



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 36 606 T2 2007.08.09

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 275 712 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 36 606.1

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 017 961.0

(96) Europäischer Anmeldetag: 26.04.1996

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 15.01.2003

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 04.10.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 09.08.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 9/42 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

95201115 28.04.1995 EP
614115 12.03.1996 US

(73) Patentinhaber:

Henkel KGaA, 40589 Düsseldorf, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL

(72) Erfinder:

Lenting, Hermanus Bernardus Maria, 2641
Pijnacker, NL; Van Beckhoven, Rudolf Franciscus
Wilhelmus, 4334 Breda, NL; Maurer Karl-Heinz,
40699 Erkrath, DE; Kottwitz, Beatrix, 40593
Düsseldorf, DE; Weiss, Albrecht, 40764
Langenfeld, DE; Van Solingen, Pieter, 2671
Naaldwijk, NL

(54) Bezeichnung: Cellulasen enthaltende Waschmittel

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bildung von einzelnen Cellulasen für Waschmittel-Anwendungen.

[0002] Cellulasen, die auch als cellulolytische Enzyme bezeichnet werden, sind Enzyme, die zur Hydrolyse der β -D-glucosidischen Bindungen in Cellulosen fähig sind. Cellulolytische Enzyme wurden üblicherweise in drei Klassen unterteilt: Endoglucanases, Exoglucanases bzw. Cellobiohydrolasen und β -Glucosidasen (Knowles, J., et al., 1987, TIBTECH 5, S. 255-261). Cellulolytische Enzyme können durch zahlreiche Bakterien, Hefen und Pilze gebildet werden. Mikroorganismen, die Cellulasen bilden, werden beispielsweise in GB-A-2094826 beschrieben.

[0003] Es wurden mehrere Anwendungen für den Einsatz von cellulolytischen Enzymen entwickelt:

- Abbau von (Holz-)Cellulosebrei zu Zuckern für die Herstellung von (Bio-)Ethanol;
- mehrere Textilbehandlungen wie z.B. „Stone-Washing“ und „Biopolishing“;
- Anwendung in Waschmittelmischungen.

[0004] Der Einsatz von Cellulasen in Waschmittelmischungen begann mit Cellulasen, die die Rauheit von Baumwolle enthaltenden Stoffen verringern (d.h. weich machen) können, wie es beispielsweise in GB-B-1358599 beschrieben wird.

[0005] Es ist ferner bekannt, dass Waschmittelmischungen, die Cellulasen umfassen, Schmutz wirksam entfernen, d.h. reinigen. Die Wirksamkeit von cellulolytischen Enzymen (Cellulasen) in Bezug auf die Reinigung von Textilien ist seit einiger Zeit anerkannt. GB-A-2075028, GB-A-2095275 und GB-A-2094826 offenbaren Waschmittelmischungen mit Cellulase für bessere Reinigungsleistungen.

[0006] Es ist in der Technik auch bekannt, dass Cellulasen als farbreinigendes Mittel in Waschmitteln wirken können. Nach wiederholtem Waschen von verschmutzter Wäsche sehen Baumwolle enthaltende Stoffe gräulich aus und dies ist wahrscheinlich durch die durch mechanische Einwirkung gerissenen Fasern bedingt. Die Fasern reißen, was zu durcheinander liegenden Fasern führt, die gebrochen sind. Der Einsatz von Cellulasen als farbreinigende Mittel für farbige Textilien wurde in EP-A-0220016 beschrieben. Derzeit werden Cellulasmischungen von dem Pilzstamm Humicola insolens (DSM 1800) üblicherweise in Waschmitteln verwendet, um Antipilling- und FarbwiederherstellungsEigenschaften zu erzielen. Das cellulolytische Enzymsystem, das von dem Wildtyp-Mikroorganismus gebildet wird, ist unter dem Handelsnamen Celluzyme® bei Novo-Nordisk erhältlich. Ferner wird eine klonierte (einzelne) Cellulase des gleichen Ursprungs unter dem Namen Carezyme® ebenfalls in Waschmitteln eingesetzt.

[0007] Der Hauptnachteil der in der Technik bekannten Cellulasen, die Farbreinigungs-Eigenschaften aufweisen, besteht darin, dass diese Enzyme die Cellulose enthaltenden Stoffe aggressiv abbauen, was zur Beschädigung durch unerwünschten Verlust der Zugfestigkeit der Stoffe führt.

[0008] Andererseits haben die in der Technik bekannten Cellulasen, die gute Reinigungseigenschaften besitzen, kaum eine farbreinigende Wirkung. Das weltweit erste kommerzielle Waschmittel mit Cellulasen enthielt eine bakterielle Cellulase. Dieses Enzym repräsentiert eine basische Endoglucanase (s.o.) von einer Bacillus-Spezies, die Cellulosefasern nicht angreift. Das Enzym sorgt Beschreibungen zufolge für eine Reinigungswirkung während des Waschens. In Bezug auf Antipilling oder Farbwiederherstellung wurden für dieses Enzym keine Wirkungen beschrieben.

[0009] Aus dem vorstehend Gesagten geht hervor, dass noch immer Bedarf nach besseren Cellulasen bei Waschmittel-Anwendungen besteht. Die Verwendung von Cellulasenmischungen, wie sie in der internationalen Patentanmeldung WO-A-95/02675 vorgeschlagen wird, soll die oben genannten Leistungen beim Wäsche-waschen bereitstellen, doch nach unseren Kenntnissen war es vorher nicht möglich, einzelne Enzyme zu verwenden, die alle diese Eigenschaften aufweisen, wenn sie beim Wäschewaschen angewendet werden.

[0010] Überraschenderweise wurde herausgefunden, dass der Einsatz bestimmter einzelner Cellulasen, die beim Wäschewaschen zu Reinigung, Antiredeposition, Farbreinigung und Antipilling in der Lage sind, überhaupt nicht zu einer inakzeptablen Beschädigung der gewaschenen Textilien führt.

[0011] Demzufolge bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Bereitstellung einzelner Cellulasen für Waschmittel-Anwendungen, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- (a) Isolieren von alkalitoleranten, Cellulase bildenden Mikroorganismen, die von Wasser- oder Bodenproben aus einer alkalinen Umgebung erhalten werden können,
- (b) Reinigen der Cellulasen von diesen Stämmen,
- (c) Bestimmen des Zugfestigkeitsverlusts (TSL, wie hier definiert) während des Waschverfahrens,
- (d) Bestimmen der Antipilling-Eigenschaften (AP, wie hier definiert) während des Waschverfahrens, und
- (e) Auswählen der Cellulasen mit einem Verhältnis zwischen dem Zugfestigkeitsverlust (TSL) und den Antipilling-Eigenschaften (AP) von unter 1.

[0012] Die Verwendung einer einzelnen Cellulase, die von alkalitoleranten, Cellulase bildenden Mikroorganismen gereinigt ist, die von Wasser- oder Bodenproben aus einer alkalinen Umgebung erhalten werden können, oder die Verwendung eines Derivats dieser Cellulase mit einem Verhältnis zwischen dem Zugfestigkeitsverlust (TSL) und den Antipilling-Eigenschaften (AP) von unter 1, vorzugsweise unter 0,8, insbesondere im Bereich von 0,001 bis 0,5, in wässrigen Wäschelösungen ist der Gegenstand der gleichzeitig anhängigen europäischen Patentanmeldung 96914993.9 (Veröffentlichungsnr. EP-A-827534).

[0013] Das Messen des Zugfestigkeitsverlusts ist ein Weg zur Messung des durch mechanische Belastung oder enzymatische Wirkung auf Fasern verursachten Schadens. Es versteht sich, dass für den Zweck der vorliegenden Erfindung Baumwollfaser verwendet werden muss. Das Verfahren misst die Zugfestigkeit einzelner Fasern unter nassen Bedingungen. Es wird in der deutschen Norm DIN 53857, Teil 1, und der internationalen Norm ISO 2267 beschrieben.

[0014] Da sich die Wirkung normalerweise erst nach ungefähr 20 bis 25 Waschzyklen in wesentlichem Maße zeigt, ergibt sich wegen der während des Waschverfahrens auf die Baumwollfaser wirkenden mechanischen Kräfte immer ein gewisser Verlust der Zugfestigkeit. Demnach muss der Zugfestigkeitsverlust eines Kontrollstoffs, der ohne Cellulasen, aber mit derselben Waschmittelformulierung und demselben Waschmaschinentyp und Waschprogramm gewaschen wird, subtrahiert werden. Zur Kalibrierung der Werte wird ein Präparat der (einzelnen) Endoglucanase V von Humicola insolens (EG V) in gleichen Mengen enzymatischen Proteins im Waschmittel als Standardsubstanz verwendet und der Wert des Zugfestigkeitsverlusts für diese Probe minus dem Kontrollwert des Waschmittels ohne Cellulase als TSL von 100% festgesetzt. Diese Cellulase EG V wurde beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 91/17243 beschrieben. Man kann die Proteinmenge beispielsweise nach dem BCA-Pierce-Verfahren messen, das von R.E. Brown et al. in Anal. Biochem., 1989, Bd. 180, S. 136-139, beschrieben wird.

[0015] Ein Präparat der oben genannten Bacillus-Cellulase, die bei Kao Corp. unter dem Markenzeichen KAC® 500 oder KAC® 700 erhältlich ist, kann als Vergleich dienen, was normalerweise zu einem äußerst geringen Zugfestigkeitsverlust im Vergleich zu dem Kontrollwaschversuch ohne Cellulase führt.

[0016] Der Angriff von Cellulasen auf hervorstehende Mikrofibrillen, Faserknötchen und Baumwollflusen auf der Oberfläche eines Baumwollstoffs führt zu einer optisch erkennbaren Entfernung dieser Faserknötchen. Zur Prüfung der Wirkung sind Waschvorgänge durchzuführen, bei denen ein Waschmittel mit und ohne Cellulase verwendet wird, wie es bei der TSL-Bestimmung bereits beschrieben wurde. Auch die Antipilling-Wirkung ist am besten nach einer zunehmenden Anzahl von Waschzyklen sichtbar. Daher dient generell eine Anzahl von 15 bis 40 Waschzyklen zur Demonstration dieser Wirkung von Cellulasen.

[0017] Es gibt drei unterschiedliche Verfahren, die zur Quantifizierung dieser Wirkung verwendet werden können:

1. visuelle Bewertung durch eine Prüfgruppe (Kommission),
2. Messung der Lichtreflexion (L-Wert des CIELAB-Systems),
3. Bestimmung der Baumwollflusen mittels optischer Messungen.

[0018] Die Bestimmung mit dem L-Wert des CIELAB-Systems (Commission Internationale de l'Éclairage) wurde von U. Hotz in Tenside Surf. Det., 1993, Bd. 30, S. 388, beschrieben.

[0019] Das optische Messsystem, das im bevorzugten Verfahren zur Bestimmung der Antipilling-Eigenschaften verwendet wird, besteht normalerweise aus einer Lichtquelle, einem Mikroskopotubus und einer CCD-Farbkamera, die das von der Oberfläche eines Stoffs reflektierte Licht aufzeichnet. Die Menge des durch digitale Bildanalyse gemessenen reflektierten Lichts variiert je nach der Anzahl an Faserknötchen und Flusen auf der Stoffoberfläche. Ein solches System kann zur quantitativen Messung der Anzahl an Faserknötchen und Flusen auf Stoffen eingesetzt werden – in der Regel nach 15 bis 40 Waschzyklen je nach Art und Aktivität der Cellulase, die dem Waschmittel zugesetzt wurde. Ein optisches System, das zur Messung des Pilling-Grades ver-

wendbar ist, wurde von T. Müller-Kirschbaum und H. Grundmann in SÖFW, Bd. 118 (1992), S. 483-499, beschrieben.

[0020] Welches Verfahren auch immer eingesetzt wird, um die Antipilling-Wirkung der zu prüfenden Cellulase zu bestimmen: die Standard-Cellulase EG V ist unter denselben Bedingungen zu prüfen und ihre Wirkung ist mit demselben Verfahren zu bestimmen, wobei der Wert berücksichtigt wird, der sich aus der Verwendung des Waschmittels ohne Cellulase ergibt. Der für EG V erhaltene Wert gilt als AP = 100%.

[0021] Aus dieser Definition geht hervor, dass die bekannte Cellulase EG V von Humicola insolens ein Verhältnis zwischen TSL und AP aufweist, das 1 beträgt. Da die oben genannte Bacillus-Cellulase, die bei Kao Corp. unter dem Markenzeichen KAC® 500 oder KAC® 700 erhältlich ist, einen niedrigen AP-Wert und einen sehr niedrigen TSL-Wert hat, beträgt offensichtlich auch das Verhältnis für diese Cellulase ungefähr 1. Cellulasen, die erfundungsgemäß zur Verwendung in wässrigen Wäschelösungen ausgewählt werden können, haben ein Verhältnis zwischen TSL und AP, das so weit wie möglich unter 1, vorzugsweise unter 0,8 und insbesondere im Bereich von 0,001 bis 0,5 liegt. Ein Verhältnis zwischen TSL und AP von beispielsweise 0,5 bedeutet, dass nur 50% Zugfestigkeitsverlust bei einer Enzymkonzentration auftritt, die die gleiche Antipilling-Wirkung wie die Standard-Cellulase erreicht.

[0022] Die wässrige Wäschelösung umfasst geeigneterweise eine Cellulase nach der obigen Definition in Konzentrationen von 0,01 bis 0,2 mg/l, insbesondere von 0,015 bis 0,1 mg/l. Diese Konzentrationen beziehen sich auf das Gewicht des cellulolytischen Proteins. Außerdem können alle Bestandteile vorhanden sein, die normalerweise in Wäschelösungen vorkommen.

[0023] Es wurde herausgefunden, dass der Einsatz einer durch die Erfindung bereitgestellten einzelnen Cellulase im Gegensatz zu vorher bekannten Cellulasemischungen, die für Farbreinigung sorgen, nicht die Baumwolle auf ein unerwünschtes Niveau abbaut, das Zugfestigkeitsverlust hervorruft.

[0024] Es wurde ferner herausgefunden, dass sich das Enzym bei Verwendung einer Cellulase nach der erfundungsgemäßen Definition im Gegensatz zu vorher bekannten Cellulasen, die für Farbreinigung sorgen, nicht nach wiederholtem Wäschewaschen auf dem Stoff ansammelt.

[0025] Wie bereits angemerkt wurde, betrifft die vorliegende Erfindung allgemein die Bereitstellung neuer Cellulasen. Vor der detaillierteren Offenbarung dieser Erfindung werden jedoch folgende Begriffe definiert: „Cellulase“ ist eine allgemeine Bezeichnung für Enzyme, die auf Cellulose und deren Derivate wirken und sie zu Glucose, Cellobiose oder Cellooligosacchariden hydrolyseren.

[0026] Der hier verwendete Begriff „einzelne“ Cellulase soll eine Cellulase bedeuten, die durch ein Gen gebildet wird.

[0027] „Gewinnbar von“ einem Organismus im Zusammenhang mit einer Cellulase bedeutet, dass eine solche Cellulase eine Aminosäuresequenz aufweist, die der Aminosäuresequenz einer Cellulase entspricht, die von diesem Organismus gewonnen werden kann.

[0028] „Derivat“ soll ein Protein bezeichnen, das von dem nativen Protein abgeleitet wird, indem eine oder mehrere Aminosäuren einem oder beiden der C- und N-terminalen Enden des nativen Proteins hinzugefügt werden, eine oder mehrere Aminosäuren an einer oder mehreren verschiedenen Stellen der nativen Aminosäuresequenz substituiert werden, eine oder mehrere Aminosäuren an einem oder beiden Enden des nativen Proteins oder an einer oder mehreren Stellen der Aminosäuresequenz deletiert werden, oder eine oder mehrere Aminosäuren an einer oder mehreren Stellen der nativen Aminosäuresequenz inseriert werden. Die Herstellung eines Derivats wird normalerweise dadurch erzielt, dass eine für das native Protein kodierende DNA-Sequenz modifiziert wird, diese DNA-Sequenz in einen geeigneten Wirt transformiert wird und die modifizierte DNA-Sequenz exprimiert wird, um das Derivatprotein zu bilden. Das Derivat der Erfindung umfasst Peptide, die im Vergleich zu einer Aminosäuresequenz eines Vorläuferenzyms (z.B. ein Wildtypenzym oder Enzym in nativem Zustand gemäß der vorliegenden Erfindung) veränderte Aminosäuresequenzen umfassen, und wobei Peptide eine charakteristische Enzymbeschaffenheit des Vorläuferenzyms bewahren, aber in einem spezifischen Aspekt veränderte Eigenschaften aufweisen. Eine veränderte Cellulase kann beispielsweise ein höheres pH-Optimum oder eine höhere Temperaturbeständigkeit haben, bewahrt jedoch ihre charakteristische Cellulaseaktivität. Derivate umfassen ebenfalls chemische Modifikationen von Aminosäureresten innerhalb des Enzymmoleküls.

[0029] „Wirtszelle“ bedeutet eine Zelle, die die Fähigkeit hat, als Wirt und Expressionsvehikel für den Vektor von rekombinanter DNA zu wirken, der DNA enthält, die für das native Protein oder ein Derivat kodiert.

[0030] Der Begriff „Reinigen“ bedeutet das Entfernen von Schmutz, der an der Wäsche haftet.

[0031] Der Begriff „Pilling“ in dieser Hinsicht bedeutet die durch gebrochene oder durcheinander liegende Fasern hervorgerufene Bildung von Faserknötchen und Fusseln auf der Oberfläche von Baumwolle enthaltenden Stoffen.

[0032] Der Begriff „Antipilling“ dient dazu, das Verhindern der Bildung von Faserknötchen und Fusseln auf der Oberfläche von Baumwolle enthaltenden Stoffen sowie das Entfernen von Faserknötchen und Fusseln aus Baumwolle enthaltenden Stoffen zu beschreiben. Das Antipilling führt normalerweise zur Farbreinigung, wenn farbige, Baumwolle enthaltende Stoffe behandelt werden.

[0033] Der Begriff „Farbreinigung“ in dieser Hinsicht ist die Wiederherstellung des attraktiven, frischen Aussehens von farbigen Stoffen, die auf Cellulose basierende Fasern enthalten bzw. daraus bestehen, die durch Behandlung des farbigen Stoffs – insbesondere mit Waschmitteln – immer gräulicher aussehen.

[0034] Der Begriff „Redeposition“ in dieser Hinsicht ist die Ablagerung von Schmutz- oder Farbbestandteilen, die beim Wäschewaschen oder der Textilbehandlung aus diesen Textilien bzw. Stoffen entfernt wurden.

[0035] Der Begriff „Antiredeposition“ in dieser Hinsicht ist die Wirkung von Cellulase, die die Redeposition von Schmutz- oder Farbbestandteilen auf dem Stoff verhindert oder vermindert.

[0036] „Wäschelösung“ bedeutet eine wässrige Lösung, die zum Waschen, Spülen oder Konditionieren (z.B. Weichmachen) von Stoffen dient.

[0037] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Auswählen einer Cellulase, die aus Mikroorganismen gewonnen werden kann. Als erfolgreiches Beispiel können diejenigen Mikroorganismen angesehen werden, die gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren bei dem Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande, am 23. Dezember 1993 unter den Hinterlegungsnummern CBS 669.93 und CBS 670.93 hinterlegt wurden (beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO-A-95/18219). Diese Stämme wurden als neue Spezies der Gattung *Bacillus* klassifiziert, die zu keiner der derzeit bekannten rRNA-Gruppen von *Bacillus* gehören. Die hinterlegte Spezies wird im vorliegenden Dokument als CBS 669.93 und CBS 670.93 bezeichnet.

[0038] Die Mikroorganismen können beispielsweise von Wasser- und Bodenproben erhalten werden, die in alkalinen Umgebungen wie beispielsweise alkalinen Böden und Natronseen gesammelt wurden.

[0039] Die Mikroorganismen wurden anschließend mit dem Carboxymethylcellulase-Agardiffusionstest (CMC-Agardiffusionstest) ausgesucht. Stämme, die bei diesem Test einen Hemmhof zeigten, wurden als potentielle Cellulase bildende Stämme isoliert. Es wurden genomische Genbibliotheken der alkalitoleranten, Cellulase bildenden Stämme erstellt. Rekombinante Klone wurden durch Agardiffusion auf CMC-Agar ausgesucht. Rekombinante Klone, die Hemmhöfe rings um die Kolonie aufwiesen, wurden isoliert. Einzelne Cellulosen wurden 48 Stunden bei 30°C durch Fermentation der rekombinanten Klone in 4% YEP-Medium gebildet. Die gewonnenen einzelnen Cellulosen, die optional wie in Beispiel 1 gereinigt wurden, wurden in den Tests geprüft, die oben für die Messung von TSL und AP definiert sind.

[0040] Überraschenderweise wurde herausgefunden, dass die von CBS 670.93 oder CBS 669.93 gewinnbaren Cellulosen eine gute Leistung in beiden Tests zeigten und ein Verhältnis zwischen TSL und AP von unter 1 aufwiesen.

[0041] Bei einem Beispiel der Erfindung wird eine ca.-50-kD-Cellulase [berechnet auf Basis der Aminosäuresequenz (SEQ ID No. 2) des reifen Proteins] beschrieben, die von CBS 670.93 (hier als „BCE 103“ bezeichnet) abgeleitet wurde. Durch Analyse des Gens, das für die Aminosäuresequenz der ca.-50-kD-Cellulase kodiert, wurde gezeigt, dass diese Cellulase zu 89% sequenzidentisch und zu 92,5% sequenzähnlich mit der Cellulase CelA von *Bacillus* sp. N-4 ist (Fukimori et al., J. Bacter., Bd. 168, S. 479-485), indem das TFastA-Programm (Sequence Analysis Software Package 6.0 von Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Biotechnology Center, Madison, Wisconsin) zum Einsatz kam, das von Pearson und Lipman in Proc. Nat. Acad. Sci., Bd. 85, S. 2444-2448 (1988), beschrieben wurde.

[0042] Bei einem anderen Beispiel der Erfindung wird eine ca.-63-kD-Cellulase (berechnet auf Basis der Aminosäuresequenz des reifen Proteins) beschrieben, die von CBS 669.93 (hier als „BCE 113“ bezeichnet) abgeleitet wurde. Durch Analyse des Gens, das für die Aminosäuresequenz der ca.-63-kD-Cellulase kodiert, wurde gezeigt, dass diese Cellulase zu 58% sequenzidentisch und zu 72% sequenzähnlich mit der Cellulase CelB von *Bacillus lautus* ist (Jorgensen et al., Gene, Bd. 93, 1990, S. 55-60), indem das TFastA-Programm (Sequence Analysis Software Package 6.0 von Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Biotechnology Center, Madison, Wisconsin) zum Einsatz kam, das von Pearson und Lipman in Proc. Nat. Acad. Sci., Bd. 85 (1990), S. 2444-2448, beschrieben wurde. Die Aminosäuresequenz von BCE 113 ist als SEQ ID No. 4 angegeben.

[0043] Eine Cellulase, die für Waschmittel von Nutzen sein kann und außerdem ein Verhältnis zwischen TSL und AP von unter 1 aufweist, zeigt normalerweise eine gute Leistung bei dem Antiredepositonstest, der in Beispiel 5 beschrieben wird. Die Wahrung der Weiße von weißem Stoff wird durch eine Reflexionsmessung bestimmt. Je höher der Reflexionswert, desto wirksamer ist die getestete Cellulase bei der Antiredeposition. Diese Cellulasen zeigen auch bei dem Weichmachtest eine gute Leistung, der in Beispiel 5 beschrieben wird. „Depilling“ bedeutet das Entfernen von Fibrillen und/oder Mikrofasern, die durcheinander liegen und/oder gebrochen sind und normalerweise dazu führen, dass ein farbiger, Baumwolle enthaltender Stoff gräulich aussieht. Je mehr durcheinander liegende und/oder gebrochene Fibrillen entfernt werden, desto besser sehen die farbigen, Baumwolle enthaltenden Stoffe aus. Die Depilling Wirksamkeit kann von einer Kommission beurteilt oder durch ein Bildanalyse system quantifiziert werden, wie es oben für die AP-Messung angegeben ist. Cellulasen, die die Anforderung für das oben definierte Verhältnis erfüllen, zeigen im Allgemeinen folgende Eigenschaften: einen Delta-Remissionswert von mindestens 4 Einheiten, vorzugsweise mindestens 5 Einheiten, bei dem in den Beispielen definierten Antiredepositonstest sowie ein Depilling-Ergebnis, das zumindest mit dem der Cellulase vergleichbar ist, die von CBS 670.93 gewinnbar ist.

[0044] Man kann die durch die vorliegende Erfindung bereitgestellten Cellulasen mit einem Verfahren herstellen, das mit Gentechnik entwickelt werden kann. Als erster Schritt kann das für die Cellulase der vorliegenden Erfindung kodierende Gen mit λ -Phagen-Vektoren (Expressionsvektoren) und *E. coli*-Wirtszellen kloniert werden. Alternativ kann man die PCR-Klonierung mit Consensus-Primern verwenden, die an konservierten Domänen entwickelt werden. Die Expression des für die Cellulase der vorliegenden Erfindung kodierenden Gens in *E. coli* ergibt nachweislich ein aktives Protein.

[0045] Nach einem ersten Klonierungsschritt in *E. coli* kann ein Cellulase-Gen zu einem bevorzugteren, technisch bedeutenden Expressionswirt wie *Bacillus*- oder *Streptomyces*-Spezies, einem Fadenpilz wie *Aspergillus* oder einer Hefe transferiert werden. Eine ausgeprägte Expression und Sekretion, die bei diesen Wirtsorganismen erzielbar ist, ermöglicht das Sammeln der Cellulase der Erfindung im Fermentationsmedium, aus dem sie anschließend zurückgewonnen werden kann.

[0046] Die durch die Erfindung bereitgestellten Cellulasen können vorzugsweise in Bezug auf das cellulolytische Protein in Mengen von $8 \cdot 10^{-5}$ Gew.-% (0,8 ppm) bis $8 \cdot 10^{-3}$ Gew.-% (80 ppm), insbesondere von $1 \cdot 10^{-4}$ Gew.-% (1 ppm) bis $4 \cdot 10^{-3}$ Gew.-% (40 ppm), in Waschmitteln verwendet werden. Waschmittelmischungen, die eine durch die Erfindung bereitgestellte Cellulase umfassen, können auch grenzflächenaktive Stoffe, die anionisch, nichtionisch, kationisch, amphotero oder zwitterionisch sind, sowie Gemische dieser grenzflächenaktiven Stoffklassen umfassen. Solche Waschmittelmischungen können andere in der Technik bekannte Waschmittelbestandteile wie beispielsweise Aufbaustoffe, Bleichmittel, Bleichaktivatoren, Antikorrosionsmittel, Komplexbildner, Soil-Release-Polymer, Parfüme, andere Enzyme, Enzymstabilisatoren usw. enthalten.

[0047] Geeignete Aufbaustoffe sind insbesondere diejenigen der Polycarbonsäuren-Klassen, vor allem polymere Acrylsäuren, Methacrylsäuren, Maleinsäuren, Copolymeren davon und oxidierte Kohlenhydrate, die in der internationalen Patentanmeldung WO-A-93/16110 beschrieben werden, Schichtsilikate, insbesondere Bentonite, Aluminiumsilikate, insbesondere Zeolithe, kristalline oder amorphe Alkalimetallsilikate, insbesondere Natriumsilikat, und Alkalimetallcarbonate, insbesondere Natriumcarbonat. Die genannten Polycarbonsäuren werden normalerweise in Form ihrer Alkalimetallsalze verwendet, insbesondere in Form ihrer Natrium- oder Kaliumsalze. Die in geeigneter Weise integrierten Zeolithe sind insbesondere diejenigen des A-, P- oder X-Typs oder Gemische davon. Geeignete Alkalimetallsilikate sind diejenigen mit Molverhältnissen zwischen SiO_2 und dem Alkalimetalloxid, die 1,5 bis 3,0 betragen. Aufbaustoffe wie diese sind geeigneterweise in Mengen von 20 bis 80 Gew.-% in solchen Waschmitteln vorhanden.

[0048] In den Waschmitteln können nichtionische grenzflächenaktive Stoffe vorliegen, vorzugsweise in Mengen von höchstens 10 Gew.-% und bevorzugter in Mengen von 2 bis 6 Gew.-% basierend auf dem gesamten

Waschmittel. Geeignete nichtionische grenzflächenaktive Stoffe sind Alkylpolyglykoside, die 10 bis 22 Kohlenstoffatome in der Alkylkomponente enthalten, und Alkoxylate, insbesondere Ethoxylate und/oder Propoxylate von gerad- oder verzweigtkettigen C₁₀₋₂₂- und vorzugsweise C₁₂₋₁₈-Alkoholen. Der Alkoxylierungsgrad der Alkohole beträgt zwischen 1 und 20 und vorzugsweise zwischen 3 und 10. Sie können in bekannter Weise durch Reaktion der entsprechenden Alkohole mit den entsprechenden Alkylenoxiden hergestellt werden. Die Fettalkoholderivate sind insbesondere geeignet, obwohl ihre verzweigtkettigen Isomere, vor allem die so genannten Oxoalkohole, zur Herstellung von nutzbaren Alkoxyaten verwendet werden können. Demnach sind die Ethoxylate von primären Alkoholen, die geradkettige Dodecyl-, Tetradecyl-, Hexadecyl- oder Octadecylradikale und Gemische davon enthalten, insbesondere von Nutzen. Ferner kann man die entsprechenden Ethoxylierungs- und/oder Propoxylierungsprodukte von Alkylaminen, vicinalen Diolen und Carbonsäureamiden, die den in Bezug auf die Alkylkomponente genannten Alkoholen entsprechen, und von Alkylphenolen, die 5 bis 12 Kohlenstoffatome in der Alkylkomponente enthalten, verwenden.

[0049] Geeignete anionische grenzflächenaktive Stoffe sind insbesondere diejenigen des Sulfat- oder Sulfonattyps, obwohl man auch andere Typen wie beispielsweise Seifen, langkettige N-Acylsarcosinate, Salze von Fettsäurecyanamiden oder Salze von Ethercarbonsäuren verwenden kann, die aus langkettigen Alkyl- oder Alkylphenyl-Polyglykolethern und Chloressigsäure gewonnen werden können. Die anionischen grenzflächenaktiven Stoffe werden vorzugsweise in Form der Natriumsalze verwendet. Grenzflächenaktive Stoffe sind vorzugsweise in Mengen von 2 bis 30 Gew.-% und bevorzugter in Mengen von 5 bis 20 Gew.-% vorhanden.

[0050] Besonders geeignete grenzflächenaktive Stoffe des Sulfattyps sind die Schwefelsäuremonoester von langkettigen primären Alkoholen natürlichen oder synthetischen Ursprungs, die 10 bis 20 Kohlenstoffatome enthalten, d.h. die Schwefelsäuremonoester von Fettalkoholen wie beispielsweise Kokosöl-Fettalkoholen, Talg-Fettalkoholen, Oleylalkohol oder den C₁₀₋₂₀-Oxoalkoholen sowie diejenigen von sekundären Alkoholen mit gleicher Kettenlänge. Die Schwefelsäuremonoester von aliphatischen primären Alkoholen, sekundären Alkoholen und Alkylphenolen, die mit 1 bis 6 mol Ethylenoxid ethoxyliert sind, sind insbesondere geeignet. Sulfatierte Fettsäure-Alkanolamide und sulfatierte Fettsäure-Monoglyceride sind ebenfalls geeignet.

[0051] Die grenzflächenaktiven Stoffe vom Sulfonattyp sind hauptsächlich die Alkylbenzolsulfonate, die C₉₋₁₅-Alkylgruppen enthalten, Sulfobernsteinsäuremonoester und -diester, die 6 bis 22 Kohlenstoffatome in den Alkoholkomponenten enthalten, sowie die Ester von α-Sulfovetsäuren, beispielsweise die α-sulfonierte Methyl- oder Ethylester von gehärteten Kokosöl-, Palmkernöl- oder Talg-Fettsäuren. Andere geeignete grenzflächenaktive Stoffe vom Sulfonattyp sind die Alkansulfonate, die aus C₁₂₋₁₈-Alkanen durch Sulfochlorierung oder Sulfoxidation und anschließende Hydrolyse oder Neutralisation oder durch Zusatz von Hydrogensulfit zu Olefinen und auch Olefinsulfonaten, d.h. Gemischen von Alken- und Hydroxyalkansulfonaten und auch -disulfonaten, gewonnen werden können, die man beispielsweise aus langkettigen Monoolefinen mit einer endständigen oder internen Doppelbindung durch Sulfonierung mit gasförmigem Schwefeltrioxid und anschließender basischer oder saurer Hydrolyse der Sulfonierungsprodukte erhalten kann.

[0052] Bleichmittel werden geeigneterweise aus dem Persauerstoff enthaltenden Typ ausgewählt, beispielsweise Wasserstoffperoxid, Alkaliperborat, Alkalipercarbonat, Alkalipersilikat und/oder Alkalipersulfat. Natriumperborat-Monohydrat und Natriumpercarbonat sind besonders geeignet. Bleichmittel können in Mengen von 5 bis 25 Gew.-% und insbesondere 7 bis 20 Gew.-% vorliegen.

[0053] Bleichaktivatorverbindungen umfassen insbesondere N- oder O-Acylierungsverbindungen, beispielsweise polyacylierte Alkylendiamine, insbesondere Tetraacetylenehydramin, N-acylierte Triazine, insbesondere 1,5-Diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazin, acylierte Glycolurile, insbesondere Tetraacetylglucuril, N-acylierte Hydantoin, Hydrazide, Triazole, Urazole, Diketopiperazine, Sulfurylamide und Cyanurate, außerdem Carbonsäureanhydride, insbesondere Phthalsäureanhydrid, Carbonsäureester, insbesondere Natriumisononanoxybenzolsulfonat, und acylierte Zuckerderivate, insbesondere Pentaacetylglucose. Der Bleichaktivator kann in üblicher Weise mit Hüllsubstanzen überzogen oder, optional unter Einsatz von Granulierhilfsmitteln, granuliert sein und gewünschtenfalls weitere Zusatzstoffe, beispielsweise Farbstoff, enthalten. Es wird vorzugsweise ein Bleichaktivator verwendet, der unter Waschbedingungen Peroxocarbonsäuren mit 2 bis 12 Kohlenstoffatomen, insbesondere Peroxoessigsäure, bildet. Ein besonders geeigneter Bleichaktivator ist Tetraacetylenehydramin (TAED), das mit Carboxymethylcellulose mit durchschnittlichen Partikelgrößen von 0,01 bis 0,8 mm granuliert wurde und durch das im europäischen Patent EP-B-0 037 026 beschriebene Verfahren hergestellt werden kann. Zusätzlich zu den oben genannten Bleichaktivatoren oder sogar als Ersatz dafür kann man so genannte Bleichkatalysatoren einsetzen, die Übergangsmetallkomplexe sind.

[0054] Enzyme außer der definitionsgemäßen Cellulase, die in den Waschmitteln vorhanden sein können,

sind Proteasen, Lipasen, Cutinasen, Amylasen, Pullulanasen, andere Cellulasen, Hemicellulasen, Xylanasen, Oxidasen und/oder Peroxidasen. Sie können in Mengen bis 5 Gew.-%, geeigneterweise von 0,2 bis 2 Gew.-%, vorliegen.

[0055] Die Waschmittelmischungen können in irgendeiner praktischen Form formuliert werden, beispielsweise als Pulver oder Flüssigkeit. Zur Herstellung von Waschmitteln mit einer offensichtlich hohen Dichte von z.B. 650 bis 950 g/l ist ein im europäischen Patent EP-B-0 486 592 beschriebenes Verfahren geeignet, bei dem ein Extrusionsschritt zum Einsatz kommt.

[0056] Textil-Weichmachmischungen, die durch die Erfindung bereitgestellte Cellulase umfassen, können außer dieser Cellulase noch kationische grenzflächenaktive Mittel, vorzugsweise vom so genannten Esterquat-Typ, umfassen, die die Stoffe weich machen und die Stoffweichmach-Eigenschaften der Mischungen steigern können.

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung von Cellulasen

- Aussuchen von Cellulase bildenden Mikroorganismen

[0057] Zur Isolierung von Cellulase bildenden Mikroorganismen wurden zwei Verfahren eingesetzt:

- 1) Die Boden- und Wasserproben wurden in 0,85% Salzlösung suspendiert und direkt beim Carboxymethylcellulose-Agardiffusionstest (CMC-Agardiffusionstest) verwendet, um Cellulase bildende Kolonien nachzuweisen.
- 2) Die Boden- und Wasserproben wurden 1 bis 3 Tage bei 40°C durch Inkubation in einem Cellulase enthaltenden flüssigen Minimalmedium oder GAM-Medium für Cellulase enthaltende Stämme angereichert. Kulturen mit Bakterienwachstum wurden mit dem CMC-Agardiffusionstest auf Cellulaseaktivität analysiert, um Cellulase bildende Kolonien nachzuweisen.

- Isolieren von alkalitoleranten, Cellulase bildenden Stämmen

[0058] Stämme, die Hemmhöfe im Agardiffusionstest zeigten, wurden 72 Stunden bei 40°C in 25 ml GAM-Medium in 100-ml-Schüttelgefäßen in einem Schüttelinkubator (Incubator Shaker von New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) bei 250 U/min fermentiert. Die CMCase-Aktivität wurde in der Kulturlösung bei einem pH-Wert von 9 und 40°C bestimmt.

- Isolieren von Cellulase-Genen

[0059] Genomische Genbibliotheken der alkalitoleranten, Cellulase bildenden Stämme wurden im Plasmid pTZ18R [Mead, D.A., et al. (1986), Protein Engineering, 1, 67] konstruiert. Rekombinante Klone wurden durch Agardiffusion auf CMC-Agar ausgesucht [beschrieben von Wood, P.J., et al. (1988), Methods in Enzymology, 160, S. 59-74]. Stämme, die Hemmhöfe rings um die Kolonie aufwiesen, wurden isoliert. Die CMCase-Aktivität der rekombinanten Stämme wurde nach 48 Stunden Fermentation bei 30°C in 4*YEP-Medium bestimmt. Die Plasmid-DNA der rekombinanten Stämme wurde isoliert und die Inserts wurden durch Restriktionsenzymanalyse und Nukleotidsequenzanalyse charakterisiert.

- Medien

[0060] Das beim CMC-Agardiffusionstest und Anreicherungsverfahren verwendete Minimalmedium (pH-Wert 9,7) bestand aus 1% KNO_3 , 0,1% Hefeextrakt (Difco), 0,1 % KH_2PO_4 , 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% Na_2CO_3 , 4% NaCl und 0,25% CMC (Sigma C-4888). Zur Verfestigung wurde 1,5% Agar zugesetzt.

[0061] Das zur Enzymbildung der Donorstämme verwendete komplexe Medium (GAM) bestand aus 0,5% Pepton (Difco), 0,5% Hefeextrakt (Difco), 1% Glucose· H_2O , 0,1% KH_2PO_4 , 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1% Na_2CO_3 und 4% NaCl. Der pH-Wert wurde mit 4 M HCl auf 9,5 eingestellt und danach wurde 1% CMC zugegeben.

[0062] Das zur Enzymbildung in rekombinanten *E. coli*-Stämmen verwendete komplexe Medium (4*YEP) bestand aus 4% Hefeextrakt (Difco), 8% Pepton (Difco), 0,2% Lactose und 100 µg/l Ampicillin.

- CMC-Agardiffusionstest für Kolonien

[0063] Zellsuspensionen in 0,85% Salzlösung wurden auf einem CMC enthaltenden Minimalmedium plattiert. Nach 1 bis 3 Tagen Inkubation bei 40°C wurden die Platten replikaplattiert; die Ausgangsplatte wurde 15 Minuten gründlich mit 0,1 % Kongorot gespült. Die Platten wurden 30 Minuten mit 1 M NaCl entfärbt. Die Stämme, die rings um die Kolonie einen Hemmhof aufwiesen, wurden als potentielle Cellulasen bildende Mikroorganismen isoliert.

- CMC-Agardiffusionstest für flüssige Fraktionen

[0064] Aliquote Teile von 40 µl Enzimlösung oder Fermentations-Kulturlösung wurden in Löcher pipettiert, die aus einer Schicht von 5 mm Minimalmedium in einer Petrischale ausgestanzt wurden. Nach 16 Stunden Inkubation bei 40°C wurde die Cellulaseaktivität durch Kongorot/NaCl-Behandlung nachgewiesen. Der Durchmesser des Hemmhofs ist ein Maß für die CMCase-Aktivität.

- Resultierende Cellulase

[0065] Diese Versuche führten zur Isolierung eines Cellulase bildenden Mikroorganismus, der danach als CBS 670.93 hinterlegt wurde. Der Mikroorganismus wurde als eine neue Spezies der Gattung *Bacillus* klassifiziert. Klonierungsversuche mit dem CBS 670.93-Stamm als Donorstamm führten zur Isolierung eines *E. coli*-Klons, der eine Cellulase mit der Bezeichnung BCE 103 bilden konnte. Die Nukleotidsequenz des für die Cellulase kodierenden Gens wurde analysiert. Von der Cellulase BCE 103 wurde die N-terminale Aminosäuresequenz mit Standardverfahren bestimmt, um Peptide zu gewinnen und zu sequenzieren [Finlay & Geisow (Herausg.), Protein Sequencing – a practical approach, 1989, IRL Press]. Die Aminosäuresequenz der Cellulase wurde aus der Nukleotidsequenz hergeleitet, wobei die N-terminale Aminosäuresequenz als Anfangspunkt des reifen Proteins verwendet wurde.

[0066] Die Nukleotidsequenz für BCE 103 ist in SEQ ID Nr. 1 und die Aminosäuresequenz in SEQ ID Nr. 2 dargestellt.

- Reinigung der Cellulase

[0067] Die Zellen wurden nach der Fermentation durch Zentrifugieren (8000 U/min) von der Kulturflüssigkeit getrennt. Die Cellulase im Überstand wurde mit Ammoniumsulfat (65% Sättigung) ausgefällt. Der Niederschlag wurde in 25 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7) + 5 mM EDTA gelöst, bis eine Leitfähigkeit von 7 mS/cm erreicht war. Diese Lösung wurde in eine Anionenaustauschsäule Q-Sepharose FF (Durchmesser 5 cm, Länge 10 cm) gegeben; danach wurde die Säule mit 25 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7) + 5 mM EDTA bis zu einer Absorption von 0,2 AU gewaschen. Ein Gradient von 0 bis 0,5 M NaCl in 25 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7) wurde 80 Minuten in die Säule gegeben, und danach 10 Minuten ein Gradient von 0,5 bis 1 M NaCl. Je nachdem, welche Cellulase in die Säule gegeben wurde, fand die Elution im ersten oder zweiten Gradienten statt. Nach der Elution wurde die Säule mit 1 M NaOH gereinigt (Aufwärtsstrom) und wieder mit 25 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7) + 5 mM EDTA äquilibriert. Je nach Elution hatte die gewonnene Cellulase eine Reinheit bis ungefähr 80%.

- Charakterisierung

CMCase-Test

[0068] Tests der Cellulaseaktivität wurden mit modifizierten Verfahren des PAHBAH-Verfahrens (Lever M. Anal. Biochem., 1972, 47, S. 273-279; und Lever M. Anal. Biochem., 1977, 81, S. 21-27) durchgeführt.

Methode:

[0069] Eine Teströhre wird mit 250 µl 2,5% CMC in 50 mM Glycinpuffer (pH-Wert 9) (CMC-low viscosity, bei Sigma bezogen) und 250 µl aliquoter Cellulase gefüllt, die im geeigneten Puffer verdünnt ist. Die Teströhre wird 30 Minuten bei 40°C in einem Wasserbad inkubiert; anschließend werden 1,5 ml einer täglich frisch hergestellten PAHBAH-Lösung (1 % PAHBAH in 100 ml 0,5 M NaOH mit 100 µl Bismutlösung, die 48,5 g Bismutnitrat, 28,2 g Kaliumnatriumtartrat und 12,0 g NaOH in 100 ml enthält) zugegeben. Das Gemisch wird 10 Minuten bei 70°C erhitzt und danach 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die Absorption wird bei 410 nm gemessen. Zur Vermeidung von Hintergrundabsorption bei den Enzymproben wird ein Kontrollversuch wie folgt durchgeführt: eine Röhre

mit Substrat wird unter denselben Bedingungen wie die Teströhre inkubiert. Nach der Inkubation werden 1,5 ml PAHBAH und das Enzympräparat zugesetzt (in dieser Reihenfolge). Eine Einheit (U) ist als die Enzymmenge definiert, die 1 µmol Glucose aus dem CMC-Äquivalent bildet, das als reduzierende Zucker pro Minute pro Gramm Produkt bestimmt ist.

[0070] Der zur Bestimmung der Profile von pH-Wert und Temperatur verwendete Puffer ist ein Phosphat-Citrat-System. Die Profile von pH-Wert und Temperatur wurden mit einer festgelegten Enzymkonzentration bestimmt, die in den linearen Bereich des bei einem pH-Wert von 7 und 40°C gemessenen Dosis-Wirkungs-Profiles passt. Diese Enzymkonzentration diente zum Messen der Aktivitäten unter allen weiteren festgelegten Bedingungen.

[0071] In [Fig. 1](#) sind die Ergebnisse für die Cellulase BCE 103 dargestellt. Diese Cellulase zeigt gute Aktivitäten bei einem basischen pH-Wert und ist demzufolge für die Anwendung in Waschmitteln mit einem basischen pH-Wert geeignet.

Beispiel 2

[0072] Ähnliche Verfahren, die mit dem alkalophilen Bacillusstamm CBS 669.93 begannen, führten zur Cellulase BCE 113. Die Ergebnisse für diese Cellulase BCE 113 sind in [Fig. 2](#) dargestellt. Diese Cellulase zeigt ebenfalls gute Aktivitäten bei einem basischen pH-Wert und ist daher für die Anwendung in Waschmitteln mit einem basischen pH-Wert geeignet:

Beispiel 3: Messung von Zugfestigkeit und Antipilling

[0073] Gemäß der Beschreibung für die Bewertung von TSL wurden Waschversuche durchgeführt, bei denen ein Farbwashmittel ohne Bleichmittel, Parfüm und Enzyme (105 g Waschmittel pro Waschzyklus, pH-Wert 10,5) als Waschmittelmatrix verwendet wurde; als Waschmaschine diente eine Miele® W 717 und gewaschen wurde bei 40°C, „Normalprogramm“, mit Wasser der Härte 16°dH (deutsche Härte), Wäschemenge 3,5 kg, 25 Waschgänge.

[0074] Versuche mit einer erfindungsgemäßen Mischung (D1) und Vergleichsmischungen (C1 bis C3) wurden parallel in identischen Maschinen durchgeführt:

- C1: Waschmittelmatrix ohne Cellulase
- C2: Waschmittelmatrix + 0,288 mg Endoglucanase V von Humicola insolens
- C3: Waschmittelmatrix + Cellulasegemisch von Humicola insolens (erhältlich Celluzyme® 0.7T-Körnchen)
- D1: Waschmittelmatrix + 0,288 mg Cellulase BCE 103
- D2: Waschmittelmatrix + 0,288 mg Cellulase BCE 113

Tabelle 1: Ergebnisse der TSL-Messungen [%]

Mischung	TSL
C1	0
C2	100
C3	38
D1	12

[0075] Bei Einsatz von Waschmaschinen des Typs Miele® W 914 ergaben sich unter sonst identischen Bedingungen folgende Resultate:

Tabelle 2: Ergebnisse der TSL-Messungen [%]

Mischung	TSL
C1	0
C2	100
D2	0,6

Beispiel 4: Messung von Antipilling und Berechnung des Verhältnisses zwischen TSL und AP

[0076] Die Bewertung von Antipilling-Eigenschaften erfolgte mit ansteigenden Cellulasekonzentrationen, um die Wirkung quantitativ besser evaluieren zu können. Ein Farbwäschmittel (5 g/l, 10 Waschzyklen bei 40°C) mit Zusatz von Cellulase gemäß den Angaben in Tabelle 3 wurde bei einem Faserknötchen aufweisenden Baumwollpullover-Material (25 mal bei 60°C mit einem Waschmittel ohne Cellulase gewaschen) verwendet. Die Bewertung des Pilling wurde mit dem vorher beschriebenen optischen Messsystem durchgeführt; dem Faserknötchen aufweisenden Material wurde ein Pilling-Grad von 0% zugewiesen.

Tabelle 3: Ergebnisse der AP-Messungen [%]

Enzymkonzentration	Pilling-Grad		AP [%] von BCE 103
	EG V	BCE 103	
25 µg/ml	-12,8%	-8,4%	65%
37,5 µg/ml	-16,0%	-9,6%	59%
50 µg/ml	-22,8%	-15,6%	68%

[0077] Für die Cellulase BC 103 errechnet sich ein AP-Mittelwert von 64%. Die Cellulase BCE 113 zeigte unter denselben Bedingungen einen AP-Mittelwert von 100%.

[0078] Verwendet man die TSL-Werte der Tabellen 1 und 2, sind die Verhältnisse zwischen TSL und AP bei den verschiedenen Cellulasen wie in der folgenden Tabelle 4:

Tabelle 4: Verhältnis zwischen TSL und AP

Enzym	Verhältnis
EG V	1
BCE 103	~0,2
BCE 113	~0,02

Beispiel 5: Weitere Testverfahren

- Antiredepositionstest

[0079] 20 ml 0,5% pigmentierter Schmutz [täglich frisch hergestellt; besteht aus 86% Kaolin, 8% Ruß (Flammruß 101, bezogen bei Degussa AG), 4% Eisenoxidschwarz und 2% Eisenoxidgelb (von Henkel Genthin GmbH)] in einem Waschmittel (Persil Color® ohne Enzyme, 5 g/l, pH-Wert 8,5) wurden unter Rühren (90 U/min) mit weißem Baumwollstoff (vorgewaschen, 5 cm Durchmesser, bezogen bei Windelbleiche, Krefeld) inkubiert. Die Cellulase wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mU/ml zugegeben. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 40°C und 90 U/min inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Inkubation ohne den Zusatz von Zellulase durchgeführt. Nach der Inkubation wurde der Stoff gründlich mit laufendem kalten Wasser gespült. Nach dem

Trocknen wurde die Weiße des Stoffs durch Remission (4 Messungen pro Stoff) mit einem Micro-Colour-Dr. Lange®-Kolorimeter gemessen. Der Kontrollwert wurde vom Probenwert subtrahiert. Die Ergebnisse, die als Delta-Rem ausgedrückt werden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

- Faserschadentest

[0080] Ein Stück Baumwollwatte (100% Baumwolle, Warenhandels GmbH, Buchholz, Marke Olivia, Vertrieb: Aldi) wurde in 40 ml Waschflüssigkeit (Persil Color® ohne Enzym, 5 g/l, pH-Wert 8,5) inkubiert; nach Zusatz von Cellulase bei einer Endkonzentration von 1 mU/ml in einem verschlossenen Kolben wurde 20 Stunden bei 40°C unter Rühren (90 U/min) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Faserschaden durch die Messung der Menge reduzierender Zucker in der Lösung überwacht, wobei das in Beispiel 1 beschriebene PAHBAH-Verfahren eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurde die gleiche Inkubation ohne Cellulasezusatz durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

- Adsorptionstest

[0081] Weißer Baumwollstoff (Windelbleiche, Bielefeld), der mit dem deutschen Waschmittel Persil® ohne Enzyme bei 60°C vorgewaschen war, wurde rund auf einen Durchmesser von 9 cm zurechtgeschnitten (ca. 0,920 Gramm). Ein Baumwoll-Stoffmuster wurde in 50 ml 50 mM Glycin-NaON-Puffer (pH-Wert 9) einschließlich 0,1% SDS und 1 ml Cellulaseprobe (600 mU/ml) 60 Minuten bei 30°C inkubiert. 2-ml-Proben wurden bei T = 0 und T = 60 Minuten entnommen, direkt mit 50 mM MES-Puffer (pH-Wert 6,5) verdünnt (1:2) und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Inkubation ohne Zusatz eines Baumwolltextils durchgeführt. Die Messung der Aktivität wurde mit einem in Beispiel 3 beschriebenen PAHBAH-Verfahren bestimmt, allerdings bei einem pH-Wert von 6,5 und in 50 mM MES-Puffer. Die Adsorption wurde als relative Adsorption ausgedrückt, wobei die am Anfang des Versuchs wirkende Aktivität als 100% mit T = 0 festgelegt wurde: 100% Aktivitätswert minus verbleibende Aktivität (%) = Adsorption (%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Ergebnisse von Antiredepositionstest, Faserschadentest und Adsorptionstest

Enzym	Antiredeposition [Delta-Rem]	Faserschaden [mU]	Adsorption [%]
BCE 103	5,0	0,025	7
KAC® a)	7,5	0,006	0
EG V	1,2	0,155	36

a) Cellulase von Kao Corporation

[0082] Die Cellulase BCE 113 zeigte in diesen Tests eine Leistung, die mindestens so gut wie die der Cellulase BCE 103 war.

- Weichmachtest

[0083] Die Weichheit von Stoffen, die wie in Beispiel 3, aber nach 15 Waschzyklen behandelt wurden, wurde durch eine Expertenkommission (5 Personen) benotet, die Einstufungen zwischen 0 (Stoff 25 mal mit einem Waschmittel ohne Cellulase gewaschen) und 6 (noch nie gewaschener Stoff) durch Anfühlen der Stoffe vergab. Bei den Waschgängen wurden Mischungen verwendet, die in Beispiel 2 definiert sind. Die Durchschnittsnoten sind in Tabelle 6 dargestellt. Man sieht, dass die erfindungsgemäßen Mischungen die beste Leistung zeigten.

Tabelle 6: Ergebnisse des Weichmachtests

Mischung	Note
C1	0
C2	2,1
C3	1,5
D1	2,3
D2	2,2

Figurenlegende

[0084] [Fig. 1](#) zeigt die relativen Aktivitäten der Cellulase BCE 103. In Beispiel 1 wird diese Figur als Profil von pH-Wert und Temperatur bezeichnet. Alle Aktivitäten bei 40 und 60°C beziehen sich auf die höchste Aktivität, die auf 100% festgesetzt ist.

[0085] [Fig. 2](#) zeigt die relativen Aktivitäten der Cellulase BCE 113.

[0086] [Fig. 3](#) zeigt die DNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) und die hergeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 2) der von CBS 670.93 abgeleiteten 50-kD-Cellulase, wobei die Leaderpeptidsequenz schattiert dargestellt ist, die bei Sekretion abgespalten wird, um das reife Enzym zu erhalten.

[0087] [Fig. 4](#) zeigt die DNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 3) und die hergeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 4) der von CBS 669.93 abgeleiteten 63-kD-Cellulase, wobei die Leaderpeptidsequenz unterstrichen dargestellt ist, die bei Sekretion abgespalten wird, um das reife Enzym zu erhalten.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien

<120> Waschmittel, die Cellulasen enthalten

<130> H 1920-I EP

<140>

<141>

<150> EP95201115.3

<151> 1995-04-28

<150> US614115

<151> 1996-03-12

<150> PCT/EP96/01755

<151> 1996-04-26

<150> EP96914993.9

<151> 1996-04-26

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1404

<212> DNA

<213> Bacillus sp. CBS 670.93

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1404)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(78)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (79)..(1404)

<400> 1

atg	aaa	aag	ata	act	act	att	ttt	gcc	gta	ttg	ctc	atg	aca	ttg	gcg	48
Met	Lys	Lys	Ile	Thr	Thr	Ile	Phe	Ala	Val	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Ala	
-25														-15		

ttg	tcc	agt	ata	gga	aac	acg	aca	gct	gat	gat	tat	tca	gtt	gta	96	
Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	
-10														5		

gag	gaa	cat	ggg	caa	cta	agt	att	agt	aac	ggt	gaa	tta	gtc	aat	gaa	144
Glu	Glu	His	Gly	Gln	Leu	Ser	Ile	Ser	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Asn	Glu	
10														20		

cga	ggc	gaa	caa	gtt	cag	tta	aaa	ggg	atg	agt	tcc	cat	ggt	ttg	caa	192
Arg	Gly	Glu	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gly	Met	Ser	Ser	His	Gly	Leu	Gln	

25

30

35

tgg tac ggt oaa ttt gta aac tat gaa agc atg aaa tgg cta aga gat 240
Trp Tyr Gly Gln Phe Val Asn Tyr Glu Ser Met Lys Trp Leu Arg Asp
40 45 50

gat tgg gga ata act gta ttc cga gca gca atg tat acc tct tca gga 288
Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala Met Tyr Thr Ser Ser Gly
55 60 65 70

gga tat att gac gat oca tca gta aag gaa aaa gta aaa gag act gtt 336
Gly Tyr Ile Asp Asp Pro Ser Val Lys Glu Lys Val Lys Glu Thr Val
75 80 85

gag gct gcg ata gac ctt ggc ata tat gtg atc att gat tgg cat atc 384
Glu Ala Ala Ile Asp Leu Gly Ile Tyr Val Ile Asp Trp His Ile
90 95 100

ctt tca gac aat gac ccg aat ata tat aaa gaa gaa gcg aag gat ttc 432
Leu Ser Asp Asn Asp Pro Asn Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Phe
105 110 115

ttt gat gaa atg tca gag ttg tat gga gac tat ccg aat gtg ata tac 480
Phe Asp Glu Met Ser Glu Leu Tyr Gly Asp Tyr Pro Asn Val Ile Tyr
120 125 130

gaa att gca aat gaa ccg aat ggt agt gat gtt acg tgg gac aat caa 528
Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly Ser Asp Val Thr Trp Asp Asn Gln
135 140 145 150

ata aaa ccg tat gca gaa gaa gtg att ccg gtt att cgt gac aat gac 576
Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Pro Val Ile Arg Asp Asn Asp
155 160 165

cct aat aac att gtt att gta ggt aca ggt aca tgg agt cag gat gtc 624
Pro Asn Asn Ile Val Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val
170 175 180

cat cat gca gcc gat aat cag ctt gca gat cct aac gtc atg tat gca 672
His His Ala Ala Asp Asn Gln Leu Ala Asp Pro Asn Val Met Tyr Ala
185 190 195

ttt cat ttt tat gca gga aca cat gga caa aat tta cga gac caa gta 720
Phe His Phe Tyr Ala Gly Thr His Gly Gln Asn Leu Arg Asp Gln Val
200 205 210

gat tat gca tta gat caa gga gca gcg ata ttt gtt agt gaa tgg ggg 768
Asp Tyr Ala Leu Asp Gln Gly Ala Ala Ile Phe Val Ser Glu Trp Gly
215 220 225 230

aca agt gca gct aca ggt gat ggt ggt gtg ttt tta gat gaa gca caa 816
Thr Ser Ala Ala Thr Gly Asp Gly Gly Val Phe Leu Asp Glu Ala Gln
235 240 245

gtg tgg att gac ttt atg gat gaa aga aat tta agc tgg gcc aac tgg 864
Val Trp Ile Asp Phe Met Asp Glu Arg Asn Leu Ser Trp Ala Asn Trp
250 255 260

tct cta acg cat aag gat gag tca tct gca gcg tta atg cca ggt gca 912

Ser Leu Thr His Lys Asp Glu Ser Ser Ala Ala Leu Met Pro Gly Ala			
265	270	275	
aat cca act ggt ggt tgg aca gag gct gaa cta tct cca tct ggt aca			960
Asn Pro Thr Gly Gly Trp Thr Glu Ala Glu Leu Ser Pro Ser Gly Thr			
280	285	290	
ttt gtg agg gaa aaa ata aga gaa tca gca tct att ccg cca agc gat			1008
Phe Val Arg Glu Lys Ile Arg Glu Ser Ala Ser Ile Pro Pro Ser Asp			
295	300	305	310
cca aca ccg cca tct gat cca gga gaa ccg gat cca gga gaa ccg gat			1056
Pro Thr Pro Pro Ser Asp Pro Gly Glu Pro Asp Pro Gly Glu Pro Asp			
315	320	325	
cca acg ccc cca agt gat cca gga gaa tat cca gca tgg gat tca aat			1104
Pro Thr Pro Pro Ser Asp Pro Gly Glu Tyr Pro Ala Trp Asp Ser Asn			
330	335	340	
caa att tac aca aat gaa att gtg tat cat aac ggt cag tta tgg caa			1152
Gln Ile Tyr Thr Asn Glu Ile Val Tyr His Asn Gly Gln Leu Trp Gln			
345	350	355	
gcg aza tgg tgg aca caa aat caa gag cca ggt gac cca tac ggt ccg			1200
Ala Lys Trp Trp Thr Gln Asn Gln Glu Pro Gly Asp Pro Tyr Gly Pro			
360	365	370	
tgg gaa cca ctc aaa tct gac cca gat tca gga gaa ccg gat cca acg			1248
Trp Glu Pro Leu Lys Ser Asp Pro Asp Ser Gly Glu Pro Asp Pro Thr			
375	380	385	390
ccc cca agt gat cca gga gag tat cca gca tgg gat tca aat caa att			1296
Pro Pro Ser Asp Pro Gly Glu Tyr Pro Ala Trp Asp Ser Asn Gln Ile			
395	400	405	
tac aca aat gaa att gtg tac cat aac ggc cag cta tgg caa gca aza			1344
Tyr Thr Asn Glu Ile Val Tyr His Asn Gly Gln Leu Trp Gln Ala Lys			
410	415	420	
tgg tgg aca caa aat caa gag cca ggt gac cca tat ggt ccg tgg gaa			1392
Trp Trp Thr Gln Asn Gln Glu Pro Gly Asp Pro Tyr Gly Pro Trp Glu			
425	430	435	
cca ctc aat taa			1404
Pro Leu Asn			
440			
<210> 2			
<211> 467			
<212> PRT			
<213> Bacillus sp. CBS 670.93			
<400> 2			
Met Lys Lys Ile Thr Thr Ile Phe Ala Val Leu Leu Met Thr Leu Ala			
1 5 10 15			
Leu Phe Ser Ile Gly Asn Thr Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Ser Val Val			
20 25 30			
Glu Glu His Gly Gln Leu Ser Ile Ser Asn Gly Glu Leu Val Asn Glu			

35	40	45
Arg Gly Glu Gin Val Gln Leu Lys	Gly Met Ser Ser His	Gly Leu Gln
50	55	60
Trp Tyr Gly Gln Phe Val Asn Tyr	Glu Ser Met Lys Trp	Leu Arg Asp
65	70	75
Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg	Ala Ala Met Tyr	Thr Ser Ser Gly
85	90	95
Gly Tyr Ile Asp Asp Pro Ser Val	Lys Glu Lys Val	Glu Thr Val
100	105	110
Glu Ala Ala Ile Asp Leu Gly	Ile Tyr Val Ile Ile	Asp Trp His Ile
115	120	125
Leu Ser Asp Asn Asp Pro Asn Ile	Tyr Lys Glu Glu Ala	Lys Asp Phe
130	135	140
Phe Asp Glu Met Ser Glu Leu Tyr	Gly Asp Tyr Pro Asn Val Ile	Tyr
145	150	155
Glu Ile Ala Asn Glu Pro Asn Gly	Ser Asp Val Thr Trp	Asp Asn Gln
165	170	175
Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val	Ile Pro Val Ile Arg	Asp Asn Asp
180	185	190
Pro Asn Asn Ile Val Ile Val	Gly Thr Gly Thr Trp	Ser Gln Asp Val
195	200	205
His His Ala Ala Asp Asn Gln	Leu Ala Asp Pro Asn Val	Met Tyr Ala
210	215	220
Phe His Phe Tyr Ala Gly Thr	Mis Gly Gln Asn Leu	Arg Asp Gln Val
225	230	235
Asp Tyr Ala Leu Asp Gln Gly	Ala Ala Ile Phe	Val Ser Glu Trp Gly
245	250	255
Thr Ser Ala Ala Thr Gly Asp	Gly Gly Val Phe	Leu Asp Glu Ala Gln
260	265	270
Val Trp Ile Asp Phe Met Asp	Glu Arg Asn Leu Ser	Trp Ala Asn Trp
275	280	285
Ser Leu Thr His Lys Asp	Glu Ser Ser Ala Ala	Leu Met Pro Gly Ala
290	295	300
Asn Pro Thr Gly Gly Trp	Thr Glu Ala Glu Leu Ser	Pro Ser Gly Thr
305	310	315
Phe Val Arg Glu Lys Ile Arg	Glu Ser Ala Ser Ile	Pro Pro Ser Asp
325	330	335
Pro Thr Pro Pro Ser Asp	Pro Gly Glu Pro Asp	Pro Gly Glu Pro Asp
340	345	350
Pro Thr Pro Pro Ser Asp	Pro Gly Glu Tyr	Pro Ala Trp Asp Ser Asn
355	360	365
Gln Ile Tyr Thr Asn Glu	Ile Val Tyr His Asn	Gly Gln Leu Trp Gln
370	375	380
Ala Lys Trp Trp Thr Gln Asn	Gln Glu Pro Gly	Asp Pro Tyr Gly Pro
385	390	395
Trp Glu Pro Leu Lys Ser Asp	Pro Asp Ser Gly	Glu Pro Asp Pro Thr
405	410	415
Pro Pro Ser Asp Pro Gly	Glu Tyr Pro Ala	Trp Asp Ser Asn Gln Ile
420	425	430
Tyr Thr Asn Glu Ile Val	Tyr His Asn	Gly Gln Leu Trp Gln Ala Lys
435	440	445
Trp Trp Thr Gln Asn Gln	Glu Pro Gly	Asp Pro Tyr Gly Pro Trp Glu
450	455	460
Pro Leu Asn		
465		

<211> 1725
<212> DNA
<213> *Bacillus* sp. CBS 669.93

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1725)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(78)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..(1725)

<400> 3				48
atg aag tgg atg aaa tcc atg gta tgg ttg gcc gtt gtt ttg gtc gtt				
Met Lys Trp Met Lys Ser Met Val Trp Leu Ala Val Val Leu Val Val				
-25	-20	-15		
tcg ttc gta gct cct gcc gtt agt tca gct aat gag gat gta aaa act				96
Ser Phe Val Ala Pro Ala Val Ser Ser Ala Asn Glu Asp Val Lys Thr				
-10	-5	-1	1	5
ctc gat att cag tcc tat gta aga gac atg cag	ccg ggt tgg aat ctt			144
Leu Asp Ile Gln Ser Tyr Val Arg Asp Met Gln	Pro Gly Trp Asn Leu			
10	15	20		
ggg aat acg ttt gat gcc gtc gga caa gat gaa	aca gca tgg gga aat			192
Gly Asn Thr Phe Asp Ala Val Gly Gln Asp Glu	Thr Ala Trp Gly Asn			
25	30	35		
cca cgt gtg aca cga gaa tta att gaa cgg att	gct gat gaa ggg tat			240
Pro Arg Val Thr Arg Glu Leu Ile Glu Arg Ile	Ala Asp Glu Gly Tyr			
40	45	50		
aaa agc att cgg att cog gtg acg tgg gaa aat	cgt atc gga ggg gca			288
Lys Ser Ile Arg Ile Pro Val Thr Trp Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ala				
55	60	65	70	
cct gat tat cct att gat ccc cag ttt tta aat cga gtg gac gaa gtt				336
Pro Asp Tyr Pro Ile Asp Pro Gln Phe Leu Asn Arg Val Asp Glu Val				
75	80	85		
gtt caa tgg gcg ctg gaa gat ttg tat gtc atg att aat tta cac				384
Val Gln Trp Ala Leu Glu Glu Asp Leu Tyr Val Met Ile Asn Leu His				
90	95	100		
cat gat tca tgg tta tgg att tat gaa atg gag cac aac tac aac ggt				432
His Asp Ser Trp Leu Trp Ile Tyr Glu Met Glu His Asn Tyr Asn Gly				
105	110	115		
gtg atg gcc aag tat cgc tcg ctc tgg gag caa cta tcg aac cac ttc				480
Val Met Ala Lys Tyr Arg Ser Leu Trp Glu Gln Leu Ser Asn His Phe				
120	125	130		
aaa gac tat cca aca aag ctt atg ttt gaa agt gtc aat gag cca aag				528
Lys Asp Tyr Pro Thr Lys Leu Met Phe Glu Ser Val Asn Glu Pro Lys				

DE 696 36 606 T2 2007.08.09

135	140	145	150	
ttt agt caa aac tgg ggt gag atc cgt gag aat cac cat gcg tta cta Phe Ser Gln Asn Trp Gly Glu Ile Arg Glu Asn His His Ala Leu Leu 155		160	165	576
gac gac tta aac aca gtg ttt ttc gag att gtg aga cag tct ggt ggc Asp Asp Leu Asn Thr Val Phe Phe Glu Ile Val Arg Gln Ser Gly Gly 170		175	180	624
caa aat gat atc cgg ccg tta gtg tta ccg act atg gaa aca gcc aca Gln Asn Asp Ile Arg Pro Leu Val Leu Pro Thr Met Glu Thr Ala Thr 185		190	195	672
tca caa ccg ttg ttg aac aac ctt tat caa aca att gac aaa ttg gat Ser Gln Pro Leu Leu Asn Asn Leu Tyr Gln Thr Ile Asp Lys Leu Asp 200		205	210	720
gat ccg aat cta att gcg aca gta cac tat tac ggg ttt tgg cct ttt Asp Pro Asn Leu Ile Ala Thr Val His Tyr Tyr Gly Phe Trp Pro Phe 215		220	225	768
agc gtg aat atc gcc ggc tac act cgc ttt gaa gag gat tcg aaa ccg Ser Val Asn Ile Ala Gly Tyr Thr Arg Phe Glu Glu Asp Ser Lys Arg 235		240	245	816
gag atc atc gaa acg ttt gat cga gta cac cat aca ttt gtt gca aga Glu Ile Ile Glu Thr Phe Asp Arg Val His His Thr Phe Val Ala Arg 250		255	260	864
ggg att cca gtc gtt tta ggt gag ttc ggc ttg ctt gga ttt gat aaa Gly Ile Pro Val Val Gly Glu Phe Gly Leu Leu Gly Phe Asp Lys 265		270	275	912
cat act gga gtg att caa caa ggt gaa aag cta aaa ttc ttt gag tat His Thr Gly Val Ile Gln Gln Gly Glu Lys Leu Lys Phe Phe Glu Tyr 280		285	290	960
ctc atc cat cat ttg aac gag cgg gat att act cat atg ctt tgg gat Leu Ile His His Leu Asn Glu Arg Asp Ile Thr His Met Leu Trp Asp 295		300	305	1008
aat ggg cag cat ttc aat cgt cat acg tac gaa tgg tat gac gag gaa Asn Gly Gln His Phe Asn Arg His Thr Tyr Glu Trp Tyr Asp Glu Glu 315		320	325	1056
ttg ttt gac atg ttg cgg gca agc tgg gga gga aga tca tcc gtt gca Leu Phe Asp Met Leu Arg Ala Ser Trp Gly Gly Arg Ser Ser Val Ala 330		335	340	1104
gag tcg aac ttt atc tat tta aaa cag gga gac cga atc gca gat gca Glu Ser Asn Phe Ile Tyr Leu Lys Gln Gly Asp Arg Ile Ala Asp Ala 345		350	355	1152
aca gtt aca tta caa ttg cac gga aat gaa tta aca ggg ctt cag gcg Thr Val Thr Leu Gln Leu His Gly Asn Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ala 360		365	370	1200
aat gga cae cga cta acg ccg ggg cag gac tat gag tta aat gga gaa				1248

DE 696 36 606 T2 2007.08.09

Asn Gly Gln Arg Leu Thr Pro Gly Gln Asp Tyr Glu Leu Asn Gly Glu				
375	380	385	390	
aga ctt aca gtc aag gcc cat gtc cta tcg gca atc gca ggt tca ggt				1296
Arg Leu Thr Val Lys Ala His Val Leu Ser Ala Ile Ala Gly Ser Gly				
395		400		405
acg tta ggt acg aat gga atg gta acg gct gag ttt aat cgt ggg gca				1344
Thr Leu Gly Thr Asn Gly Met Val Thr Ala Glu Phe Asn Arg Gly Ala				
410		415		420
gat tgg cat ttt cgg gtc aat acg tat cgt acg cct gta ttg caa agc				1392
Asp Trp His Phe Arg Val Asn Thr Tyr Arg Thr Pro Val Leu Gln Ser				
425		430		435
acg caa ggt cac gtc aac ttc agc att cct gct tcc ttt aat ggg				1440
Thr Gln Gly His Val Ser Asn Phe Ser Ile Pro Ala Ser Phe Asn Gly				
440		445		450
aat agc tta gca aca atg gag gct gtc tat gtc gat ggc gga aat gct				1488
Asn Ser Leu Ala Thr Met Glu Ala Val Tyr Val Asp Gly Gly Asn Ala				
455		460		465
475		480		485
gag gtg cgg gat ggt gaa gtt cgg tta acc ttc cat ttt tgg agt ggt				1536
Gly Pro Gln Asp Trp Thr Ser Phe Lys Glu Phe Gly Tyr Ala Phe Ser				
490		495		500
gag gtg cgg gat ggt gaa gtt cgg tta acc ttc cat ttt tgg agt ggt				1584
Glu Val Arg Asp Gly Glu Val Arg Leu Thr Phe His Phe Trp Ser Gly				
505		510		515
gaa ata gtc aac tat acg att att aaa aac ggg aac cag gtc act ggg				1632
Glu Ile Val Asn Tyr Thr Ile Ile Lys Asn Gly Asn Gln Val Thr Gly				
520		525		530
ata gca gct cag aca acc aat tca aaa aac aaa aat aaa aaa tga				1680
Ile Ala Ala Gln Thr Thr Asn Ser Lys Asn Lys Asn Lys Lys				
535		540		545
<210> 4				
<211> 574				
<212> PRT				
<213> Bacillus sp. CBS 669.93				
<400> 4				
Met Lys Trp Met Lys Ser Met Val Trp Leu Ala Val Val Leu Val Val				
i	5	10	15	
Ser Phe Val Ala Pro Ala Val Ser Ser Ala Asn Glu Asp Val Lys Thr				
20	25	30		
Leu Asp Ile Gln Ser Tyr Val Arg Asp Met Gln Pro Gly Trp Asn Leu				
35	40	45		
Gly Asn Thr Phe Asp Ala Val Gly Gln Asp Glu Thr Ala Trp Gly Asn				
50	55	60		
Pro Arg Val Thr Arg Glu Ile Glu Arg Ile Ala Asp Glu Gly Tyr				

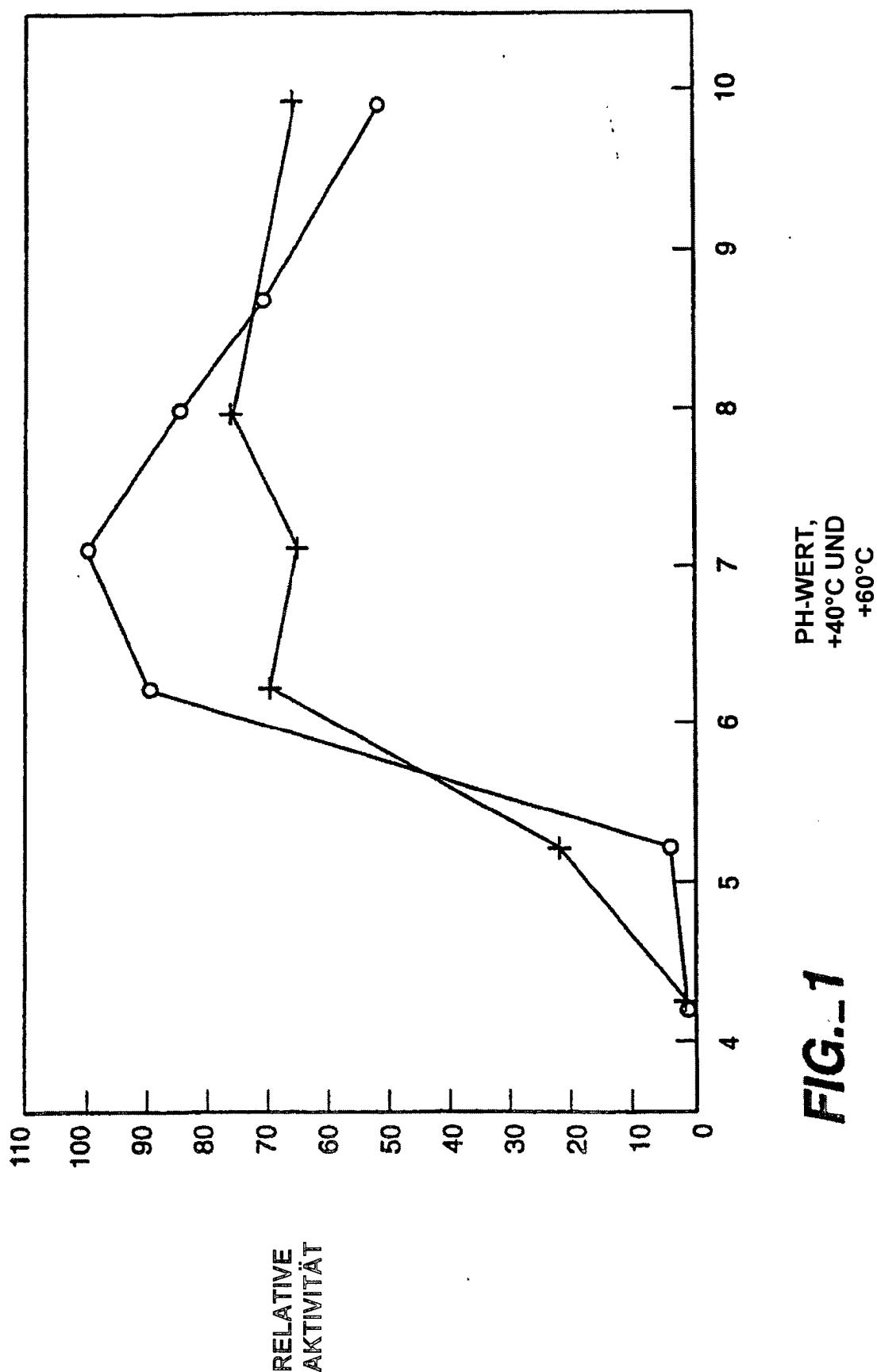
65	70	75	80
Lys Ser Ile Arg Ile Pro Val Thr Trp Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ala			
85	90	95	
Pro Asp Tyr Pro Ile Asp Pro Gln Phe Leu Asn Arg Val Asp Glu Val			
100	105	110	
Val Gln Trp Ala Leu Glu Glu Asp Leu Tyr Val Met Ile Asn Leu His			
115	120	125	
His Asp Ser Trp Leu Trp Ile Tyr Glu Met Glu His Asn Tyr Asn Gly			
130	135	140	
Val Met Ala Lys Tyr Arg Ser Leu Trp Glu Gln Leu Ser Asn His Phe			
145	150	155	160
Lys Asp Tyr Pro Thr Lys Leu Met Phe Glu Ser Val Asn Glu Pro Lys			
165	170	175	
Phe Ser Gln Asn Trp Gly Glu Ile Arg Glu Asn His His Ala Leu Leu			
180	185	190	
Asp Asp Leu Asn Thr Val Phe Phe Glu Ile Val Arg Gln Ser Gly Gly			
195	200	205	
Gln Asn Asp Ile Arg Pro Leu Val Leu Pro Thr Met Glu Thr Ala Thr			
210	215	220	
Ser Gln Pro Leu Leu Asn Leu Tyr Gln Thr Ile Asp Lys Leu Asp			
225	230	235	240
Asp Pro Asn Leu Ile Ala Thr Val His Tyr Tyr Gly Phe Trp Pro Phe			
245	250	255	
Ser Val Asn Ile Ala Gly Tyr Thr Arg Phe Glu Glu Asp Ser Lys Arg			
260	265	270	
Glu Ile Ile Glu Thr Phe Asp Arg Val His His Thr Phe Val Ala Arg			
275	280	285	
Gly Ile Pro Val Val Leu Gly Glu Phe Gly Leu Leu Gly Phe Asp Lys			
290	295	300	
His Thr Gly Val Ile Gln Gln Gly Glu Lys Leu Lys Phe Phe Glu Tyr			
305	310	315	320
Leu Ile His His Leu Asn Glu Arg Asp Ile Thr His Met Leu Trp Asp			
325	330	335	
Asn Gly Gln His Phe Asn Arg His Thr Tyr Glu Trp Tyr Asp Glu Glu			
340	345	350	
Leu Phe Asp Met Leu Arg Ala Ser Trp Gly Gly Arg Ser Ser Val Ala			
355	360	365	
Glu Ser Asn Phe Ile Tyr Leu Lys Gln Gly Asp Arg Ile Ala Asp Ala			
370	375	380	
Thr Val Thr Leu Gln Leu His Gly Asn Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ala			
385	390	395	400
Asn Gly Gln Arg Leu Thr Pro Gly Gln Asp Tyr Glu Leu Asn Gly Glu			
405	410	415	
Arg Leu Thr Val Lys Ala His Val Leu Ser Ala Ile Ala Gly Ser Gly			
420	425	430	
Thr Leu Gly Thr Asn Gly Met Val Thr Ala Glu Phe Asn Arg Gly Ala			
435	440	445	
Asp Trp His Phe Arg Val Asn Thr Tyr Arg Thr Pro Val Leu Gln Ser			
450	455	460	
Thr Gln Gly His Val Ser Asn Phe Ser Ile Pro Ala Ser Phe Asn Gly			
465	470	475	480
Asn Ser Leu Ala Thr Met Glu Ala Val Tyr Val Asp Gly Gly Asn Ala			
485	490	495	
Gly Pro Gln Asp Trp Thr Ser Phe Lys Glu Phe Gly Tyr Ala Phe Ser			
500	505	510	
Pro Ser Tyr Asp Thr His Glu Ile Lys Leu Thr Glu Ala Phe Phe Arg			
515	520	525	
Glu Val Arg Asp Gly Glu Val Arg Leu Thr Phe His Phe Trp Ser Gly			
530	535	540	
Glu Ile Val Asn Tyr Thr Ile Ile Lys Asn Gly Asn Gln Val Thr Gly			
545	550	555	560
Ile Ala Ala Gln Thr Thr Asn Ser Lys Asn Lys Asn Lys Lys			
565	570		

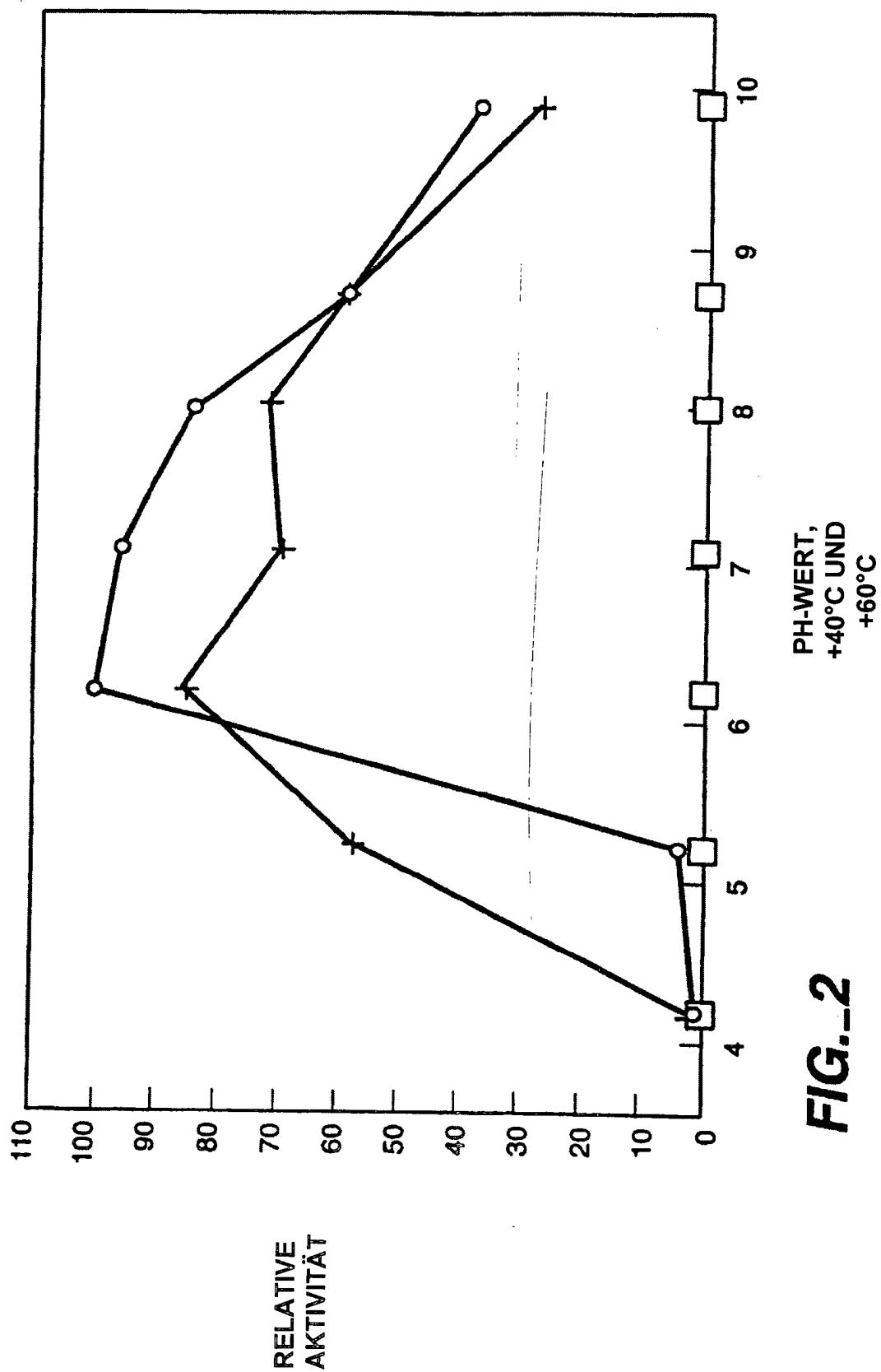
Patentansprüche

1. Verfahren zum Bilden einzelner Cellulasen für Waschmittel-Anwendungen, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - (f) Isolieren von alkalitoleranten, Cellulase bildenden Mikroorganismen, die von Wasser- oder Bodenproben aus einer alkalinen Umgebung erhalten werden können,
 - (g) Reinigen der Cellulasen von diesen Stämmen,
 - (h) Bestimmen des Zugfestigkeitsverlusts (TSL) während des Waschverfahrens,
 - (i) Bestimmen der Antipilling-Eigenschaften (AP) während des Waschverfahrens, und
 - (j) Auswählen der Cellulasen mit einem Verhältnis zwischen dem Zugfestigkeitsverlust (TSL) und den Antipilling-Eigenschaften (AP) von unter 1.
2. Verfahren nach Anspruch 1, beginnend mit einer Wasserprobe aus einer alkalinen Umgebung.
3. Verfahren nach Anspruch 1, beginnend mit einer Bodenprobe aus einer alkalinen Umgebung.
4. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3 mit den Proben, die für Cellulase enthaltende Stämme durch Inkubation in einem Cellulose enthaltenden flüssigen Minimalmedium oder GAM-Medium 1 bis 3 Tage bei 40°C angereichert wurden.
5. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Cellulasen mit einem Verhältnis zwischen dem Zugfestigkeitsverlust (TSL) und den Antipilling-Eigenschaften (AP) von unter 0,8 ausgewählt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Cellulasen mit einem Verhältnis zwischen dem Zugfestigkeitsverlust (TSL) und den Antipilling-Eigenschaften (AP) im Bereich von 0,001 bis 0,5 ausgewählt werden.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





-121 GAAATTCCGTTACATATTTGCAAAAAGAGGGTGGTGGCGCTACATATAACACCTTAAAAG
 -60 TGCAGACTAAAACGATTCGTTCACTATGAAAAGCTAAACCATTACCAAGGAGGAAATT
 1 ATGAAAAAGATAACTACTATTTGCCGTATTGCTCATGACATTGGCCTGTTCACTA
 NetLysLysIleThrThrIlePheAlaValLeuLeuMetThrLeuAlaLeuPheSerIle
 61 GGAAAACACGACAGCGGCTGATGATTATTCACTGAGGAACATGGGCAACTAAGTATT
 GlyAsnThrThrAlaAlaAspAspTyrSerValValGluGluHisGlyGlnLeuSerIle
 121 AGTAACCGGTGAATTAGTCATGAAACGAGGCCAACAGTCAGTTAAAGGGATGAGTTCC
 SerAsnGlyGluLeuValAsnGluArgGlyGluGlnValLeuLysGlyMetSerSer
 181 CATGGTTGCAATGGTACGGTCAATTGTAACATGAAAGCATGAAATGGCTAAGAGAT
 HisGlyLeuGlnTrpTyrGlyGlnPheValAsnTyrGluSerMetLysTrpLeuArgAsp
 241 GATTGGGAATAACTGTATTCCGACCAGCAATGTATACCTCTTCAGGAGGATATATTGAC
 AspTrpGlyIleThrValPheArgAlaAlaMetTyrThrSerSerGlyTyrIleAsp
 301 GATCCATCAGTAAAGGAAAAGTAAAGAGACTGTTGAGGCTGCGATAGACCTGGCATA
 AspProSerValLysGluLysValLysGluThrValGluAlaAlaIleAspLeuGlyIle
 361 TATGTGATCATTGATTGGCATATCCTTCAGACAATGACCCGAATATATATAAGAAGAA
 TyrValIleIleAspTrpHisIleLeuSerAspAsnAspProAsnIleTyrLysGluGlu
 421 GCGAAGGATTCCTTGATGAAATGTCAGAGTTGTATGGAGACTATCCGAATGTGATATAC
 AlaLysAspPhePheAspGluMetSerGluLeuTyrGlyAspTyrProAsnValIleTyr
 481 GAAATTGCAAATGAACCGAATGGTAGTGATGTTACGTGGGACAATCAAATAACCGTAT
 GluIleAlaAsnGluProAsnGlySerAspValThrTrpAspAsnGlnIleLysProTyr
 541 GCAGAAGAAGTATTCCGGTTATTGTCAGACAATGACCCATAAACATTGTTATTGTAGGT
 AlaGluGluValIleProValIleArgAspAsnAspProAsnAsnIleValIleValGly
 601 ACAGGTACATGGAGTCAGGATGTCCATCATGCAGCCGATAATCAGCTTGCAGATCTAAC
 ThrGlyThrTrpSerGlnAspValHisHisAlaAlaAspAsnGlnLeuAlaAspProAsn
 661 GTCATGTATGCATTTCATTTCATTGCAAGAACACATGGACAAATTACGAGACCAAGTA
 ValMetTyrAlaPheHisPheTyrAlaGlyThrHisGlyGlnAsnLeuArgAspGlnVal
 721 GATTATGCATTAGATCAAGGAGCAGCGATATTGTTAGTGAATGGGGGACAAGTGCAGCT
 AspTyrAlaLeuAspGlnGlyAlaAlaIlePheValSerGluTrpGlyThrSerAlaAla
 781 ACAGGGTGTGGTGTGTTAGATGAAAGCACAAGTGTGGATTGACTTTATGGATGAA
 ThrGlyAspGlyGlyValPheLeuAspGluAlaGlnValTrpIleAspPheMetAspGlu
 841 AGAAAATTAAAGCTGGGCCACTGGCTCTAACGCATAAGGATGAGTCATCTGCAGCGTTA
 ArgAsnLeuSerTrpAlaAsnTrpSerLeuThrHisLysAspGluSerSerAlaAlaLeu
 901 ATGCCAGGTGCAAATCCAACCTGGTGGTGGACAGAGGGCTGAACTATCTCCATCTGGTACA
 MetProGlyAlaAsnProThrGlyGlyTrpThrGluAlaGluLeuSerProSerGlyThr

FIG._3A

961 TTTGTGAGGGAAAAATAAGAGAACGCATCTATTCCGCCAAGCGATCCAACACCGCCA
 PheValArgGluLysIleArgGluSerAlaSerIleProProSerAspProThrProPro
 1021 TCTGATCCAGGAGAACCGGATCCAGGAGAACCGGATCCAACGCCCAAGTGATCCAGGA
 SerAspProGlyGluProAspProGlyGluProAspProThrProProSerAspProGly
 1081 GAGTATCCAGCATGGGATTCAAATCAAATTACACAAATGAAATTGTGTATCATAACGGT
 GluTyrProAlaTrpAspSerAsnGlnIleTyrThrAsnGluIleValTyrHisAsnGly
 1141 CAGTTATGGCAAGCGAAATGGTGGACACAAAATCAAGAGCCAGGTGACCCATACGGTCCG
 GlnLeuTrpGlnAlaLysTrpTrpThrGlnAsnGlnGluProGlyAspProTyrGlyPro
 1201 TGGGAACCACCTAAATCTGACCCAGATTCAAGGAGAACCGGATCCAACGCCCAAGTGAT
 TrpGluProLeuLysSerAspProAspSerGlyGluProAspProThrProProSerAsp
 1261 CCAGGAGAGTATCCAGCATGGGATTCAAATCAAATTACACAAATGAAATTGTGTACCAT
 ProGlyGluTyrProAlaTrpAspSerAsnGlnIleTyrThrAsnGluIleValTyrHis
 1321 AACGGCCAGCTATGGCAAGCAAAATGGTGGACACAAAATCAAGAGCCAGGTGACCCATAT
 AsnGlyGlnLeuTrpGlnAlaLysTrpTrpThrGlnAsnGlnGluProGlyAspProTyr
 1381 GGTCCGTGGAACCACTCAATTAAACTATATAATTGATAAAAATTACTAATGAGATAGT
 GlyProTrpGluProLeuAsnEnd
 1441 GAGAATCCCAAGAGTCTAAATTGAGATTGGCATTCCTCATTTACAATTAAATTAAATCC
 1501 ATTGAAAATATTAAAAACGAATTTATAATTATCCAAGGTACCATCTTAATTGGCGGTAA
 1561 CTTTTTCTGTCTTATAGCTGCCCATCCCCCGAAAAAGCGGTGCAAAACTGGTGCATT
 1621 TTTCAGCATTATCTTGTAAATATCAAAACATAAGAAAAAGCCTTGAAACATTGATATGAC
 1681 AACGTTCTAAGGCTTTCTGCATTCTTATTCACTGTATGCCAATTACGAGAGTACCA
 1741 CTCAACGATAAGTTGTTCGTTATTCACTGGAAGCTCAGAACGCTCAGGTAAACGAGT
 1801 GAACGTACCTTCAAGCTT

FIG._3B

-630 GAATTCTTGGATCATGATGGAAGGCAGAA
 -600 TCATGAGCATTGCCCTTGCAGCAGATTACGGCTCTGTCGGCGTCACTTGCTTGCAG
 -540 CGGTTCAAGGTTGGTTGCAGGTAAAGCTGCATTAACCTGTTGCTTACTTCTCATTG
 -480 TCGCTGCTGTTGCTTATTCAATTCAAATTGGGTGTATGACTTGTCGCCCTCGGNATCG
 -420 CGGGTATGCCATTATNCTCAAAGAACAGTTATTAAACAGACGCCATGGGTTCCAAGGCA
 -360 AGTACAGTTAAAACGAGAGATTAAAGAGGCCCTCCAAATGAGGGAGTGGTCTTTTTA
 -300 CATTCAAAAAGAGGAAATAGGAGAAATGTAGATCCGACGTAGATAAGTATTAGGTTT
 -240 AAGTGTAAAGTACAGCTAAGAAAGCTGCTTTGCTGATTCTATGAAAAAGTGTGTTAAA
 -180 CATTGGACATGATTTCTGTGAAATAATGATCTATTTCTGTGAAACAATTGTGATAG
 -120 ATTGGGTAGAGTTTGATAATTCTAAATTTCGTTCAAAGGAGGTTGAGGTTCATTTA
 -60 CGATTGGTCAACAGTCATTGTTCCGGTAACTCATTGGAGGTGGTGGAGTCTG
 1 | ATGAAGTGGATGAAATCCATGGTATGGTGGCCGTTGTTGGTCGTTCGTAGCT
 | MetLysTrpMetLysSerMetValTrpLeuAlaValLeuValValSerPheValAla
 61 | CCTGCCGTTAGTCAGCTATGAGGATGAAAAACTCTCGATATTCAGTCCTATGTAAGA
 | ProAlaValSerSerAlaAsnGluAspValLysThrLeuAspIleGlnSerTyrValArg
 121 GACATGCAGCCGGGTTGGAATCTTGGAAATACGTTGATGCCGTCGGACAAGATGAAACA
 AspMetGlnProGlyTrpAsnLeuGlyAsnThrPheAspAlaValGlyGlnAspGluThr
 181 GCATGGGAAATCCACGTGTGACACGAGAATTAAATTGAAACGGATTGCGGATGAAAGGTAT
 AlaTrpGlyAsnProArgValThrArgGluLeuIleGluArgIleAlaAspGluGlyTyr
 241 AAAAGCATTGGATTCCGGTGACGTGGAAAATCGTATCGGAGGGCACCTGATTATCCT
 LysSerIleArgIleProValThrTrpGluAsnArgIleGlyGlyAlaProAspTyrPro
 301 ATTGATCCCCAGTTTAAATCGAGTGGACGAAGTTGTTCAATGGCGCTGGAAGAAGAT
 IleAspProGlnPheLeuAsnArgValAspGluValValGlnTrpAlaLeuGluAsp
 361 TTGTATGTATGATTAATTACACCATGATTGATGGTTATGGATTTATGAAATGGAGCAC
 LeuTyrValMetIleAsnLeuHisHisAspSerTrpLeuTrpIleTyrGluMetGluHis
 421 AACTACAACGGTGTGATGCCAAGTATCGCTCGCTCTGGGAGCAACTATCGAACCACTTC
 AsnTyrAsnGlyValMetAlaLysTyrArgSerLeuTrpGluGlnLeuSerAsnHisPhe
 481 AAAGACTATCCAACAAAGCTATGTTGAAAGTGTCAATGAGCCAAAGTTAGTCAAAAC
 LysAspTyrProThrLysLeuMetPheGluSerValAsnGluProLysPheSerGlnAsn
 541 TGGGGTGAGATCCGTGAGAACATCACCAGCGTTACTAGACGACTTAAACACAGTGT
 TrpGlyGluIleArgGluAsnHisHisAlaLeuLeuAspAspLeuAsnThrValPhePhe
 601 GAGATTGTGAGACAGTCTGGTGGCCAAATGATATCCGGCCGTTAGTGTACCGACTATG
 GluIleValArgGlnSerGlyGlyGlnAsnAspIleArgProLeuValLeuProThrMet
 661 GAAACAGCCACATCACAAACCGTTGCTGAACAACCTTATCAAACAATTGACAAATTGGAT
 GluThrAlaThrSerGlnProLeuLeuAsnAsnLeuTyrGlnThrIleAspLysLeuAsp

FIG._4A

721 GATCCGAATCTAATTGCGACAGTACACTATTACGGGTTTGGCCTTTAGCGTGAATATC
 AspProAsnLeuIleAlaThrValHisTyrTyrGlyPheTrpProPheSerValAsnIle

 781 CCCGGCTACACTCGCTTGAAAGAGGATTGCAAACGGGAGATCATCGAAACGTTGATCGA
 AlaGlyTyrThrArgPheGluGluAspSerLysArgGluIleIleGluThrPheAspArg

 841 GTACACCATACTTGTTGCAAGAGGGATTCCAGTCGTTTAGGTGAGTTGGCTTGCTT
 ValHisHisThrPheValAlaArgGlyIleProValValLeuGlyGluPheGlyLeuLeu

 901 GGATTGATAAACATACTGAGTGATCAACAGGTAAAAAGCTAAAATTCTTGAGTAT
 GlyPheAspLysHisThrGlyValIleGlnGlnGlyGluLysLeuLysPhePheGluTyr

 961 CTCATCCATCATTGAAACAGCGGGATATTACTCATATGCTTGGGATAATGGGCAGCAT
 LeuIleHisHisLeuAsnGluArgAspIleThrHisMetLeuTrpAspAsnGlyGlnHis

 1021 TTCAATCGTCATACTGAAATGGTATGACGAGGAATTGTTGACATGTTGGCAAGC
 PheAsnArgHisThrTyrGluTrpTyrAspGluGluLeuPheAspMetLeuArgAlaSer

 1081 TGGGGAGGAAGATCATCCGTTGCAGAGTCGAACTTATCTATTAAAACAGGGAGACCGA
 TrpGlyGlyArgSerSerValAlaGluSerAsnPheIleTyrLeuLysGlnGlyAspArg

 1141 ATCGCAGATGCAACAGTTACATTACAATTGCACGGAAATGAATTAAACAGGGCTTCAGGCG
 IleAlaAspAlaThrValThrLeuGlnLeuHisGlyAsnGluLeuThrGlyLeuGlnAla

 1201 AATGGACAACGACTAACGCCGGGCAGGACTATGAGTTAATGGAGAAAGACTTACAGTG
 AsnGlyGlnArgLeuThrProGlyGlnAspTyrGluLeuAsnGlyGluArgLeuThrVal

 1261 AAGGCCCATGTCCTATCGGCAATCGCAGGTTTCAGGTACGTTAGGTACCGAATGGAATGGTA
 LysAlaHisValLeuSerAlaIleAlaGlySerGlyThrLeuGlyThrAsnGlyMetVal

 1321 ACGGCTGAGTTAACGTGGGGCAGATTGGCATTTCGGGTGAATACGTATCGTACGCCT
 ThrAlaGluPheAsnArgGlyAlaAspTrpHisPheArgValAsnThrTyrArgThrPro

 1381 GTATTGCAAAGCACGCAAGTCACGTGAGCAACTTCAGCATTCTGCTTCCTTAATGGG
 ValLeuGlnSerThrGlnGlyHisValSerAsnPheSerIleProAlaSerPheAsnGly

 1441 AATAGCTTAGCAACAATGGAGGCTGTCTATGTGGATGGCGAAATGCTGGCCCGCAAGAC
 AsnSerLeuAlaThrMetGluAlaValTyrValAspGlyGlyAsnAlaGlyProGlnAsp

 1501 TGGACCTCTTAAAGGAGTTGGCTATGCCTCTCCTCTTATGATACACATGAGATT
 TrpThrSerPheLysGluPheGlyTyrAlaPheSerProSerTyrAspThrHisGluIle

 1561 AAACTGACCGAGGCCTTTTCGTGAGGTGCGGGATGGTGAAGTTGGTTAACCTTCCAT
 LysLeuThrGluAlaPhePheArgGluValArgAspGlyGluValArgLeuThrPheHis

 1621 TTTTGGAGTGGTGAAATAGTCAACTATCGATTATTAACGGAAACCAGGTGACTGGG
 PheTrpSerGlyGluIleValAsnTyrThrIleIleLysAsnGlyAsnGlnValThrGly

 1681 ATAGCAGCTCAGACAACCAATTCAAAAAACAAAAAATAAAAATGAAATTGAAAGCGCTTT
 IleAlaAlaGlnThrThrAsnSerLysAsnLysAsnLysEnd

 1741 CTATGGTGGTGCCTGAATATCTGAGGTTCTTAGTAGAATCCGATATCGGGTTTTCA

 1801 TACATTATAGGGCGCTTTTATGTTGCGCAGGTTAAATGGTCTTACGTATGGGAACCC

 1861 TACTACTAGATTATTGTGCACTCTTTGAGTACCAATTACCGCCCTATCATATGTAT

FIG._4B

1921 ATGAGTTGAACCATCTAGTAACCTCTTAAAATTGGTAAAGGAAATGTAACGTTGTGAT
2041 AGTAAGGAAATGGTATGATGGAGAGAGACGTGTGATCGAGAAAATGGAGGAACGCAGAATG
2101 AATGAAACGATGCAACGCATCGCGAGAGTCATAGACAATGTGGAACGAGTGGCCGCCGGG
2161 AACGTCAGGAATCGAGCTGAGCCTGTCGCATTATTTGCTAGCGG

FIG._4C