCA CTG AAC TCC GAA GGC GCC GCA CGG TTT AAC GCC Gly Thr Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala 165 170 175	528
CGC TTC CCC CAG GGG GTA CCA ACC AGC GCC TGC GGC GAG GGC GAT TAC Arg Phe Pro Gln Gly Val Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Asp Tyr 180 185 190	576
GTG GTC AAT GGC GTG CGC TAT TAC TCC TGG AGG GGC ACC AGC CCG CTG Val Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Arg Gly Thr Ser Pro Leu 195 200 205	624
ACC AAC GTA CTC GAC CCC TCC GAC CTG CTG CTC GGC GCC ACC TCC CTG Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ser Leu 210 215 220	672
ACC TTC GGT TTC GAG GCC AAC GAT GGT CTG GTC GGA CGC TGC AGC TCC Thr Phe Gly Phe Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Arg Cys Ser Ser 225 230 235 240	720
CGG CTG GGT ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC Arg Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp 245 250 255	768
GAG GTG AAC CAG ACC TTC GGG CTG ACC AGC ATC TTC GAG ACC AGC CCG Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro 260 265 270	816
GTA TCG GTC TAT CGC CAG CAA GCC AAT CGC CTG AAG AAC GCC GGG CTC Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu 275 280 285	864

## (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 100:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 288 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 100:

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

Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro  
 260 265 270

Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu  
 275 280 285

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen eines mutierten lipolytischen Enzyms, wobei das Verfahren mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- a) Unterziehen einer DNA-Sequenz, welche ein lipolytisches Stammenzym kodiert, einer Mutagenese, um eine Vielfalt mutierter DNA-Sequenzen zu bilden;
- b) Exprimieren der mutierten DNA-Sequenzen in Wirtszellen;
- c) Sortieren nach Wirtszellen, welche ein mutiertes lipolytisches Enzym exprimieren, welches eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzkomponente umfasst, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym; und
- d) Auswählen eines mutierten lipolytischen Enzyms unter jenen, welche aus Schritt (c) resultieren, welches, wenn es in einer Detergenzzusammensetzung vorliegt, mindestens 15% mehr Fett aus einem fett-beschmutzten Textilmuster („swatch“), als die gleiche Detergenzzusammensetzung ohne das lipolytische Enzym, in einem Ein-Zyklus-Waschtest entfernen kann, umfassend das Unterziehen von 7 fett-beschmutzten Baumwolltextilmustern (9 × 9 cm) pro Becher einer Ein-Zyklus-Waschung in einem Temperatur-geregelten TOM, wobei jeder Becher 1.000 ml Wasser, umfassend 3,2 mM  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (in einem Verhältnis von 5 : 1) und 5 g/l der Detergenzzusammensetzung, eingestellt auf pH 10, und umfassend 12.500 LU/l des lipolytischen Enzyms enthält, für eine Dauer von 20 Minuten bei einer Temperatur von 30°C, gefolgt von einem Spülen für 15 Minuten in fließendem Leitungswasser und einem ausgebreiteten Trocknen („linedrying“) über Nacht bei Raumtemperatur, nachfolgende Extraktion und Quantifizierung des Fettbestandteils aus den resultierenden Textilmustern durch Soxhlet-Extraktion.

2. Verfahren nach Anspruch 1, in welchem die Mutagenese aus Schritt (a) eine Zufallsmutagenese ist.

3. Verfahren nach dem vorangehenden Anspruch, in welchem die Mutagenese eine lokalisierte Zufallsmutagenese ist, durchgeführt in der Lipid-Kontaktzone oder in einer beliebigen Peptidaddition, welche an dem N-terminalen und/oder dem C-terminalen Ende; des lipolytischen Stammenzym vorhanden ist.

4. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–3, in welchem die Schritte (a), (b), (c) und/oder (d) einmal oder mehrmals wiederholt werden.

5. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–4, in welchem das lipolytische Stammenzym von dem Stamm von *Humicola lanuginosa* DSM 4109 abgeleitet ist und die in EP 0 305 216 offenbarte Aminosäuresequenz aufweist.

6. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem das mutierte lipolytische Enzym verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym mindestens 3 Mutationen umfasst.

7. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem das mutierte lipolytische Enzym (verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym) eine Substitution von mindestens einem neutralen Aminosäurerest durch einen positiv geladenen Aminosäurerest, eine Deletion von mindestens einem negativ geladenen Aminosäurerest, oder eine Substitution von mindestens einem negativ geladenen Aminosäurerest durch einen neutralen oder positiv geladenen Aminosäurerest, umfasst.

8. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem das mutierte lipolytische Enzym, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, durch eine Deletion oder eine Substitution von mindestens einem Aminosäurerest in einer Lipid-Kontaktzone des lipolytischen Stammenzym oder einer Addition von mindestens einem Aminosäurerest zu der Lipid-Kontaktzone modifiziert worden ist.

9. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem das mutierte lipolytische Enzym, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, mindestens eine Mutation innerhalb und mindestens eine Mutation außerhalb der Lipid-Kontaktzone des lipolytischen Stammenzym umfasst.

10. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem das mutierte lipolytische En-

zym, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym, eine Peptidaddition umfasst, welche an oder innerhalb des C- und/oder N-terminalen Endes der reifen Form des lipolytischen Stammenzyms angebracht wird.

11. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem die Peptidaddition eine kovalente Bindung mit dem reifen Teil des lipolytischen Stammenzyms bildet.

12. Verfahren nach einem beliebigen vorangehenden Anspruch, in welchem das mutierte lipolytische Enzym einen Cysteinrest in der Peptidaddition, einen Cysteinrest in dem reifen Teil des lipolytischen Stammenzyms und eine Cysteinbrücke zwischen den beiden Cysteinresten umfasst.

13. Verfahren nach einem beliebigen Ansprüche 10–12, in welchem die Peptidaddition mindestens einen Prolinrest umfasst.

14. Verfahren nach dem vorangehenden Anspruch, in welchem die Peptidaddition zwei oder drei Prolinreste umfasst.

15. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 10–14, in welchem die Peptidaddition mindestens einen positiven oder hydrophoben Aminosäurerest umfasst.

16. Verfahren nach dem vorangehenden Anspruch, in welchem die Peptidaddition zwei oder drei hydrophobe Aminosäurereste umfasst.

17. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 10–16, in welchem die Peptidaddition eine Länge zwischen 1 und 15 Aminosäuren aufweist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, in welchem die Peptidaddition eine Länge von 4 bis 10 Aminosäuren aufweist.

19. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 10–18, in welchem das mutierte lipolytische Enzym weiterhin eine Mutation in einem nicht-strukturellen Teil des N-Terminus und/oder C-Terminus des lipolytischen Stammenzyms umfasst.

20. Verfahren nach dem vorangehenden Anspruch, in welchem die Mutation in der Entfernung von mindestens einem negativ geladenen Aminosäurerest resultiert.

21. Verfahren nach einem Anspruch 19 oder 20, in welchem ein negativ geladener Aminosäurerest des nicht-strukturellen Teils deletiert oder durch einen neutralen oder positiv geladenen Aminosäurerest ersetzt worden ist oder durch einen hydrophoben Aminosäurerest, oder in welchem ein neutraler Aminosäurerest ersetzt worden ist durch einen positiv geladenen Aminosäurerest.

22. Verfahren zum Herstellen eines mutierten lipolytischen Enzyms, wobei das Verfahren mindestens die folgenden Schritte umfasst:

- a) Konstruieren von mutierten DNA-Sequenzen durch Kombinieren i) einer ein erstes lipolytisches Stammenzym kodierenden DNA-Sequenz, welche, oder einen Teil der DNA-Sequenz und ii) einer DNA-Sequenz, welche ein zweites lipolytisches Stammenzym kodiert, oder einen Teil der DNA-Sequenz und gegebenenfalls iii) weitere DNA-Sequenzen, welche ein drittes (und gegebenenfalls weitere) lipolytische Stammenzyme kodiert (kodieren), oder einen Teil der DNA-Sequenz(en), wobei die zu kombinierenden DNA-Sequenzen ausreichend homolog sind, um zu gestatten, dass eine homologe Rekombination zwischen den Sequenzen stattfindet,
- b) Exprimieren der resultierenden mutierten DNA-Sequenzen in Wirtszellen, und
- c) Selektieren eines mutierten lipolytischen Enzyms unter jenen, welche aus Schritt (b) resultieren, welches, wenn es in einer Detergenzzusammensetzung A und/oder B vorliegt, mindestens 15% mehr Fett aus einem fett-beschmutzten Textilmuster zu entfernen vermag, als die gleiche Detergenzzusammensetzung ohne das lipolytische Enzym, in einem Ein-Zyklus-Waschungstest, umfassend ein Unterziehen von 7 fett-beschmutzten Baumwolltextilmustern (9 × 9 cm) pro Becher einer Ein-Zyklus-Waschung in einer Temperatur-geregelten TOM, wobei jeder Becher 1.000 ml Wasser, umfassend 3,2 mM  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (in einem Verhältnis von 5 : 1) und 5 g/l der Detergenzzusammensetzung, eingestellt auf pH 10, und umfassend 12.500 LU/l des lipolytischen Enzyms enthält, für eine Dauer von 20 Minuten bei einer Temperatur von 30°C, gefolgt von einem Spülen für eine Dauer von 15 Minuten in fließendem Leitungswasser und einem ausgebreiteten Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur, nachfolgende Extraktion und Quantifizierung des Fettbestandteils aus den resultierenden Textilmustern durch Soxhlet-Extraktion.

23. Verfahren nach Anspruch 22, in welchem vor Schritt (c) ein Sortieren nach Wirtszellen durchgeführt wird, welche ein mutiertes lipolytisches Enzym exprimieren, welches, verglichen mit einem beliebigen der lipolytischen Stammenzyme, eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber eines Detergenzes oder einer Detergenzzusammensetzung aufweist.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, in welchem eine oder mehrere der homologen DNA-Sequenzen i)–iii), welche zum Konstruieren der mutierten DNA-Sequenz aus Schritt (a) verwendet werden, zubereitet worden sind durch

- a) Unterziehen einer DNA-Sequenz, welche ein lipolytisches Stammenzym kodiert, einer Mutagenese, um eine Vielfalt von mutierten DNA-Sequenzen zu bilden;
- b) Exprimieren der mutierten DNA-Sequenzen in Wirtszellen;
- c) Sortieren nach Wirtszellen, welche ein mutiertes lipolytisches Enzym exprimieren, welches eine herabgesetzte Abhängigkeit von Calcium und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergenz oder einer Detergenzzusammensetzung, verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym aufweist; und gegebenenfalls
- d) Auswählen eines mutierten lipolytischen Enzyms unter jenen, welche aus Schritt (c) resultieren, welches, wenn es in einer Detergenzzusammensetzung vorliegt, mindestens 15% mehr Fett aus einem fett-beschmutzten Textilmuster („swatch“) zu entfernen vermag, als die gleiche Detergenzzusammensetzung ohne das lipolytische Enzym, in einem Ein-Zyklus-Waschungstest, umfassend ein Unterziehen von 7 fett-beschmutzten Baumwolltextilmustern (9 × 9 cm) pro Becher einer Ein-Zyklus-Waschung in einem Temperatur-geregelten TOM, wobei jeder Becher enthaltend 1.000 ml Wasser, umfassend 3,2 mM  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (in einem Verhältnis von 5 : 1) und 5 g/l der Detergenzzusammensetzung, eingestellt auf pH 10, und umfassend 12.500 LU/l des lipolytischen Enzyms entfernen kann, für eine Dauer von 20 Minuten bei einer Temperatur von 30°C, gefolgt von einem Spülen für eine Dauer von 15 Minuten in fließendem Leitungswasser und einem ausgebreiteten Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur, nachfolgende Extraktion und Quantifizierung des Fettbestandteils der resultierenden Textilmustern durch Soxhlet-Extraktion.

25. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 22–24, in welchem die lipolytischen Stammenzyme, welche durch die homologen DNA-Sequenzen i), ii) und iii) kodiert werden, verschiedene Varianten desselben natürlich vorkommenden lipolytischen Enzyms darstellen.

26. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 22–25, in welchem das lipolytische Stammenzym von einem Pilz oder einem Bakterium abgeleitet ist.

27. Verfahren nach dem vorangehenden Anspruch, in welchem ein lipolytisches Stammenzym von dem Stamm von *Humicola lanuginosa* DSM 4109 abgeleitet ist, und die in EP 0 305 216 offenbarte Aminosäuresequenz aufweist.

28. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 22–27, in welchem die Kombination der DNA-Sequenzen durch Sexual-PCR oder Gen-Schieben („gene shuffling“) durchgeführt wird.

29. Lipolytisches Enzym, welches eine Variante von einem lipolytischen Stammenzym ist, wobei das lipolytische Stammenzym von dem Stamm von *Humicola lanuginosa* DSM 4109 abgeleitet ist und die in EP 0 305 216 offenbarte Aminosäuresequenz aufweist, und die Variante eine der folgenden Mutationen aufweist:

- a) SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + Q249R;
- b) SPPRRP + I90F + D96L + E99K + D137G + V187A;
- c) SPRPRP + N94K + D96L + L97M + Q249R;
- d) SPPPRPRP + N94K + D96L + L97M + Q249R;
- e) SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R;
- f) SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A;
- g) SPIRPRP + D137G + D167G + E21V + W221L;
- h) E1SPIRPRP + I90F + D96L + E99K + V187A;
- i) E1SRKRKRK + I90F + D96L + E99K + V187A;
- j) E1SPRIKPRIK + I90F + D96L + E99K + V187A;
- k) EISPPRRP + D62R + I90F + D96L + E99K + V187A;
- l) E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + N200R + R209A;
- m) E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + T199R + N200R + R209A;
- n) E1SPIRPRP + D57G + D62R + N94K + D96L + Q249R;
- o) E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + N200R + R209A + Q249R;
- p) E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + T199R + N200R + Q249R;
- q) E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + T199R;

r) E1SPIRPRP + D57G + N94K + D96L + T199R + R209A + Q249R;  
s) E1SPIRPRP + I90F + D96L + E99K + V187A + Q249R;  
t) E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + V187A + P253R;  
u) E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + D137G + D167G + V187A + Q249R;  
v) E1SPPRRP + I90F + D96L + E99K + D137G + V187A + Q249R;  
w) E1SPPRRP + D96L + E99K + V187A + Q249R;  
x) E1SPPRRP + V2P + N94K + D96L + Q249R;  
y) E1SPPWWP + V2W + S3R + N94K + D961L + Q249R;  
z) E1SPPWRP + V2R + S3R + N94K + D96L + Q249R;  
aa) EISPPRWP + V2R + S3R + N94K + D96L + Q249R;  
bb) E1SPPWWP + V2R + S3W + N94K + D96L + Q249R;  
cc) E1SPPRWP + V2W + S3R + N94K + D96L + Q249R;  
dd) E1SPPRWP + V2R + S3W + N94K + D96L + Q249R;  
ee) E1SPPRWP + N94K + D96L + Q249R;  
ff) EISPPRRP + N94K + D96L + Q249R;  
gg) E1APPPRRPRPRP + V2G + S3T + D57G + N94K + D96L + L9711A + Q249R;  
hh) E1APPPRTRPRPRS + V2G + S3T + Q4P + DSE + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R;  
ii) E1APPPKASPRQRP + V2G + D5Q + L6M + D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R;  
jj) SCIRR + N94K + D96L + E239C + Q249R;  
kk) E1SPPRRP + D57G + N94K + D96L + Y53C + K127G + Q249R;  
ll) E1SPPRRP + V2R + S3P + N94K + D96L + Q249R;  
mm) E1SPPWPRP + V2R + S3P + N94K + D96L + Q249R;  
nn) E1SPPRRP + N94K + D96L + E99K;  
oo) E1SPPRRP + N94K + D96L + E99K + Q249R;  
pp) E1SPPCGRRP + N94K + D96L + E239C + Q249R;  
qq) E1SPGRPRP + N94K + D96L + E239C + Q249R;  
rr) SPPCRRRP + N94K + D96L + E239C + Q249R; or  
ss) E1SPPRRP + D57G + N94K + D96L + Q249R.

30. DNA-Konstrukt, umfassend eine DNA-Sequenz, welche das lipolytische Enzym nach Anspruch 29 kodiert.

31. Vektor, das DNA-Konstrukt nach Anspruch 30 beherbergend.

32. Vektor nach Anspruch 31, welcher ein Plasmid oder ein Bakteriophage ist.

33. Vektor nach Anspruch 31 oder 32, welcher ein Expressionsvektor ist, welcher weiterhin DNA-Sequenzen umfasst, welche die Expression des lipolytischen Enzyms gestatten.

34. Wirtszelle, das DNA-Konstrukt nach Anspruch 30 oder den Vektor nach einem beliebigen der Ansprüche 31 bis 33 beherbergend.

35. Zelle nach Anspruch 34, welche eine mikrobielle Zelle ist.

36. Zelle nach Anspruch 35, welche eine Zelle von einem Pilz- oder Bakterienstamm ist.

37. Zelle nach Anspruch 36, welche eine Zelle der Gattung *Aspergillus*, *Fusarium* oder *Saccharomyces* ist.

38. Zelle nach Anspruch 37, welche *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *F. graminearum* oder *S. cerevisiae* ist.

39. Detergenzzusatz in der Form eines nicht-staubenden Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms, umfassend das lipolytische Enzym nach Anspruch 29.

40. Detergenzzusatz nach Anspruch 39, welcher 0,02–200 mg Enzymprotein/g des Zusatzes enthält.

41. Detergenzzusatz nach Anspruch 39 oder 40, welcher zusätzlich eine Protease, Amylase, Peroxidase, Cutinase, ein lipolytisches Enzym und/oder eine Cellulase umfasst.

42. Detergenzzusammensetzung, umfassend ein oberflächenaktives Mittel und das lipolytische Enzym nach Anspruch 29.

43. Detergenzzusammensetzung nach Anspruch 42, welche zusätzlich eine Protease, Amylase, Peroxidase, Cutinase, ein lipolytisches Enzym und/oder eine Cellulase umfasst.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

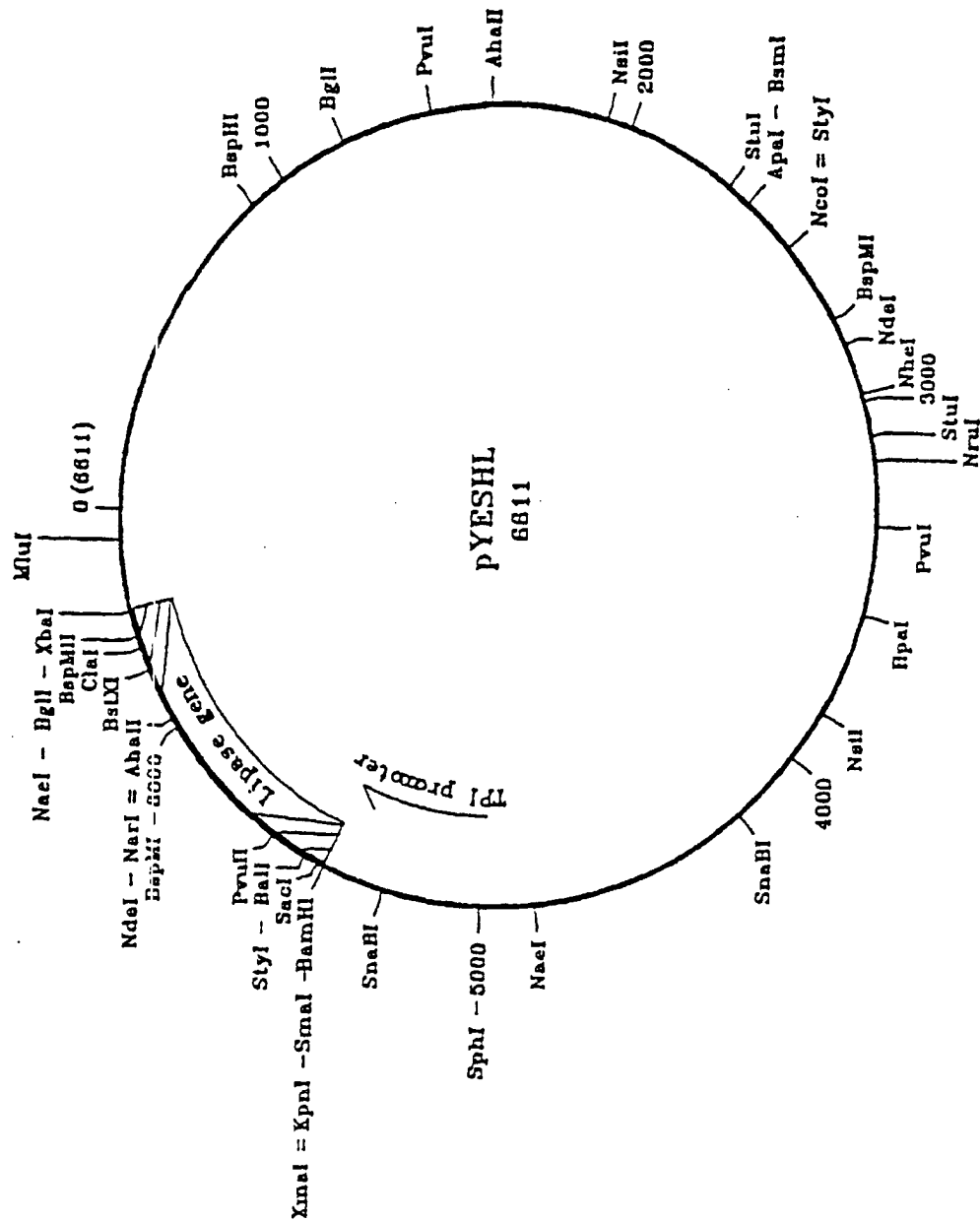


Abb. 1



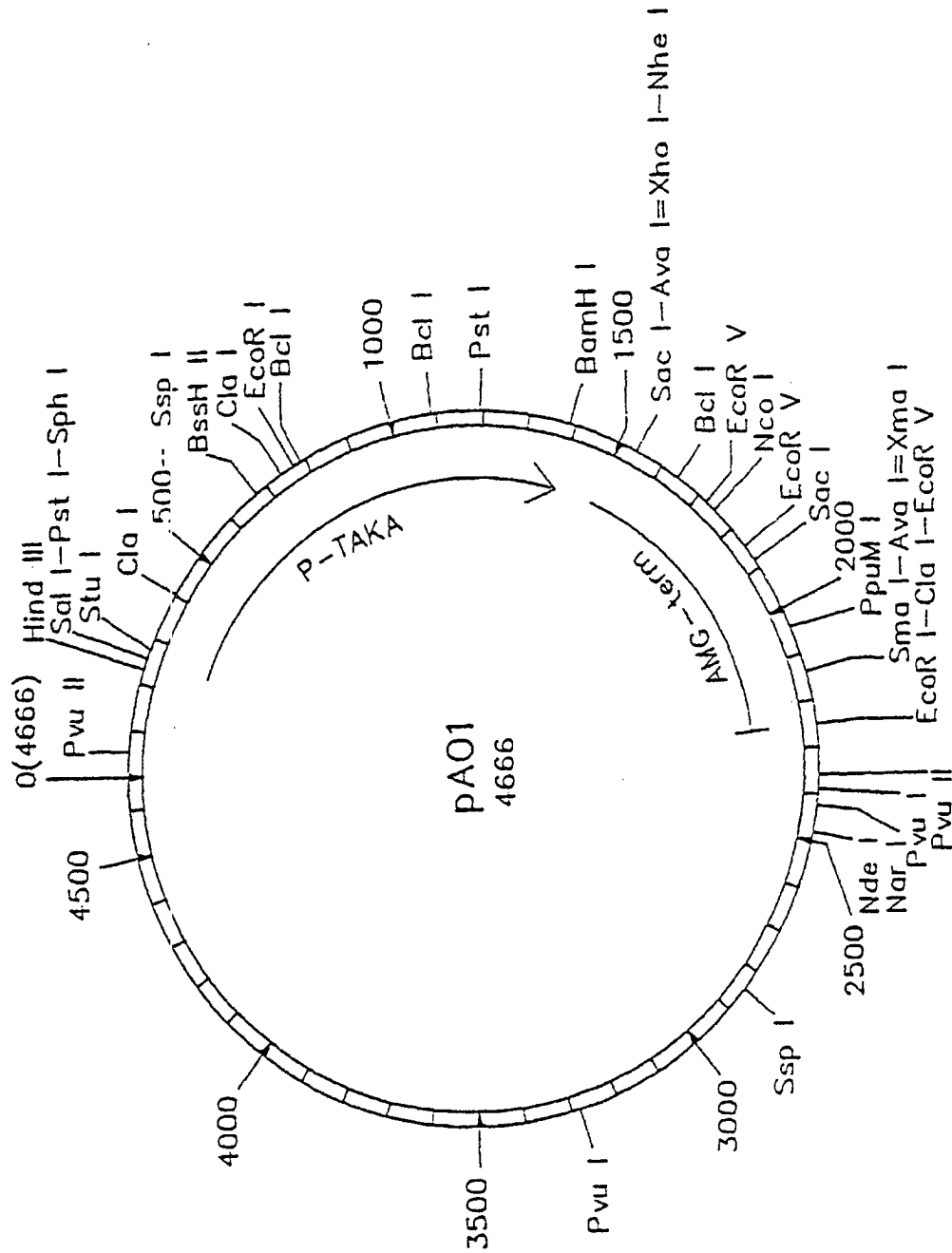


Abb. 2

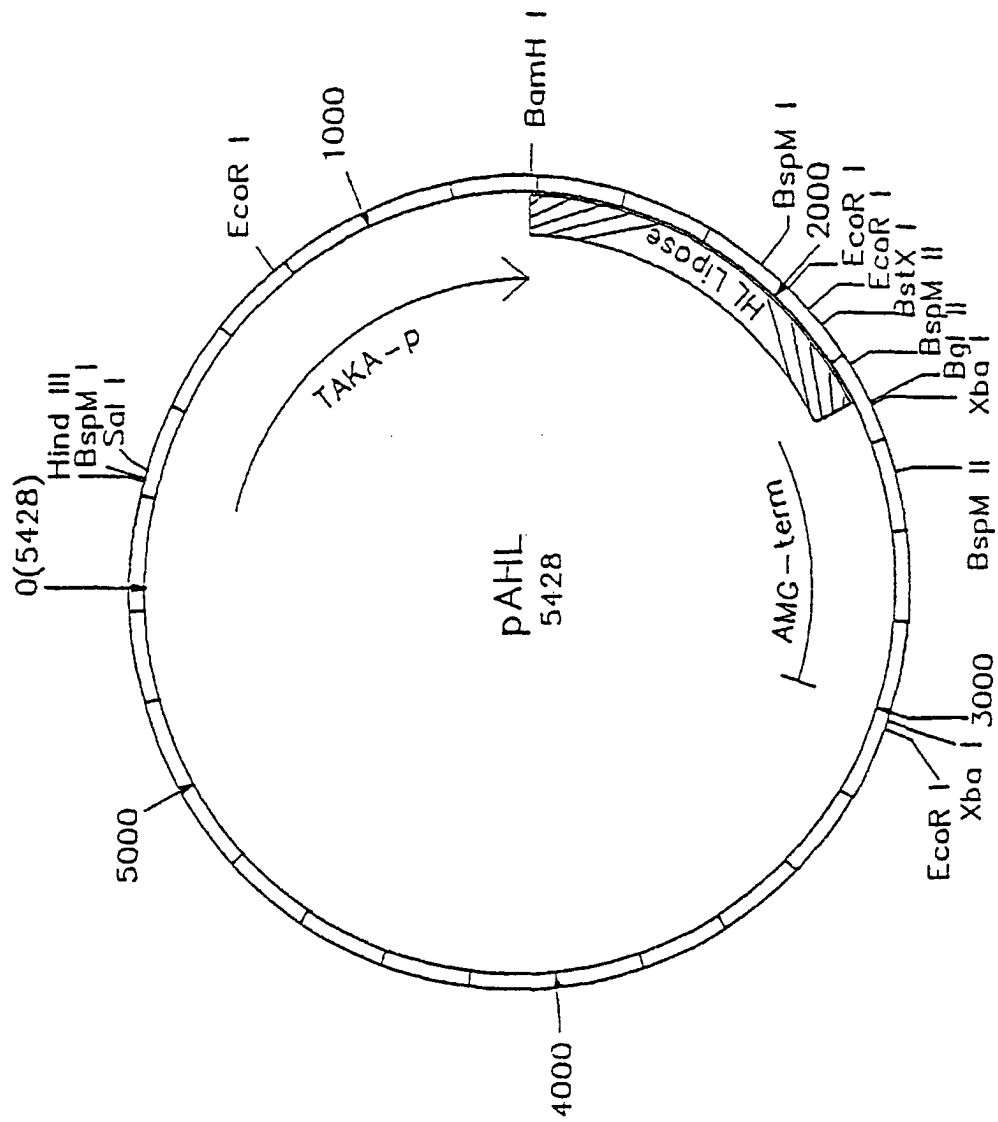


Abb. 3

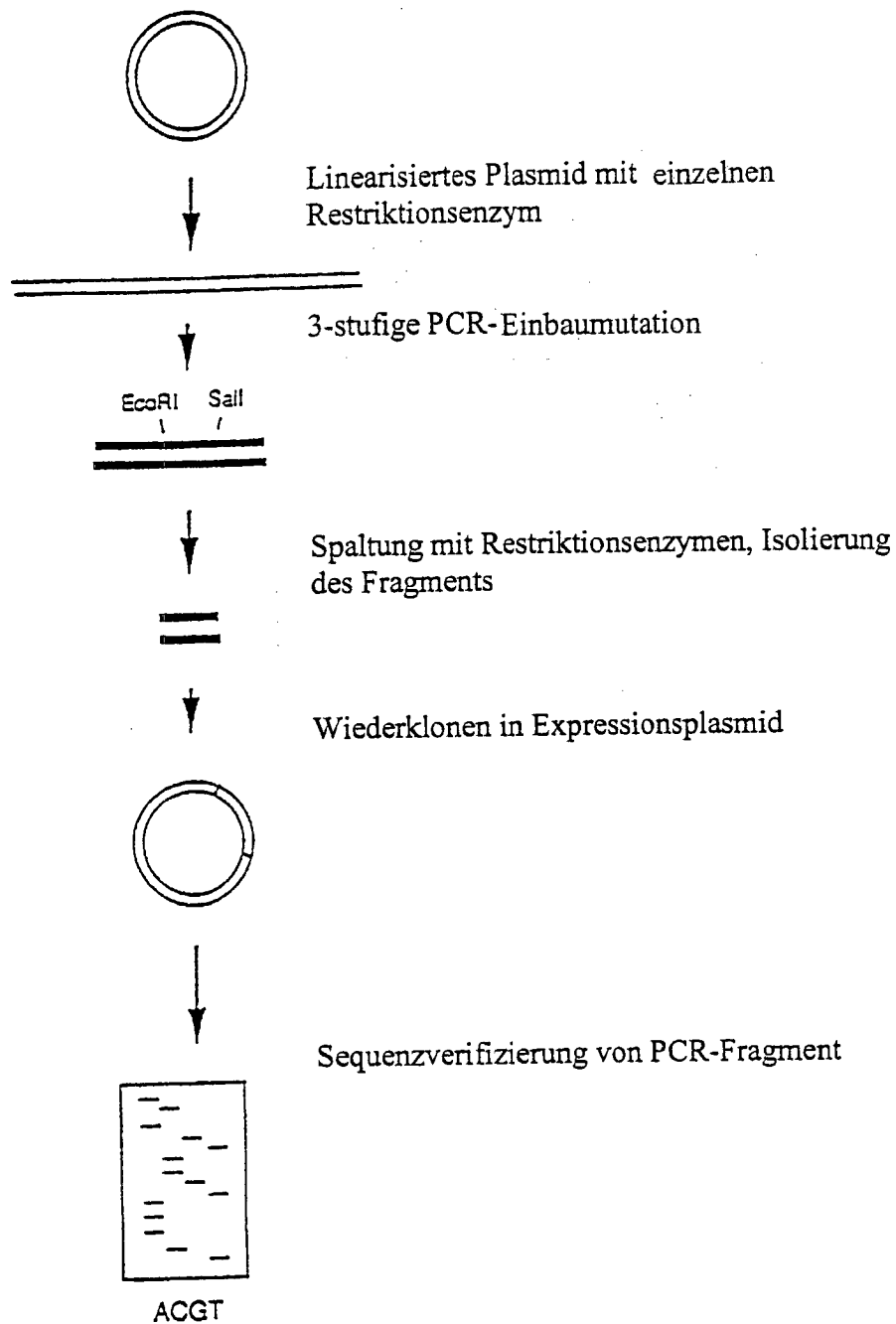


Abb. 4

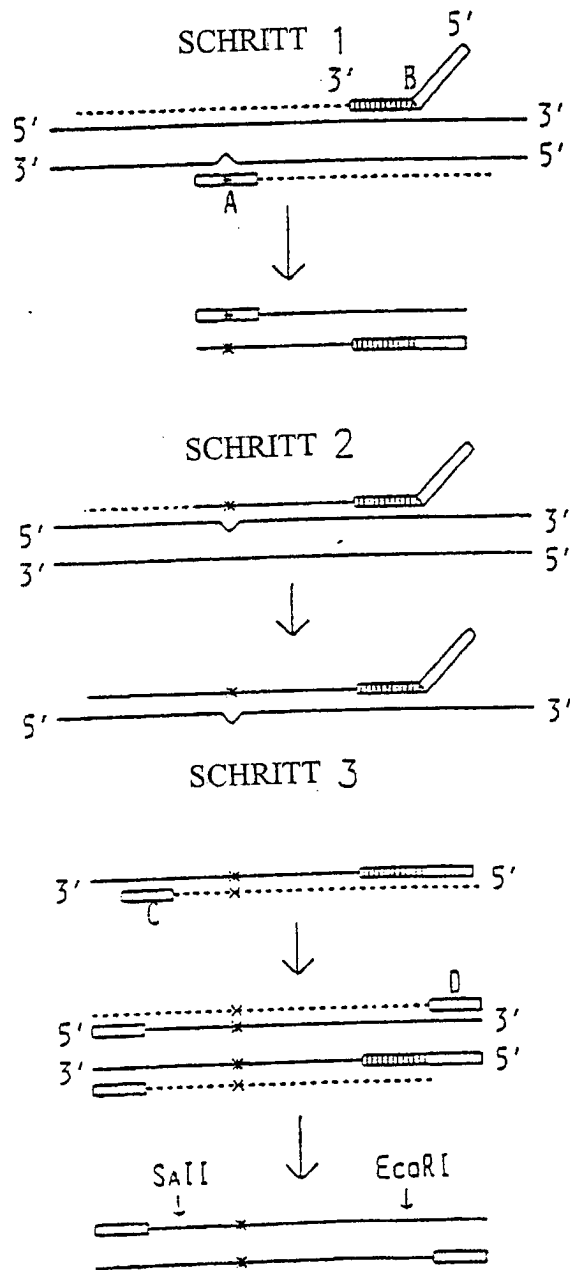
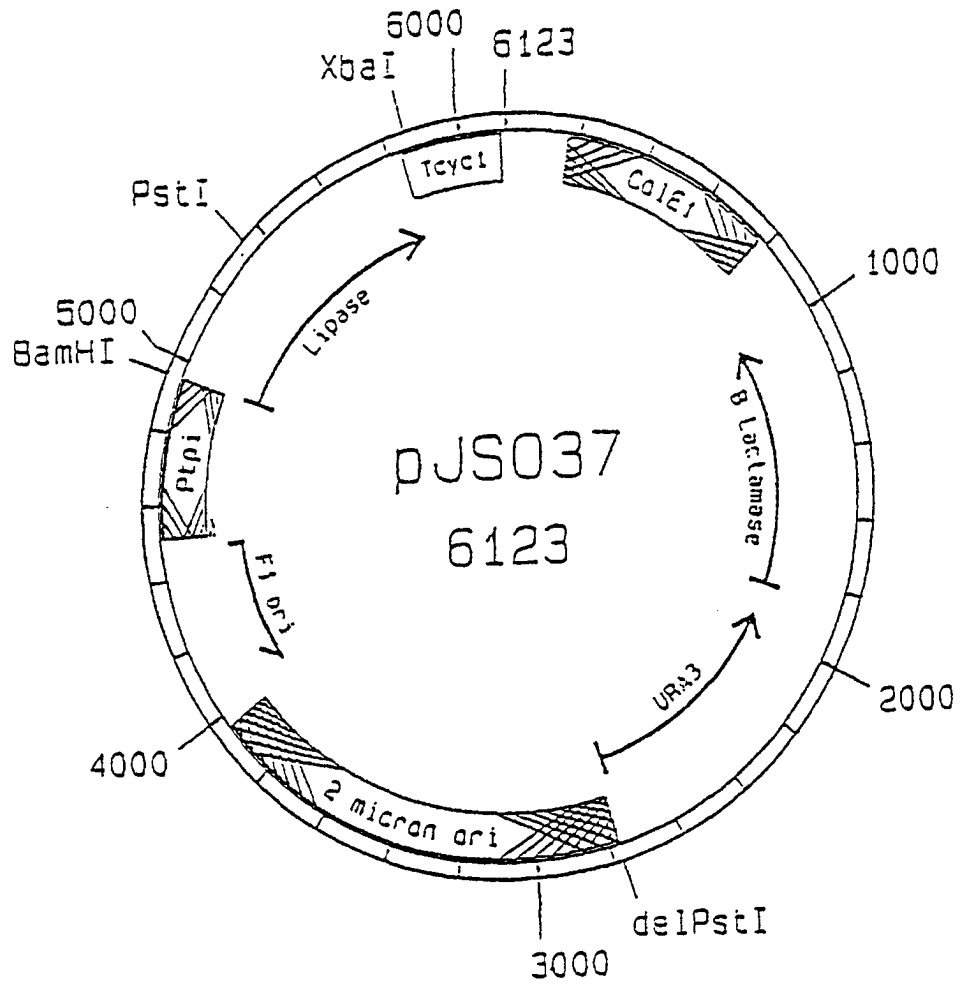


Abb. 5



pJS037

Abb. 6

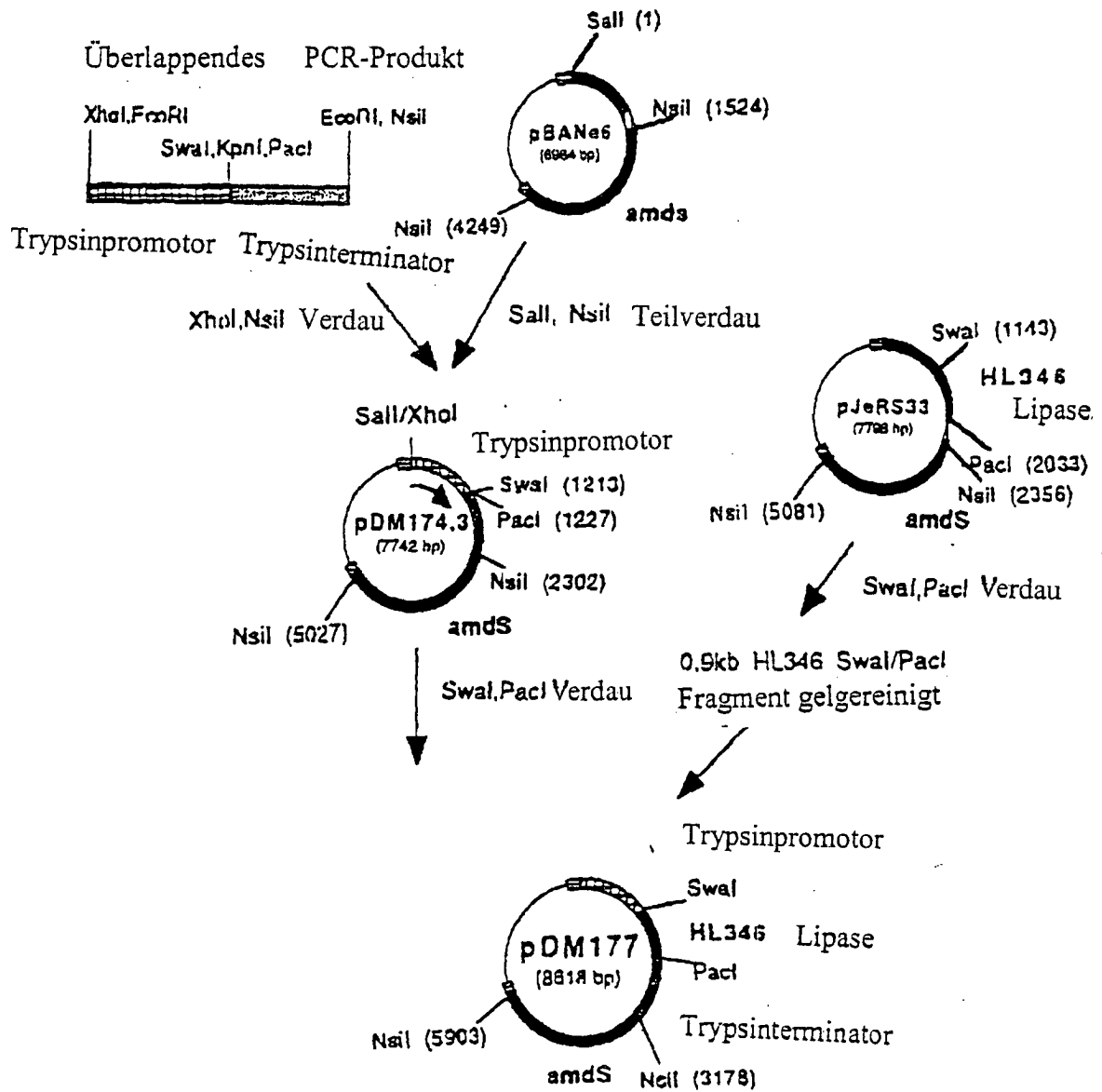


Abb. 7

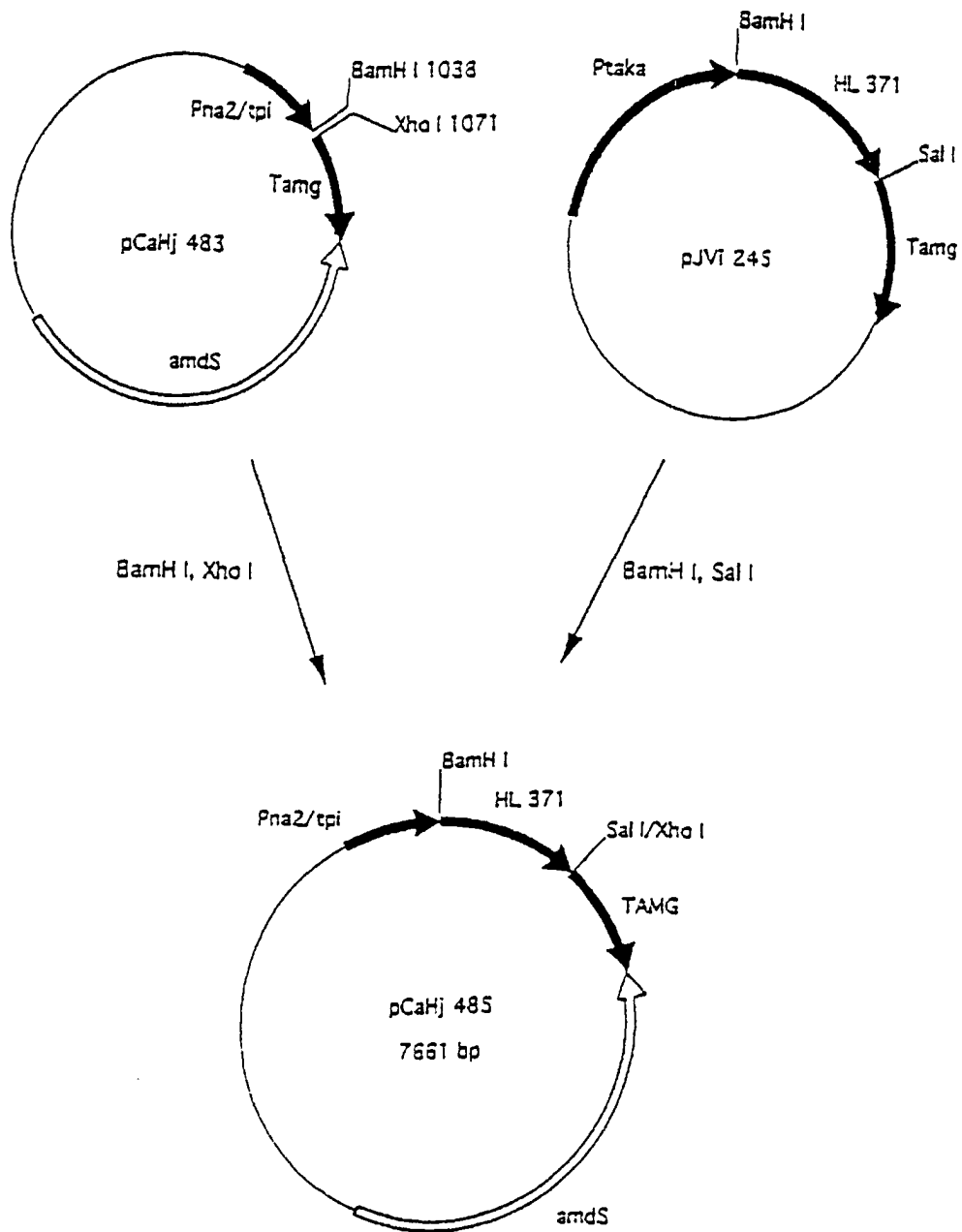


Abb. 8

Länge: 1115

```

1 AAAGGCATTG TCATTTTGTA GTCTTATTGC TAGCAGTATT CATCTGCATG
51 TGCTCTGTAT CGGGTGTGCC ACTGCAAATT GATCCACGCG ATGACAAGAG
101 CTATGTTTCT GAACAATATC CTTTGAAGGT GAATGGTCCT TTGCCAGAAG
151 GTGTAAGCGT GATCCAAGGC TATTGTGAAA ACTGTACCAT GTATCCTGAA
201 AAAAATAGTG TATCGGCATT CTCGTCATCA TCCACACAAG ATTATCGTAT
251 TGCAAGCGAG GCAGAGATTA AGGCACACAC ATTTTACACA GCATTGTCAG
301 CCAATGCATA CTGCAGAACT GTCATTCCTG GTGGTCGATG GAGCTGTCCC
351 CACTGTGGTG TTGCATCCAA TTTGCAAATT ACCAAGACTT TCAGCACCTT
401 AATCACTGAT ACTAATGTCT TGGTGGCTGT TGGCGAAAAG GAGAAGACCA
451 TCTATGTAGT TTTTCGTGGT ACAAGCTCAA TTCGCAACGC CATTGCTGAC
501 ATTGTTTTTG TACCAGTGAA TTATCCACCT GTTAATGGAG CCAAAGTACA
551 CAAAGGATTT CTTGATAGCT ATAACGAAGT CCAGGATAAA CTTGTTGCTG
601 AAGTCAAGGC ACAACTTGAT CGTCATCCAG GATACAAGAT CGTCGTCACT
651 GGACATTCCT TGGGAGGTGC AACAGCTGTT CTCAGTGCAC TTGACCTTTA
701 TCACCATGGC CATGCCAATA TCGAAATCTA TACTCAAGGT CAGCCACGTA
751 TAGGTACTCC AGCATTTGCA AACTATGTGA TAGGCACCAA GATTCCATAC
801 CAACGTCTTG TCCATGAGCG TGACATTGTT CCTCACCTTC CACCTGGTGC
851 ATTTGGTTTC TTGCATGCTG GTGAAGAGTT TTGGATCATG AAAGATAGCT
901 CGTTGCGCGT ATGTCCAAAT GGCATTGAAA CTGACAACTG CAGCAACTCC
951 ATTGTTCCCT TCACTAGTGT CATTGACCAT TTAAGCTATC TTGACATGAA
1001 CACTGGTCTC TGTTTATAAT CTTTAGTATC ATCCACTCCT CCTCTTTAAT
1051 GCAATACTTT TTAAGATAAA TCACAAGTAT ACTTTGTACA AAACCAAAAA
1101 AAAAAAAAAA AAAAA

```

Abb. 9





TCATTCCTGGTGGTCGATGGAGCTGTCCCACTGTGGTGTTGCATCCAATTTGCAAATTA  
 5101 → → → → → 5160  
 AGTAAGGACCACCAGCTACCTCGACAGGGGTGACACCACAACGTAGGTAAACGTTTAAT

c I P G G R W S C P H C G V A S N L Q I T

T C  
 M s B v  
 s p a i  
 e R e J  
 I I I

CCAAGACTTTTCAGCACCTTAATCACTGATACTAATGTCTTGGTGGCTGTTGGCGAAAAGG  
 5161 → → → → → 5220  
 GGTTCTGAAAGTCGTGGAATTAGTGACTATGATTACAGAACCACCGACAACCGCTTTTCC

c K T F S T L I T D T N V L V A V G E K E

T  
 s  
 M C p B  
 BB b R Av S M s  
 cb o s li Q w r  
 cs I a u J o D  
 II I I III I I

AGAAGACCATCTATGTAGTTTTTCGTGGTACAAGCTCAATTGCGAACGCCATTGCTGACA  
 5221 → → → → → 5280  
 TCTTCTGGTAGATACATCAAAAAGCACCATGTTGAGTTAAGCGTTGCGGTAACGACTGT

c K T I Y V V F R G T S S I R N A I A D I

T  
 s  
 p T N C B U  
 R B S s M B I v s R b  
 s s O p s s a i a s a  
 a r 9 R e l I X a C  
 II II II VII II

TTGTTTTTGTACCAAGTGAATTATCCACCTGTTAATGGAGCCAAAGTACACAAAGGATTTTC  
 5281 → → → → → 5340  
 AACAAAAACATGGTCACTTAATAGGTGGACAATTACCTCGGTTTCATGTGTTTCCTAAAG

c V F V P V N Y P P V N G A K V H K G F L

E S E  
 C cBS a c  
 Av asc F u Do  
 li Rpr o 3 p5  
 uJ IGF k An7  
 II III I III  
 / /

Abb. 10 (Forts.)



AACGTCCTGTCCATGAGCGTGACATTGTTCTCACCTTCCACCTGGTGCATTGGTTTCT  
 5581 ————— 5640  
 TTGCAGAACAGGTACTCGCACTGTAACAAGGAGTGGAAAGGTGGACCACGTAAACCAAAGA  
 c RLVHERDIVPHLPFGAAGFL

N S N  
C C I a M I C C  
v a a E M N S H u D b R a A j A v M H T  
i c l a s s p p 3 p o c l l e l i w h h  
R 8 l n p h h A n l a l w P u J o a a  
I I I I I I I I I I I I I I I I  
I I I I I I I I I I I I I I I I  
T G C A T G C T G G T G A A G A G T T T T G G A T C A T G A A A G A T A G C T C G T T G C G C G T A T G T C C A A A T G  
5641 -----+-----+-----+-----+ 5700  
A C G T A C G A C C A C T T C T C A A A A C C T A G T A C T T T C T A T C G A G C A A C G C G C A T A C A G G T T T A C

c H A G E E F W I M K D S S L R V C P N G

CB  
 S vsPT      B      SB      M  
 f ioss      b      pf      s  
 c RFte      v      ea      e  
 I IIII      I      II      I  
 /  
 GCATTGAAACTGACAACTGCAGCAACTCCATTGTTCCCTTCACTAGTGTCATTGACCATT  
 5701 —————→ 5760  
 CGTAACTTTGACTGTTGACGTCGTTGAGGTAACAAGGGAAGTGATCACAGTAACTGGTAA

C IETDNCSNSIVPFTSVIDHL

T  
 N S H N s  
 C I T B a C B a l p  
 Av a Bs Bs M XB uvAseT a 5  
 li l sp sm n bf 9 iccl a l Q  
 uJ l rR aA l aa 6 JiFlu l 9  
 II l II II l II l III l l  
 / / /  
 TAAGCTATCTTGACATGAACACTGGTCTCTGTTTATAGTCTAGAGGGCCGCATGATGTAA  
 5761 +-----+-----+-----+-----+ 5820  
 ATTCGATAGAACTGTACTTGTGACCAGAGACAAATATCAGATCTCCGGCGTACTACATT

c SYLDMNTGLCL\*SRGPHDVI  
STOP of ATTC 44896

```

MT
as      C          B      R C
ep      j F      M As    i j
14      e o      n cr    e e
15      P k      l i B    A P
11      | |      | |    | |
/
TTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAA

```

Abb. 10 (Forts.)

5821 -----+-----+-----+-----+-----+ 5880  
AATCAATACAGTGCGAATGTAAGTGCGGGAGGGGGGTAGGCGAGATTGGCTTTTCCTT

c SYVTLTFTPSPHIRSNRKGR

E  
c  
oPS E  
B AONsa c  
s B v1pu o M  
m f a0a59 5 s  
F a 19116 7 e  
I I IIVII I I

//

GGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTA

5881 -----+-----+-----+-----+-----+ 5940  
CCTCAATCTGTTGGACTTCAGATCCAGGGATAAATAAAAAATATCAATACAATCATAAT

c S\*TT\*SLGPYLFFYSYVSIK

Abb. 10 (Forts.)

B BC  
Ts B B MA MAsvMT  
so b p wc nloIws  
eF v m oi luFJoe  
I II III IIIII

ATGAGATTTCTTCTATTCTTACTGCTGTTTTATTGCGTGCTTCCTCCGCTTTAGCTGCT  
1-----60  
TACTCTAAAGGAAGATAAAAAATGACGACAAAATAAGCGACGAAGGAGGCAGAAATCGACGA

a M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A .

T  
H s E M M  
i CM pc BCsP C a  
B n B s vb A5 o Acvpv Av e  
s cs p io p05 leiAu li l  
r lb R JI o97 ufJl uJ l  
I II I II III IIIII I

CCAGTCAACACTACCACTGAAGATGAAACGGCTCAAATTCAGCTGAAGCTGTCATCGGT  
61-----120  
GGTCAGTTGTGATGGTGACTTCTACTTTGCCGAGTTTAAGGTGCACTTCGACAGTAGCCA

a P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G .

E H  
c g  
o T H C i  
5 a p j E  
7 q h e l  
I I I I

TACCTTGATTAGAAGGTGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACCTCCACCAAT  
121-----180  
ATGAGACTAAATCTTCCACTAAAGCTACAACGACAAAACGGTAAAAGGTTGAGGTGGTTA

a Y L D L E G D F D V A V L P F S N S T N .

T B B  
s s M TsM  
p M C B s M TsM  
4 m j b r w son  
C e e v D o eFl  
I I I I III

AACGGTTTATTGTTTATCAATACTACTATTGCCTCCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGTGTT  
181-----240  
TTGCCAAATAACAAATAGTTATGATGATAACGGAGGTAACGACGATTTCTTCTTCACAA

a N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V .

M H  
b iT  
o nf  
l fi  
l II  
/  
TCTTTGGATAAAAGA  
241-----255  
AGAAACCTATTTTCT

a S L D K R .

Abb. 11