(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 29 719 T2** 2004.07.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 871 712 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 29 719.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK96/00031**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 900 543.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/022366**
(86) PCT-Anmeldetag: **19.01.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.07.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.10.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **27.08.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 9/10**

(30) Unionspriorität:
6195 **19.01.1995** **DK**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(72) Erfinder:
BECH, Lisbeth, 2880 Bagsvaerd, DK; RASMUSSEN, Grethe, 2880 Bagsvaerd, DK; HALKIER, Torben, 2880 Bagsvaerd, DK; OKADA, Mariko, Chiba-shi 261-01, JP; ANDERSEN, Lene Nonboe, 2880 Bagsvaerd, DK; KAUPPINEN, Markus Sakari, 2880 Bagsvaerd, DK; SANDAL, Thomas, 2880 Bagsvaerd, DK

(54) Bezeichnung: **TRANSGLUTAMINASEN AUS OOMYZETEN**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Transglutaminase-Zubereitungen, ableitbar von der Klasse der Oomyceten, eine neue Transglutaminase, abgeleitet von Phytophthora cactorum, CBS 618.94 oder IFO 30474, ein DNA-Konstrukt, das das Transglutaminase-Enzym kodiert, ein Verfahren zur Herstellung der neuen Transglutaminase und der neuen Transglutaminase-Zubereitung, ein Verfahren zur Herstellung eines Gels oder einer Gel-bildenden Proteinzusammensetzung und der Gebrauch hiervon.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Transglutaminasen sind Enzyme, die in der Lage sind, eine Acyltransfer-Reaktion zu katalysieren, in der eine Gammacarboxyamidgruppe eines Peptid-gebundenen Glutaminrestes der Acyldonor ist. Primäre Aminogruppen einer Vielfalt von Verbindungen können unter anschließender Bildung von monosubstituierten Gammaamiden von Peptid-gebundener Glutaminsäure als Acylakzeptoren fungieren. Wenn in einer Peptidkette die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes als der Acylakzeptor dient, bildet die Transglutaminase intramolekulare oder intermolekulare ε-(γ-Glu)-Lys Vernetzungen.

[0003] Diese Peptid-vernetzende Aktivität ist für eine Vielfalt von industriellen Zwecken nützlich, einschließlich Gelieren von Proteinen, Reduzierung der Antigenität von Proteinen, Verbesserung der Backqualität von Mehl, Herstellung von pastenartigen Lebensmittelbelägen aus Proteinen, Fett und Wasser, Zubereitung von Käse aus Milchkonzentrat, Bindung von geschnetzeltem Fleischprodukt, Verbesserung von Geschmack und Textur von Lebensmittelproteinen, Herstellung von Gelee, Gelkosmetika, etc.

[0004] Eine breite Menge von Transglutaminasen aus Tieren und Pflanzen sind isoliert und charakterisiert worden. Die aus dem Tier abgeleiteten Tagasen sind Ca^{2+}-abhängig und oft Enzyme mit vielen Untereinheiten. Die am weitesten verbreitete Säugetier-Transglutaminase, FXIIIa, ist Produkt-inhibiert, schwierig in hohen Mengen zu erhalten und dadurch teuer, und daher nicht nützlich für alle Anwendungen.

[0005] Ein paar mikrobielle TGasen wurden beschrieben, einschließlich der Ca^{2+}-unabhängigen TGasen von Streptoverticillia, offengelegt in US 5,156,956, und verwandte Spezien, offengelegt in US 5,252,469.

[0006] Die Erträge an mikrobiellen Transglutaminasen in Schüttelflaschen und Fermentern sind weit unter denen, wie sie für andere industrielle Enzyme beobachtet werden. Folglich werden bessere Herstellungsverfahren benötigt, einschließlich neuer Hochertragserzeuger.

[0007] Vorher wurde dieses Ziel durch die Anwendung konventioneller rekombinanter DNA-Techniken zur Klonierung und Expression in E. coli, S. cerevisiae und S. lividans (Washizu et al.; Tahekana et al.; Takagi et al.) verfolgt, aber ohne Erfolg.

[0008] Klein et al. fanden und teilweise charakterisierten eine Transglutaminase aus dem Bakterienrasen Physarum polycephalum, welche ein Homodimer mit einem kompletten Molekulargewicht von 77 kDa ist. JP 6078783 Kokai bezieht sich auf den Gebrauch dieser Transglutaminase zur Proteingelierung. Dennoch ist es gut bekannt, das Bakterienrasen für industrielle Fermentation in großem Maßstab ungeeignet sind. Ferner ist Physarum kein Pilz; es gehört zu den Myxomyceten (Entrez NIH Datenbank, aktuelle Version Januar 1996). Taxonomisch gesehen ist die einzige gemeinsame Eigenschaft der Oomyceten, Mysomyceten und Eumycota (Pilze), dass sie alle mitochondrielle Eukaryoten sind.

[0009] Die Absicht der Erfindung ist, eine neue Transglutaminase zur Verfügung zu stellen, eine neue Transglutaminase-Zubereitung, ein Verfahren zur Herstellung der Transglutaminase oder Transglutaminase-Zubereitung mit besserem Ertrag und höherer Reinheit als bisher möglich, dessen Transglutaminase entweder allein oder in Kombination mit anderen Enzymen zu industriellen Zwecken genutzt werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Überraschenderweise wurde entdeckt, dass Organismen, die zu der Klasse der Oomyceten gehören, Transglutaminase produzieren und dass Exprimieren auf höchster Ebene durch Wachsenlassen dieser Coenocytium-bildenden Organismen erreicht wird.

[0011] Im besonderen wurde gezeigt, dass Isolate, die zur Klasse der Oomyceten gehören, Transglutaminase in beispiellos hohen Mengen exprimieren, einschließlich Isolate, die zur Ordnung Peronosporales, Familie Pythiaceae, und den Gattungen Pythium und Phytophthora gehören.

[0012] Dementsprechend bezieht sich vorliegende Erfindung auf Transglutaminase-Zubereitungen, die durch Züchten eines Transglutaminase-produzierenden Stammes der Klasse Oomyceten herstellbar ist, und auf neue Transglutaminasen, abgeleitet von Transglutaminase-produzierenden Stämmen der Klasse Oomyceten. Vorzugsweise sind die neue Transglutaminase und die Transglutaminase-Zubereitung der Erfindung abgeleitet von oder herstellbar von Transglutaminaseproduzierenden Stämmen, die zur Klasse Oomyceten gehören.

[0013] Ferner betrifft vorliegende Erfindung eine Vorgänger-Transglutaminase, abgeleitet von oder herstellbar von einer Spezies, ausgewählt aus Phytophthora cactorum, CBS 618.94 oder IFO 30474, Phytophthora

cryptogea, CBS 651.94, Pythium irregulare, CBS 701.95, Pythium sp., CBS 702.95, Pythium intermedium, CBS 703.95, Pythium sp., CBS 704.95, Pythium ultimum; CBS 705.95 oder einem funktionellen Analogon hiervon.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer Transglutaminase-Zubereitung gemäß der Erfindung durch Züchten in einem geeigneten Medium, einen Stamm, der zur Klasse Oomyceten gehört, vorzugsweise zu einer Ordnung ausgewählt aus Peronosporales, Saprolegniales, Leptomitales und Lagenidiales gehört, mehr bevorzugt zu einer Familie ausgewählt aus Pythiaceae, Peronosporaceae, Saprolegniaceae, Leptomitaceae, Rhiphidiaceae und Lagenidiaceae gehört, besonders zu einem Genus, ausgewählt aus Pythium und Phytophthora, gehört.

[0015] Ferner waren die vorliegenden Erfinder jetzt überraschenderweise erfolgreich bei der Isolierung und Charakterisierung einer DNA-Sequenz aus einem Stamm der Oomyceten Phytophthora cactorum, der Transglutaminase-Aktivität aufweist, wodurch es möglich gemacht wird, rekombinante Transglutaminase herzustellen.

[0016] Dementsprechend betrifft die Erfindung in noch einem anderen Aspekt ein DNA-Konstrukt, umfassend eine DNA-Sequenz, welche ein Enzym kodiert, welches Transglutaminase-Aktivität aufweist, welche DNA-Sequenz umfasst:

(a) die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte DNA-Sequenz und/oder die DNA-Sequenz, die aus dem Plasmid in Escherichia coli DSM 10256 erhältlich ist oder

(b) ein Analogon der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz und/oder der DNA-Sequenz, die aus dem Plasmid in Escherichia coli DSM 10256 erhältlich ist, welche

(i) homolog ist zu der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz und/oder der DNA-Sequenz, die aus dem Plasmid in E. coli DSM 10256 erhältlich ist, oder welche ein Polypeptid kodiert, das homolog ist zu dem Polypeptid, das von einer DNA-Sequenz kodiert wird, welche die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte DNA-Sequenz umfasst und/oder die DNA-Sequenz, die aus dem Plasmid in E. coli DSM 10256 erhältlich ist.

[0017] Der Stamm Escherichia coli wurde am 18. September 1995 unter der Ablagenummer DSM 10256 an der DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maascheroder Weg 1b, D-38125 Braunschweig, Deutschland, gemäß dem Budapester Übereinkommen abgelegt.

[0018] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Vernetzen von Proteinen, die das Zusammenbringen eines proteinhaltigen Substrates mit einer Transglutaminase oder Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0019] In noch einem anderen Aspekt bezieht sich die Erfindung auf den Gebrauch der Transglutaminase oder Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung in Mehl, gebackenen Produkten, Fleischprodukten, Fischprodukten, Kosmetika, Käse, Milchprodukten, gelierten Nahrungsmittelprodukten und Leder-„Finishing".

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0020] In der vorliegenden Beschreibung und in den vorliegenden Ansprüchen ist der Ausdruck „Transglutaminase" dazu bestimmt, als ein Enzym aufgefasst zu werden, das in der Lage ist, eine Acyltransfer-Reaktion zu katalysieren, in welcher eine Gammacarboxyamidgruppe eines Peptid-gebundenen Glutaminrestes der Acyldonor ist.

[0021] In dem vorliegenden Kontext ist der Ausdruck „ableitbar" oder „abgeleitet von" nicht nur dazu bestimmt, eine durch den Stamm des besagten Organismus produzierte Transglutaminase zu bezeichnen, sondern auch eine Transglutaminase, die durch eine DNA-Sequenz kodiert wird, die aus einem solchen Stamm isoliert wurde und in einem Gast-Organismus produziert wird, der mit genannter DNA-Sequenz transformiert wurde. Weiterhin ist der Ausdruck dazu bestimmt, eine Transglutaminase zu bezeichnen, die von einer DNA-Sequenz von synthetischem und/oder cDNA-Ursprung kodiert wird und die die identifizierenden Merkmale der besagten Transglutaminase hat.

[0022] Die Transglutaminase kann eine Komponente sein, die in einem Enzymsystem, das von einem bestimmten Mikroorganismus hergestellt wird, auftritt, solch ein Enzymsystem umfasst meistens mehrere verschiedene Enzymkomponenten. In der vorliegenden Beschreibung und in den vorliegenden Ansprüchen wird solch ein Enzymsystem, das mindestens eine Transglutaminase-Komponente umfasst, als „Transglutaminase-Zubereitung" angegeben.

[0023] Alternativ kann die Transglutaminase eine Einzelkomponente sein, z. B. eine Komponente, die im wesentlichen frei von anderen Enzymkomponenten ist, die normalerweise in einem Enzymsystem auftritt, das von einem bestimmten Mikroorganismus hergestellt wird, wobei die Einzelkomponente eine rekombinante Komponente ist, z. B. produziert durch klonieren einer DNA-Sequenz, die die Einzelkomponente kodiert, und anschließend der Transformation der Zelle mit der DNA-Sequenz und Expression in einem Wirt. Vorzugsweise ist der Wirt ein heterologe Wirt, aber unter bestimmten Bedingungen kann der Wirt auch ein homologer Wirt sein. Eine

rekombinante Transglutaminase kann gemäß der Standardverfahren, wie sie dem Fachmann geläufig sind, kloniert und exprimiert werden.

[0024] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die native oder ungeänderte Transglutaminase von mikrobiellen Ursprung, mehrspezifisch erhältlich aus einem Stamm, dort zur Klasse Oomyceten gehört.

[0025] Die Klasse Oomyceten umfasst die Ordnungen Peronosporales, Saprolegnisales, Leptomitales und Lagenidiales.

[0026] Die Ordnung Peronosporales umfasst die Familien Pythiaceae, Peronosporaceae, Peronophytophtoraceae und Albuginaceae.

[0027] Die Ordnung Saprolegniales umfasst die Familien Saprolegniaceae, Ectrogellaceae, Thraustochytriaceae, Haliphthoraceae und Leptolegniellaceae.

[0028] Die Ordnung Leptomitales umfasst die Familien Leptomitaceae und Rhiphidiaceae.

[0029] Die Ordnung Lagenidiales umfasst die Familien Lagenidiaceae, Olpidiaceae und Sirolpidiaceae.

[0030] Es wird in Betracht gezogen, dass alle Ordnungen und alle Familien die taxonomisch zur der Klasse Oomyceten gehören, Transglutaminase-produzierende Stämme umfassen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte es zur Kenntnis genommen werden, dass die Familien Peronophytophthoraceae, Albuginaceae, Ectrogellaceae, Thraustochytraiceae, Haliphthoraceae, Leptolegniellaceae, Olpidiaceae und Sirolpidiaceae klein und oft höchst spezialisiert sind. Folglich sollten die Familien Phythiaceae, Peronosporaceae, Saprolegniaceae, Leptomitaceae, Rhiphidiaceae und Lagenidiaceae als Vertreter der Oomyceten betrachtet werden.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung durch einen Transglutaminase-produzierenden Stamm produziert, der taxonomisch zu der Familie Pythiaceae gehört, vorzugsweise zu den genus Pythium oder dem genus Phytophthora mehr bevorzugt zu einer Untereinheit des genus Pythium Pringsheim (Waterhouse) oder einer Untereinheit des genus Phytophthora de-Bary (Newhook, Waterhouse and Stamps). Im folgenden werden Beispiele aller Mitglieder von allen Untereinheiten (I–III) der genus Pythium, und allen Untereinheiten (I–VI) der genus Phytophthora gegeben. Beispiele von Transglutaminase-produzierenden Spezien des genus Pythium sind

I) P. irregulare, CBS 701.95;
IIA_1) P. dissotocum;
IIA_2) P. periilum (oder P. periplocum); P. torulosum; P. aphanidermatum;
IIB) P. ultimum, CBS 705.95;
III) P. intermedium, CBS 703.95.

[0032] Beispiele für die Transglutaminase-produzierenden Spezien des genus Phytophthoras sind

I) P. cactorum; vorzugsweise P. cactorum, CBS 618.94 und IFO 30474.
II) P. palmivora;
III) P. porri;
IV) P. infestans;
V) P. megasperma;
VI) P. cryptogea; und P. cinnamomi; vorzugsweise P. cryptogea; CBS 651.94.

[0033] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung von einem Transglutaminaseproduzierenden Stamm produziert, der taxonomisch zu der Familie Peronosporaceae, vorzugsweise zu dem genus Plasmopara, mehr bevorzugt der Spezies Plasmopara halstedii gehört.

[0034] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung von einem Transglutaminaseproduzierenden Stamm produziert, der taxonomisch zu der Familie Saprolegniaceae, vorzugsweise zu einem genus ausgewählt aus den Gattungen Achlya, Saprolegnia und Aphanomyces gehört.

[0035] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung durch einen Transglutaminaseproduzierenden Stamm produziert, der taxonomisch zu der Familie Leptomitaceae, vorzugsweise zu einem genus, ausgewählt aus den Gattungen Apodachlya und Leptomitus gehört.

[0036] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung durch einen Transglutaminaseproduzierenden Stamm produziert, der taxonomisch zu der Familie Rhiphidiaceae, vorzugsweise zu einem genus, ausgewählt aus den Gattungen Aqualinderella und Rhiphidium gehört.

[0037] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die Transglutaminase-Zubereitung der vorliegenden Erfindung durch einen Transglutaminaseproduzierenden Stamm produziert, der taxonomisch zu der Familie Lagenidiaceae, vorzugsweise zu einem genus, ausgewählt aus den Gattungen Lagenidium und Olpidiopsis gehört.

[0038] In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung wird es in Erwägung gezogen, dass die neuen Transglut-

aminasen erhältlich oder ableitbar sind von Spezies, ausgewählt aus der Gruppe von Gattungen bestehend aus Pythium und Phytophthora, mehr bevorzugt aus den Spezies Pythium periilum (oder P. periplocum), Pythium irregulare, Pythium sp., Pythium ultimum, Pythium intermedium, Phytophthora cactorum und Phytophthora cryptogea; Phytophthora cactorum wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures unter der Hinterlegungsnummer CBS 618.94 am 20. Dezember 1994 (und erneut abgelegt am 19. Oktober 1995) abgelegt, und vorher am Institute for Fermentation, Osaka, unter der Hinterlegungsnummer IFO 30474; Phytophthora cryptogea wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures am 27. Dezember 1994 unter der Ablagenummer CBS 651.94 abgelegt; Pythium irregulares wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures am 19. Oktober 1995 unter der Hinterlegungsnummer CBS 701.95 abgelegt; Pythium sp. wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures am 19. Oktober 1995 unter der Ablagenummer CBS 702.95 abgelegt; Pythium intermedium wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures am 19. Oktober 1995 unter der Hinterlegungsnummer CBS 703.95 abgelegt; Pythium sp. wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures am 19. Oktober 1995 unter der Hinterlegungsnummer CBS 704.95 abgelegt; Pythium ultimum wurde im Centraalbureau voor Schimmelcultures am 19. Oktober 1995 unter der Hinterlegungsnummer CBS 705.95 abgelegt; alle Hinterlegungen wurden gemäß dem Budapester Übereinkommen vorgenommen.

[0039] Die Transglutaminase-Komponenten können entweder von dem homologen oder einer heterologen Wirt abgeleitet werden. Vorzugsweise ist die Komponente homolog. Dennoch wird eine heterologe Komponente, die mit einem Antikörper, der gegen eine hoch aufgereinigte Transglutaminase hochgezogen wird und von einem spezifischen Mikroorganismus abgeleitet wird, immunologisch reagiert, auch bevorzugt.

[0040] Vorteilhafterweise kann einer Vorgänger-Transglutaminase, ableitbar von einem Stamm der Gattungen Pythium und Phytophthora, auch verwendet werden.

[0041] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Vorgänger-Transglutaminase ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus einer Phytophthora cactorum, CBS 618.94/IFO 30474, Transglutaminase; einer Pythium irregulare, CBS 701.95, Transglutaminase; einer Pythium sp., CBS 702.95, Transglutaminase; einer Pythium intermedium, CBS 703.95, Transglutaminase; einer Pythium sp., CBS 704.95, Transglutaminase; einer Pythium ultimum, CBS 705.95, Transglutaminase und einer Phytophthora cryptogea, CBS 651.94, Transglutaminase; oder ist ein funktionelles Analogon zu irgendeinem der genannten Vorgänger-Transglutaminasen, welche

(i) eine Aminosäuresequenz beinhaltet, welche mindestens zu 40%, vorzugsweise mindestens zu 60%, insbesondere zu mehr als 74% homolog ist zur Aminosäuresequenz der Vorgänger-Transglutaminase,

(ii) mit einem Antikörper, der gegen die Vorgänger-Transglutaminase hochgezogen wurde, reagiert, und/oder

(iii) von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die mit der gleichen hybridisiert wie eine DNA-Sequenz wie die Vorgänger-Transglutaminase kodiert.

[0042] Eigenschaft (i) für das Analogon ist dazu bestimmt, den Grad der Identität zwischen dem Analogon und der Vorgänger-Transglutaminase anzuzeigen, und so eine Ableitung der ersten Sequenz von der zweiten anzuzeigen. Insbesondere wird ein Polypeptid als homolog zu der Vorgänger-Transglutaminase angesehen, wenn ein Vergleich der entsprechenden Aminosäuren eine Identität von mehr als ungefähr 40% zeigt, wie z. B. oberhalb von 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 74%, 80%, 85%, 90%, oder sogar 95%. Sequenz-Vergleiche können über bekannte Algorithmen durchgeführt werden, wie z. B. den einen beschrieben von Lipman und Pearson (1985).

[0043] Die zusätzlichen Eigenschaften ii) und iii) des Analogon der Vorgänger-Transglutaminase können wie folgt bestimmt werden:

[0044] Eigenschaft ii), z. B. die immunologische Kreuz-Reaktivität, kann unter Verwendung eines Antikörpers untersucht werden, der hochgezogen wurde gegen oder reagiert mit mindestens einem Epitop der Vorgänger-Transglutaminase. Der Antikörper, der entweder monoklonal oder polyklonal sein kann, kann durch Verfahren, die in dem Fach bekannt sind, hergestellt werden, z. B. wie beschrieben von Hudson et al., 1989. Die immunologische Kreuz-Reaktivität kann unter Verwendung von Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, bestimmt werden, Beispiele hiervon sind Western Blotting oder radiale Immundiffusions-Untersuchungen, z. B. wie beschrieben von Hudson et al., 1989.

[0045] Die Probe, die zur Charakterisierung des oben gemäß der Eigenschaft iii) definierten Analogons verwendet wird, kann auf der Basis der gesamten oder teilweisen Nucleotid- oder Aminosäuresequenz der Vorgänger-Transglutaminase passend hergestellt werden. Die Hybridisierung kann unter allen geeigneten Bedingungen durchgeführt werden, die es den DNA-Sequenzen erlauben, zu hybridisieren. Zum Beispiel sind solche Bedingungen, Hybridisierung unter genau angegebenen Bedingungen, z. B. mit sich bringend ein Einweichen in 5 × SSC und prehybridisieren für eine Stunde bei ungefähr 45°C in einer Lösung aus 5 × SSC, 5 × Denhardt's Lösung, 0.5% SDS und 100 µg/ml denaturierter sonifizierter Lachssperma DNA, gefolgt von hybridisieren in der gleichen Lösung, ergänzt mit ^{32}P-dCTP markierter Probe, für 12 Stunden bei ungefähr 45°C, oder andere Verfahren, z. B. von Sambrook et al., 1989, beschrieben.

[0046] In dem vorliegenden Kontext ist das "Analogon" der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz dazu bestimmt, jede DNA-Sequenz anzuzeigen, die ein Enzym kodiert, das Transglutaminase-Aktivität zeigt, welches irgendeine oder alle der Eigenschaften i)–iii) von Anspruch 2 hat. Die Analoge DNA-Sequenz

a) kann aus einem anderen oder verwandten (z. B. dem gleichen) Organismus, der die enzyme Transglutaminase-Aktivität auf der Basis der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz isoliert werden, z. B. unter Verwendung der hier beschriebenen Methode, und kann folglich z. B. eine Allel- oder Arten-Variante der DNA-Sequenz sein, beinhaltend die hier gezeigt,

b) kann auf der Basis der SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz konstruiert werden, z. B. durch Einführen von Nucleotid-Substitutionen, die keine andere Aminosäure der durch die DNA kodierten Transglutaminase enstehen lassen, sondern welche dem zur Herstellung des Enzyms bestimmten Codon-Gebrauch des Wirtsorganismus entsprechen, oder durch Einführen von Nucleotid-Substitutionen, die eine verschiedene Aminosäuresequenz entstehen lassen. Dennoch sind die im letzten Fall genannten Aminosäureaustausche vorzugsweise von kleinerer Natur, d. h. konservative Aminosäure-Substitutionen, die die Faltung oder Aktivität des Proteins nicht wesentlich beeinträchtigen, kleine Selektionen, typischer Weise von einer bis ungefähr 30 Aminosäuren; kleine amino- oder carboxylterminale Extensionen, wie z. B. ein amino-terminaler Methioninrest, ein kleines Verbindungspeptid von bis zu ungefähr 20–25 Resten, wie z. B. ein Poly-Bedienteil, ein antigenes Epitop oder eine Binde-Domäne. Siehe im allgemeinen Ford et al., Proteine Expression and Purification 2: 95–107, 1991.

[0047] Beispiele für konservative Substitutionen sind innerhalb der Gruppe der basischen Aminosäuren (wie z. B. Arginin, Lysin, Histidin), saure Aminosäuren (wie z. B. Glutaminsäuren und Asparaginsäure), polare Aminosäuren (wie z. B. Glutamin und Asparagin), hydrophobe Aminosäuren (wie z. B. Leucin, Isoleucin, Valin), aromatische Aminosäuren (z. B. Phenylalanin, Tryptophan, Tyorosin) und kleine Aminosäuren (wie z. B. Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Methionin).

[0048] Für den Fachmann ist klar, dass solche Substitutionen außerhalb der für die Funktion des Moleküls kritischen Regionen gemacht werden können und nach wie vor in einem aktiven Polypeptid resultieren. Aminosäuren, die essenziell sind für die Aktivität des Polypeptids, das von dem DNA-Konstrukt der Erfindung kodiert wird, und folglich vorzugsweise keiner Substitution unterzogen werden, können gemäß einer Methode, die auf dem Fachgebiet bekannt ist, identifiziert werden, wie z. B. zielgerichtete Mutagenese oder alanin-abtastende Mutagenese (alaninescanning mutagenesis) (Cunningham and Wells, Science 244, 1081–1085, 1989). In der letztgenannten Technik werden in jeden Rest in dem Molekül Mutationen eingeführt, und die daraus resultierenden mutierten Moleküle werden auf biologische (z. B. Transglutaminase) Aktivität getestet, um Aminosäurereste zu identifizieren, die kritisch sind für die Aktivität des Moleküls. Stellen der Substrat-Enzym-Interaktion können auch bestimmt werden durch Analyse der Kristallstruktur, die durch solche Techniken wie Kernspinresonanz, Kristallographie oder Photoaffinitäts-Markierung (photoaffinity labeling). Siehe z. B. de Vos et al., Science 255: 306–312, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224: 899–904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309: 59–64, 1992.

[0049] Die oben in i) genannte Homologie oder von Anspruch 2 wird bestimmt als das Maß der Identität zwischen den zwei Sequenzen, die eine Abstammung der ersten Sequenz von der zweiten anzeigt. Die Homologie kann geeigneter Weise anhand von auf dem Fachgebiet bekannten Computerprogrammen bestimmt werden, wie z. B. GAP, zur Verfügung gestellt in den GCG Programmpaket (Needleman, S. B. und Wunsch, C. D., Journal of Molecular Biology, 48: 443–453, 1970). Anwendung von GAP zur DNA-Sequenz-Analyse mit den folgenden Einstellungen: "GAP creation penalty" von 5.0 und GAP "extension penalty" von 0.3 zeigt die kodierende Region der DNA-Sequenz ein Maß an Identität vorzugsweise von mindestens 80%, hauptsächlich von mindestens 90%, zu der kodierenden Region der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz.

[0050] Die oben in iii) genannte Homologie oder von Anspruch 2 wird bestimmt als das Maß der Identität zwischen den zwei Sequenzen, die eine Abstammung der ersten Sequenz von der zweiten anzeigt. Die Homologie kann geeigneter Weise anhand von auf dem Fachgebiet bekannten Computerprogrammen bestimmt werden, wie z. B. GAP, zu Verfügung gestellt in den GCG Programmpaket (Needleman, S. B. und Wunsch, C. D., Journal of Molecular Biology, 48: 443–453, 1970). Anwendung von GAP zur DNA-Sequenz-Analyse mit den folgenden Einstellungen: GAP "creation penalty" von 3.0 und GAP "extension penalty" von 0.1, zeigt das von einer homologen DNA-Sequenz kodierte Polypeptid ein Maß der Identität vorzugsweise von mindestens 80%, hauptsächlich von mindestens 90%, zu dem von einem DNA-Konstrukt kodierten Enzym, das die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte DNA-Sequenz beinhaltet.

[0051] In weiteren Aspekten betriff die Erfindung einen Expressionsvektor, der das DNA-Konstrukt der Erfindung beherbergt, eine Zelle, die aus DNA-Konstrukt oder den Expressionsvektor beinhaltet, und ein Verfahren zur Herstellung eines Enzyms, das Transglutaminase-Aktivität zeigt, welches Verfahren das Züchten der genannten Zelle unter Bedingungen, welche die Herstellung des Enzyms und die Rückgewinnung des Enzyms aus der Kultur erlauben, umfasst.

[0052] In noch einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Enzym, das Transglutaminase-Aktivität zeigt, wobei das Enzym

a) von einem DNA-Konstrukt der Erfindung kodiert wird

b) durch das Verfahren der Erfindung hergestellt wird.

[0053] Die DNA-Sequenz der Erfindung, die ein Enzym kodiert, das Transglutaminase-Aktivität zeigt, kann durch ein allgemeines Verfahren isoliert werden, das einschließt

– Klonieren einer DNA-Bibliothek von Phytophthora cactorum geeignete Vektoren,

– Transformieren geeigneter Hefegastzellen mit genannten Vektoren,

– Züchten der Gastzellen unter geeigneten Bedingungen, um irgendein Enzym von Interesse, das von einem Klon in der DNA-Bibliothek kodiert wird, zu exprimieren,

– Selektion der positiven Klone durch Bestimmung irgendeiner Transglutaminase-Aktivität des Enzyms, das von solchen Klonen produziert wird, und

– Isolieren der enzymkodierenden DNA aus solchen Klonen.

[0054] Das allgemeine Verfahren wird ferner in WO 94/14953 offenbart. Eine ausführlichere Beschreibung des Auswahlverfahrens wird unten in Beispiel 5 gegeben.

[0055] Die DNA-Sequenz, die ein Enzym kodiert, kann z. B. durch Durchsuchen einer cDNA-Bibliothek von Phytophthora cactorum und Auswahl der Klone die Transglutaminase-Aktivität expremieren, oder aus Escherichia coli, DSM 10256, isoliert werden. Die geeignete DNA-Sequenz kann dann mit Standardverfahren aus dem Klon isoliert werden, z. B. wie im Beispiel 5 beschrieben.

[0056] Es wird erwartet, dass eine DNA-Sequenz, die ein homologes Enzym kodiert, z. B. eine analoge DNA-Sequenz, aus anderen Mikroorganismen erhalten werden kann. Zum Beispiel kann die DNA-Sequenz durch ein auf die gleiche Weise erfolgtes Durchsuchen der cDNA-Bibliothek eines anderen Pilzes, wie z. B. eines Stammes von Pythium, abgeleitet werden.

[0057] Alternativ kann die DNA, die eine Transglutaminase der Erfindung kodiert, in Übereinstimmung mit gut bekannten Verfahren in geeigneter Weise aus DNA aus geeigneter Quelle unter Verwendung von synthetischen Oligonucleotidproben, die auf Basis der hier offenbarten DNA-Sequenzen hergestellt werden, isoliert werden, die z. B. irgendeiner der oben erwähnten Organismen. Zum Beispiel kann eine geeignete Oligonucleotidprobe auf Basis der SEQ ID Nr. 1 gezeigten Nucleotidsequenz oder irgendeiner geeigneten Untersequenz davon hergestellt werden.

[0058] Die DNA-Sequenz kann anschließend in einen rekombinanten Expressionsvektor eingesetzt werden. Dies kann irgendein Vektor sein, der geeigneter Weise rekombinanten DNA-Verfahren unterzogen werden kann, die Wahl des Vektors wird oft von der Gastzelle abhängen, in welcher dieser eingeführt werden soll. Folglich kann der Vektor eine autonom-replizierender Vektor sein, der z. B. ein Vektor der als eine extrachromosonale Einheit existiert, deren Replikation unabhängig ist von chromosonaler Replikation, z. B. ein Plasmid. Alternativ kann der Vektor einer sein, der, wenn in eine andere Gastzelle eingeführt, in das Gastzellgenom integriert wird und zusammen mit dem Chromosom/mit den Chromosomen in welches/in welche er integriert wurde, repliziert. In dem Vektor sollte die DNA-Sequenz, die die Transglutaminase kodiert, funktionsfähig mit einer geeigneten Promotor- und Terminator-Sequenz verbunden sein. Der Promotor kann irgendeine DNA-Sequenz sein, die transkriptionelle Aktivität in der Gastzelle der Wahl zeigt, und kann von Genen abgeleitet sein, die Proteine kodieren, die entweder homolog oder heterolog zu der Gastzelle sind. Die Methoden, die verwendet werden, um die DNA-Sequenzen, die die Transglutaminase kodieren, bzw. den Terminator zu legieren und diese in geeignete Vektoren einzusetzen, sind Personen, die in dem Fach qualifiziert sind, gut bekannt (vgl., zum Beispiel Sambrook et al., 1989).

[0059] Die Gastzelle, die mit der DNA-Sequenz, die das Enzym der Erfindung kodiert, transformiert wird, ist vorzugsweise eine eukaryotische Zelle, insbesondere eine Pilzzelle, wie zum Beispiel eine Hefe oder filamentöse Pilzzelle. Insbesondere kann die Zelle zur einer Spezies von Aspergillus oder Trichoderma gehören, am meisten bevorzugt zu Aspergillus oryzae oder Aspergillus niger. Pilzzellen können durch eine Prozess transformiert werden, der Protoplastenbildung und Transformation der Protoplasten, gefolgt von Regeneration der Zellwand in einer an sich bekannten Art und Weise einschließt. Der Gebrauch von Aspergillus als Gastorganismus wird in EP 238 023 (von Novo Nordisk A/S) beschrieben. Die Gastzelle kann auch eine Hefezelle sein, z. B. eine Stamm von Saccharomyces, insbesondere Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces kluyveri oder Saccharomyces uvarum, ein Stamm von Schizosaccaromyces sp., wie zum Beispiel Schizosaccharomyces pombe, ein Stamm von Hansenula sp. Pichia sp., Yarrowia sp. wie zum Beispiel Yarrowia lipolytica, oder Kluyveromyces sp. wie zum Beispiel Kluyveromyces lactis.

[0060] In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines Enzyms gemäß der Erfindung, worin eine geeignete Gastzelle mit einer DNA-Sequenz, die das Enzym kodiert, transformiert wird, unter Bedingungen, die die Produktion des Enzyms erlauben, gezüchtet wird, und das resultierende Enzym aus der Kultur wiedergewonnen wird.

[0061] Das Medium, das zum Züchten der transformierten Gastzelle verwendet wird, kann irgendein übliches Medium sein, das geeignet ist für das Wachstum der besagten Zellen. Die exprimierte Transglutaminase kann in geeigneter Weise in das Kulturmedium abgesondert werden, und kann daraus durch gut bekannte Methoden wiedergewonnen werden, einschließlich abtrennen der Zellen aus dem Medium durch Zentrifugieren oder Filtrieren, Fällen der proteinhaltigen Komponenten des Mediums durch die Wirkung eines Salzes wie zum Beispiel Ammonium Sulfat, gefolgt von chromatographischen Methoden, wie zum Beispiel Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie, oder Ähnlichem.

Klonierung und Expression eines Transglutaminase-Enzyms aus Phytophthora cactorum.

MATERIAL UND METHODEN

[0062] Hinterlegte Organismen: Escherichia coli DSM 10256, enthalten das Plasmid, das die volle Länge DNA-Sequenz umfasst, in den Transport-Vektor pYES 2.0 kodierend für die Transglutaminase der Erfindung.
[0063] Hefestamm: Der verwendete Saccharomyces cerevisiae Stamm war W3124 (MATα; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1:: LEU2; cir+).

Plasmide:

[0064] Der Aspergillus Expressions-Vektor pHD414 ist ein Abkömmling des Plasmids p775 (beschrieben in EP 238 023). Die Konstruktion von pHD414 ist ferner beschrieben in WO 93/11249.
pYES 2.0 (Invitrogen)

Isolierung der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz:

[0065] Die volle Länge DNA-Sequenz, umfassend die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Sequenz, kodierend für die Transglutaminase der Erfindung, kann aus dem abgelegten Organismus Escherichia coli DSM 10256 durch Extraktion der Plasmid-DNA durch Methoden, die in dem Fach bekannt sind, erhalten werden (Sambrook et al.).
[0066] Extraktion der Gesamt-RNA wurde durchgeführt mit Guanidin Thiocyanat, gefolgt von Ultrazentrifugation durch einen 5.7 M CsCl Puffer, und Isolierung der poly(A)$^+$RNA wurde durchgeführt durch Oligo(dT)-Zellulose Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung der WO 94/14953 beschriebenen Methode.
[0067] cDNA Synthese: Doppelsträngige cDNA wurde aus 5 µg poly(A)$^+$RNA durch das RNase H Verfahren (Gubler und Hoffman, Sambrook et al.) unter Verwendung der von F. S. Hagen (pers. comm.) entwickelten Haarnadel Abänderung synthetisiert. Die poly(A)$^+$RNA (5 µg in 5 µl DEPC-behandelten Wasser) wurde in einem vorsilikonisierten, RNase-freien Eppendorf Reaktiongefäß bei 70°C für 8 Min. erhitzt, auf Eis abgeschreckt und einem finalen Volumen von 50 µl mit reverser transglubtase Puffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, Bethesda Research Laboratories), der ein mM dATP, dGTP und dTTP und 0.5 mM 5-Methyl-dCTP (Pharmacia), 40 Einheiten von einem aus der humanen Plazenta stammenden Ribonuclease Inhibitor (RNasin, Promega), 1.45 µg Oligo $(dT)_{18}$-Not I primer (Pharmacia) und 1000 Einheiten Super-Script II RNase H reverse Transcriptase (Bethesda Research Laboratories) enthält, vereinigt. Die ersten Strang der cDNA wurde durch Inkubieren des Reaktionsgemisches bei 45°C für eine Stunde synthetisiert. Nach der Synthese wurde die mRNA : cDNA Hybridmischung durch eine MicroSpin S-400 HR (Pharmacia) Drehsäule gemäß den Herstellerangaben gelfiltriert.
[0068] Nach der Gelfiltration wurden die Hybride in 250 µl zweiter Strang Puffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 90 mM KCl, 4.6 mM $MgCl_2$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.16 mM ßNAD+), der 200 µM von jedem dNTP, 60 Einheiten E. coli DNA polymerase 1 (Pharmacia), 5.25 Einheiten RNase H (Promega) und 15 Einheiten E. coli DNA lipase (Boehringer Mannheim), enthält, verdünnt. Die Synthese des zweiten Stranges der cDNA wurde durch Inkubieren der Reaktionsgefässes bei 16°C für 2 Stunden und zusätzlich 15 Min. bei 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von EDTA in einer finalen Konzentration von 20 mM gestoppt, gefolgt von einer phenol chloroform Extraktion.
[0069] Mungobohnen Nuclease-Behandlung: Die doppelsträngige cDNA wurde durch Zugabe von 2 vols 96%igen EtOH, 0.2 vol 10 M NH_4Ac bei –20°C für 12 Stunden gefällt, durch Zentrifugieren wiedergewonnen, in 70%igen EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl Mungobohnen Nuclease-Puffer (30 mM NaAc, pH 4.6, 300 mM NaCl, 1 mM $ZnSO_4$, 0.35 mM DTT, 2% Glycerol), der 25 Einheiten Mungbohnen Nuclease (Pharmacia) enthält, resuspendiert. Die einzelsträngige Haar-Nadel DNA wurde durch Inkubieren der Reaktion bei 30°C für 30 Min. abgeschnitten, gefolgt durch Zugabe von 70 µl 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, Phenol Extraktion und Fällung mit 2 vols von 96%igen EtOH und 0.1 vol 3 M NaAc, pH 5.2 auf Eis für 30 Minuten.
[0070] Herstellen stumpfer Enden mit T4 DNA Polymerase: Die doppel-strängigen cDNAs wurden durch Zentrifugieren wiedergewonnen und stumpfe Enden wurden durch Inkubieren des Reaktionsgemisches bei 16°C

für 1 Stunde in 30 µl T4 DNA Polymerase Puffer (20 mM Tris-Acetat, pH 7.9, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 1 mM DTT), der 0.5 mM von jedem dNTP und 5 Einheiten T4 DNA Polymerase (New England Biolabs) enthält, gestellt. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von EDTA in einer finalen Konzentration von 20 mM gestoppt, gefolgt von einer Phenol und Chloroform Extraktion für 12 Stunden bei –20°C unter Zugabe von 2 vols 96%igen EtOH und 0.1 vol 3 M NaAc pH 5.2.

Adapterligation, Not I Verdau- und Größenselektion:

[0071] Nach der Auffüllreaktion wurden die cDNAs durch Zentrifugieren wiedergewonnen, in 70%igen EtOH gewaschen und getrocknet. Das cDNA Pellet wurde in 25 µl Ligations-Puffer (30 mM Tris-Cl, pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP), der 2.5 µg Nicht-Palindronisch BstXI Adapter (Invitrogen) und 30 Einheiten T4 Ligase (Promega) enthält, resuspendiert, und bei 16°C für 12 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen bei 65°C für 20 Min. gestoppt und auf Eis für 5 Min. gekühlt. Die angeglichene cDNA wurde mit Not I Restriktions-Enyzm unter Zugabe von 20 µl Wasser, 5 µl 10 × Not I Restriktions-Enyzm Puffer (New England Biolabs) und 50 Einheiten Not I (New England Biolabs) verdaut, gefolgt von Inkubation von 2.5 Stunden bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen bei 65°C für 10 Min. gestoppt. Die cDNAs wurden durch Gel-Elektrophorese auf einem 0.8%igen SeaPlaque GTG low melting temperature agarose gel (FMC) in 1 × TBE der Größe nach aufgetrennt, um unlegierte Adapter und kleine cDNAs zu trennen. Die cDNA wurde mit einem Cut-Off bei 0.7 kb der Größe nach selektioniert und unter Verwendung der β-Agarose (New England Biolabs) gemäß den Herstellerangaben aus dem Gel wiedergewonnen und für 12 Stunden bei –20°C unter Zugabe von 2 vols 96%igen EtOH und 0.1 vol 3 M NaAc pH 5.2 gefällt.

[0072] Konstruktion der Bibliotheken: Die gerichtete, der Größe nach selektionierte cDNA wurde durch Zentrifugieren gewonnen, in 70%igen EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA resuspendiert. Die cDNAs wurden durch Gelfiltration durch eine MicroSpin S-300 HR (Pharmacia) Drehsäule gemäß den Herstellerangaben entsalzt. Es wurden drei Testligationen in 10 µl Ligations-Puffer (30 mM Tris-Cl, pH 7.8, 10 mM MgCl, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP), der 5 µl doppelsträngige cDNA (Reaktionsgefäße #1 und #2), 15 Einheiten T4 Ligase (Promega) und 30 ng (Reaktionsgefäß #1), 40 ng (Reaktionsgefäß #2) und 40 ng (Reaktionsgefäß #3, die Vektor-Hintergrund-Kontrolle) BstXI-NotI geschnittenen pYES 2.0 Vektor enthält, durchgeführt. Die Ligations-Reaktionen wurden durch Inkubations bei 16°C für 12 Stunden, erhitzen auf 70°C für 20 Min. und Zugabe von 10 µl Wasser zu jedem Reaktionsgefäß durchgeführt. 1 µl von jeder Ligationsmischung wurden in 40 µl Elektrokomponente E. coli DH10B Zellen (Bethesda Research Laboratories) wie beschrieben (Sambrook et al.) elektroporiert. Unter Verwendung der optimalen Bedingungen wurde in E. coli eine Bibliothek etabliert, die aus Reservoirs besteht, die aus 15.000–30.000 koloniebildenden Einheiten bestehen. Jedes Reservoir von transformierten E. coli wurde auf LB + Ampicillin Agar Platten ausgestrichen, 15.000–30.000 Kolonien/Platte nach einer Inkubation bei 37°C für 24 Stunden bildend. Zu der Platte wurden 20 ml LB + Ampicillin hinzugegeben und die Zellen wurden darin suspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Plasmid DNA wurde aus den Zellen gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung eines CIAGEN Plasmid Kit isoliert und bei –20°C gelagert.

[0073] 1 µl Aliquots an aufgereinigter Plasmid DNA (100 ng/µl) aus einzelnen Reservoirs wurden in s. cerevisiae W3124 durch Elektroporation (Becker und Guarante) transformiert, und die Transformanten wurden auf SC Agar, der 2% Glucose enthält, ausplatiert und bei 30°C inkubiert.

[0074] Identifizierung der positiven Kolonien: Nach einem Wachstum von 3–5 Tagen wurden die Agar-Platten auf einen Satz von SC variierenden Agar-Platten replika platiert. Diese Platten wurden für 6–8 Tage bei 30°C inkubiert.

[0075] Runde (Durchmesser 8.2 cm) Immobilon PVDF Transfermembranen zum Protein-Blotten (Millipore) wurden für 1–3 Sekunden in 96%igen EtOH angefeuchtet und in Wasser für 1 Min. gespült. Die Membranen wurden für 2 Stunden in 2%igen N,N-DimethylKasein, 150 mM NaCl, 0.1 M Trispuffer pH 7.5 inkubiert und zweimal in 150 mM NaCl, 0.1 M Trispuffer pH 7.5 gewaschen (1 Min.).

[0076] Eine Kasein saturierte Membran wurde auf jede SC variierende Agar-Platte mit Hefekolonien platziert. Die Platte wurde bei 30°C über Nacht mit 1 ml 0.5 mM 5-(Biotinamido)-Pentylamin (Pierce), 0.1 M Trispuffer pH 7.5, 50 mM $CaCl_2$ inkubiert. Nach 3 Waschgängen (15 Min.) in 0.1 M NaP_3O_4/HP_3O_4 Puffer pH 6.5 wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10 ml 0.17 µg/ml Peroxidase markierten Streptavidin (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) inkubiert. Nach weiteren 3 Waschgängen (15 Min.) in 0.1 M NaP_3O_4/HP_3O_4 Puffer pH 6.5 wurde die Membran bei Raumtemperatur mit 1 ml 2 mM ABTS (Sigma), 1 mM H_2O_2, 0.1 M NaP_3O_4/HP_3O_4 Puffer pH 6.5 inkubiert, bis Transglutaminase positive Kolonien durch einen grünen oder lilafarbigen Hof identifiziert wurden.

[0077] Zellen aus Enzym-Positiven Kolonien wurden zur Isolierung von einzelnen Kolonien auf Agar ausgestrichen, und für jeden der identifizierten Transglutaminaseproduzierenden Kolonien wurde eine enzym-produzierende einzelne Kolonie ausgewählt.

[0078] Charakterisierung von positiven Klonen: Die positiven Klone wurde als einzelne Kolonien erhalten, die

cDNA Einsätze wurden direkt aus der Hefekolonie unter Verwendung von biotinylierten Polylinker primers amplifiziert, aufgereinigt durch ein System aus magnetischen Kügelchen (Dynabead M-280, Dynal) und einzeln charakterisiert durch Sequenzierung des 5'-Endes von jedem cDNA Klon unter Verwendung der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al.) und dem Sequenase-System (United States Biochemical).

[0079] Isolierung von einem cDNA Gen für die Expressionen Aspergillus: Eine transglutaminase-produzierende Hefekolonie wurde in einem 50 ml Glass-Test Reaktionsgefäß in 20 ml YPD Brühe eingeimpft. Das Reaktionsgefäß wurde für 2 Tage bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 10 Min. bei 3000 rpm geerntet.

[0080] Die DNA wurde gemäß WO 94/14953 isoliert und in 50 µl Wasser aufgelöst. Die DNA wurde durch Standardverfahren in E. coli transformiert. Unter Verwendung von Standardverfahren wurde Plasmid DNA aus E. coli isoliert, und durch Restruktions-Enzymanalyse analysiert. Der cDNA Einsatz wurde unter Verwendung geeigneter Restruktionsenzyme ausgeschnitten und in einen Aspergillus Expressionsvektor legiert.

Transformation von Aspergillus oryzae oder Aspergillus niger

[0081] Die Protoplasten können wie in WO 95/02043, S. 16, Zeile 21 – Seite 17, Zeile 12 aufbereitet werden.

[0082] 100 µl der Protoplasten-Suspension wird mit 5–25 µg der geeigneten DNA in 10 µl STC (1.2 M Sorbit, 10 m M Tris-HCl, pH = 7.5, 10 mM $CaCl_2$) vermischt. Die Protoplasten werden mit p3SR2 (ein Plasmid, das das A. nidulans amdS Gen trägt) gemischt. Die Mischung wird für 25 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. 0.2 ml von 60%igen PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM $CaCl_2$ und 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 wird zugegeben und vorsichtig gemischt (zweimal) und schließlich werden 0.85 ml der gleichen Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Mischung wird für 25 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, für 15 Minuten bei 2500 g gedreht und das Pellet wird in 2 ml von 5.2 M Sorbit resuspendiert. Nach einer weiteren Sedimentation werden die Protoplasten auf minimal Platten (Cove), die 1.0 M Sucrose, pH 7.0, 10 mM Acetamid als Stickstoffquelle und 20 mM CsCl um Hintergrundwachstum zu verhindern, enthalten, ausgestrichen. Nach Inkubation für 4–7 Tage bei 37°C werden Sporen gepickt und um Einzelkolonien zu erhalten, ausgebreitet. Diese Methode wird wiederholt und die Sporen einer Einzelkolonie nach der zweiten Reisolierung wird als ein definierter Transformant gelagert.

Test der A. oryzae Transformanten

[0083] Jeder der Transformanten wurden in 10 ml YPM eingeimpft und vermehrt. Nach einer Inkubation von 2–5 Tage bei 37°C wurden 10 ml Überstand entfernt. Die Transglutaminase-Aktivität wurde durch die oben beschriebenen 5-(biotinamido)-pentylamine Plattentest und den Putrescine-Test, beschrieben in Beispiel 1 unten, identifiziert.

Hybridisierungsbedingungen (zu verwenden beim Bewerten der Eigenschaft ii) des DNA-Konstrukts der Erfindung):

[0084] Geeignete Bedingungen zum Bestimmen der Hybridisierung zwischen einer DNA oder RNA oder einer Oligonucleotid-Probe und einer homogologen DNA- oder RNA-Sequenz beinhaltet das Voreinweichen des Filters, der die zu hybridisierenden DNA-Fragmente oder die zu hybridisierende RNA enthält, in 5 × SSC (Standard-Salz-Citrat) für 10 Min. und vorhybridisieren des Filters in einer Lösung aus 5 × SSC (Sambrook et al., 1989), 5 × Denhardt's Lösung (Sambrook et al., 1989), 0.5%ig SDS und 100 µg/ml denaturierter sonifizierter Lachssperma-DNA (Sambrook et al., 1989), gefolgt von einer Hybridisierung in der gleichen Lösung, die eine zufällig geprimte (Feinberg und Vogelstein, 1983) ^{32}P-dCTP markierte (spezifische Aktivität > 1 × 10^9 cpm/µg) Probe enthält, für 12 Stunden bei ungefähr 45°C. Der Filter wird dann zweimal für 30 Minuten in 2 × SSC, 0.5% SDS bei einer Temperatur von vorzugsweise mindestens 45°C, mehr bevorzugt von mindestens 50°C, sogar mehr bevorzugt von mindestens 55°C, sogar mehr bevorzugt von mindestens 60°C, am meisten bevorzugt von mindestens 65°C, hauptsächlich von mindestens 70°C, mehr bevorzugt von mindestens 75°C gewaschen.

[0085] Eine geeignete DNA oder RNA oder eine Oligonucleotid-Probe, die in der Hybridisierung benutzt werden muss, kann auf der Basis der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz, oder auf der Basis der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten abgeleiteten Aminosäuresequenz zubereitet werden.

[0086] Immunologische Kreuz-Reaktivität: Antikörper, die zum Bestimmen der immunologischen Kreuz-Reaktivität verwendet werden müssen, können unter Verwendung einer gereinigten Transglutaminase hergestellt werden. Mehrspezifisch kann Antiserum gegen die Transglutaminase der Erfindung durch das Immunisieren von Hasen (oder anderen Nagetieren) gemäß der von N. Axelsen et al., Kapitel 23, oder A. Johnstone und R. Thorpe beschriebenen Methode hochgezogen werden. Aufgereinigte Immunoglobuline können zum Beispiel durch Salzfällung ($(NH_4)_2SO_4$) aus dem Antiserum erhalten werden, gefolgt von Dialyse und Ionenaustauscher Chromatographie, z. B. auf DEAE-Sephadex. Immunochemische Charakterisierung der Proteine kann entwe-

der durch Outcherlony-Doppel-Diffusion-Analysen (O. Ouchterlony) durchgeführt werden, durch Kreuz-Immunoelektrophoresis (N. Axelsen et al., Kapitel 3 und 4) oder durch araketen Immunoelektrophoresis (N. Axelsen et al., Kapitel 2).

Medien

YPD: 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, H_2O bis 900 ml. autoklarviert, 100 ml 20%iger Glucose (steril filtriert) hinzugefügt.
YPM: 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, H_2O bis 900 ml. autoklarviert, 100 ml 20%ig Maltodextrin (steril filtriert) hinzugefügt.
10 × basales Salz: 75 g Hefestickstoffbase, 113 g Bernsteinsäure, 68 g NaOH, H_2O bis 1000 ml, steril filtriert.
SC-URA: 100 ml 10 × basales Salz, 28 ml 20%ige Casaminosäuren ohne Vitamine, 10 ml 1%iges Tryptophan, H_2O bis 900 ml, autolaviert, 3.6 ml 5% Threonine und 100 ml 20%ige Glucose oder 20%ig Galachose werden hinzugefügt.
SC-Agar: SC-URA, 20 g/l Agar hinzugefügt.
SC-variiernder Agar: 20 g Agar, 20 ml 10 × basales Salz, H_2O bis 900 ml, autoklarviert, 10 ml 1%ig Tryptophan, 3.6 ml 5%ig Threonin und 100 ml 20%ig Galactose hinzugefügt.

Beschaffenheiten der Erfindung

[0087] Obwohl die verwendbare Transglutaminase-Zubereitung oder die rekombinante Transglutaminase als solche hinzugefügt werden können, wird es bevorzugt, dass sie in eine geeignete Beschaffenheit formuliert wird.
[0088] Die Transglutaminase, die für den industriellen Gebrauch geeignet ist, kann in irgendeiner Form sein, die für die Verwendung geeignet ist, z. B. in der Form eines trocknen Pulvers oder Granulates, insbesondere eines nicht staubenden Granulates, einer Flüssigkeit, insbesondere einer stabilisierten Flüssigkeit, oder einem geschützten Enzym. Granulate können z. B. wie in US 4,106,991 und US 4,661,452 offenbart, hergestellt werden, und können optional durch Verfahren, die in dem Fach bekannt sind, beschichtet werden. Flüssige Enzym-Zubereitungen können zum Beispiel durch das Hinzufügen von ernährungswissenschaftlich akzeptierten Stabilisatoren stabilisiert werden, wie zum Beispiel ein Zucker, ein Zuckeralkohol oder ein anderer Polyol, Milchsäure oder eine andere organische Säure gemäß den etablierten Verfahren. Geschützte Enzyme können gemäß dem in EP 238,216 offenbarten Verfahren zubereitet werden. Die Enzym-Zubereitung der Erfindung kann auch ein Konservierungsmittel umfassen.
[0089] Normalerweise kann es vorteilhaf sein, wenn die Enzym-Zubereitung für die Einlagerung in Mehl, backende oder gebackene Produkte, Fleischprodukte, Käse und andere Milchprodukte, Fischprodukte, Kosmetika, verschieden geliertes Essen in der Form eines trockenen Produktes vorliegt, z. B. ein nicht staubendes Granulat, wohingegen es für die Einlagerung zusammen mit einer Flüssigkeit es in einer flüssigen Form vorteilhaft ist.
[0090] Die rekombinante Transglutaminase und die Transglutaminase-Zubereitungen der vorliegenden Erfindung können auch beim Backen zur Verbesserung der Entwicklung, Elastizität und/oder Stabilität des Teiges und/oder des Volumens, Crumenstruktur und/oder anti-treibenden Eigenschaften des gebackenen Produktes verwendet werden. Obwohl die Transglutaminase zur Zubereitung von Teig oder gebackenen Produkten, die aus irgendeinem Typ von Mehl oder Essen zubereitet sind (z. B. basierend auf Roggen, Gerste, Hafer oder Mais) verwendet werden kann. Wurde entdeckt, dass die vorliegende Transglutaminase ganz besonders nützliche bei der Zubereitung von Teig oder gebackenen Produkten ist, die aus Weizen gemacht wurden oder beträchtliche Mengen an Weizen umfassen. Die gebackenen Produkte, die mit einer Transglutaminase der Erfindung zubereitet werden, schließen Brot, Rollen, Baguettes und Ähnliches ein. Zum Zwecke des Backens kann die Transglutaminase der Erfindung als die einzige oder hauptsächliche enzymatische Aktivität verwendet werden, oder kann in Kombination mit anderen Enzymen, wie zum Beispiel einer Lipase, einer Amylase, einer Oxidase (z. B. Glucose-Oxidase, Peroxidase), einer Laccase und/oder einer Protease verwendet werden.
[0091] Vorzugsweise wird die Transglutaminase der Erfindung, hauptsächlich die rekombinante Transglutaminase, in Mehl, gebackenen Produkten, Fleischprodukten, Käse und anderen Milchprodukten, Fischprodukten, Kosmetika und verschiedene gelierten Lebensmittelprodukten in einer Menge zwischen 0.01 und 100 mg pro kg, mehr bevorzugt von zwischen 0.1 und 50 mg pro kg, am meisten bevorzugt zwischen 0.5 und 30 mg pro kg, hauptsächlich zwischen 1 und 10 mg pro kg verwendet.
[0092] Ferner wird es in Erwägung gezogen, dass die rekombinante Transglutaminase und die Transglutaminase-Zubereitungen der vorliegenden Erfindung auch Glutaminase-Aktivität zeigen können, z. B. glutaminspezifischer Deamidierung fähig sind. Demgemäß kann ein Protein-Substrat, das im wesentlichen frei von Lysin oder zumindest einen sehr niedrigen Lysingehalt hat, durch Anwenden der Transglutaminase der Erfindung einer Deamidierung unterzogen werden, so ein Protein ist z. B. Gluten oder ein Gluten-Hydrolysat. In einem

anderen Aspekt der Erfindung kann die Transglutaminase der Erfindung nützlich sein für die Behandlung von Lebensmittelprodukten, die Gluten enthalten, z. B. zur Verbesserung der Gefälligkeit oder anderen Eigenschaften von Brot und anderen gebackenen Lebensmittelprodukten, oder zur Reduzierung der Alerginität von Lebensmittelprodukten, die Gluten oder Gluten-Hydrolysate enthalten. Die Erfindung wird ferner in den folgenden, nicht-beschränkenden Beispielen veranschaulicht.

BEISPIEL 1

Identifizierung von Transglutaminase-absondernden Stämmen, die zu Oomyceten gehören.

[0093] Die Oomyceten wurden durch Ausschneiden von 4–8 kleinen Stücken von Pilzgeflecht (5 mm × 5 mm) aus PDA Platten (39 g/l Kartoffeldextrose-Agar) in Schüttelflaschen eingeimpft. Die Schüttelflaschen enthalten entweder SFM-4 (4 g/l Fleischextrakt, 4 g/l Hefeextrakt, 40 g/l Glucose, 8 g/l Trypton, 0.001 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 Tabletten/l EBIOS, pH 7.0), ½BPX (Kartoffelmehl 25 g/l, Gerstenmehl 12.5 g/l, BAN 800 MG 0.013 g/l, Na-Kasein 2.5 g/l, Sojamehl 5 g/l, Na_2HPO_4 2,25 g/l, Pluronic 0.025 ml/l) oder FG-4 (Sojamehl 30 g/l, Maltodextrin 15 g/l, Bacto Pepton 5 g/l, Pluronic 0.2 g/l) Medium. Die Kulturen wurden bei 26 °C für 5–7 Tage unter Schütteln kultiviert. Die resultierenden Kulturbrühen wurden 10 Minuten bei 2300 g zentrifugiert, um zellfreie Kulturbrühen (Transglutaminase-Zubereitungen) zu erhalten.

[0094] Transglutaminasen wurden in zellfreien Kulturbrühen von einigen Oomyceten unter Verwendung der unten detailliert beschriebenen Test identifiziert. Es war nicht möglich, diese Transglutaminase-Aktivitäten unter Verwendung des Hydroxamat-Tests (Folk & Cole) wie von anderen für die Suche nach mikrobiellen Transglutaminasen (EP 0 481504 A1) beschrieben, zu detektieren.

[0095] Der verwendete Test ist eine leicht abgeänderte Version der Originalmethode (Curtis & Lorand). Die Transglutaminase-Aktivität wird als Einlagerung von [1,4-^{14}C]Putrescin in α-Kasein gemessen. Es wurde entdeckt, dass die Detektionsgrenze des C14-Putrescin-Einlagerungstest 1/20 der Detektionsgrenze des Hydroxamat-Tests.

[0096] Zu 20 µl zellfreier Kulturbrühe werden 5 µl [1,4-^{14}C]Putrescin (1,85 MBq/ml in 2% wässrigen Ethanol, spezifische Aktivität 4,22 GBq/mmol) und 20 µl α-Kasein (2% in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5) hinzugefügt. Inkubiert wurde für 2 Stunden Raumtemperatur, gefolgt von dem Auftragen von 30 µl der Testmischung auf einen kleinen runden Whatman 3MM Filter. Der Filter wird sofort in einen Korb gelegt, der in kalter 10%ige Trichloressigsäure untergetaucht wird, und für 20 Minuten gewaschen und den Überschuss an Radioaktivität zu entfernen. Nach diesem ersten Waschgang werden die Filter dreimal mit kalter 5%iger Trichloressigsäure gewaschen, einmal mit kaltem Ethanol: Aceton (50 : 50, V : V) und einmal mit kalten Aceton. Jeder dieser Waschschritte dauert 5 Minuten. In allen Waschschritten sollte die Menge an Waschflüssigkeit mindestens 5 ml/Filter sein. Die gewaschenen Filter werden direkt in Szintilationsröhrchen gezählt.

[0097] Tabelle 1 zeigt Beispiele von Spezies die zu Oomyceten gehören, die bei Kultivierung Transglutaminase in das Wachstumsmedium absondern, und die bestimmten Enzymaktivitäten werden als Einheiten von Transglutaminaseaktivität gezeigt.

Tabelle 1

Nr.	Genus	Spezies	Einheiten/ml	Medium
CBS 701.95	Pythium	irregulare	0,35	SFM-4
CBS 702.95	Pythium	21	2,5	1/2 BPX
CBS 703.95	Pythium	intermedium	0,83	SFM-4
CBS 704.95	Pythium	sp.	1,5	1/2 BPX
	Pythium	torulosum	0,72	1/2 BPX
CBS 705.95	Pythium	ultimum	0,38	SFM-4
	Pythium	aphanidermatum	0,37	SFM-4
CBS 618.94	Phytophthora	cactorum	28,3	SFM-4
	Phytophthora	palmivora	5,6	SFM-4
	Phytophthora	cinnamomi	4,9	SFM-4
CBS 651.94	Phytophthora	cryptogea	10,0	FG-4

[0098] Einheiten: Als 1 U wird die Enzymaktivität definiert, die 1 nmol [^{14}C]-putrescin pro Stunde einlagert.

BEISPIEL 2

Kaseinpolymerisation

[0099] Die Fähigkeit der in der Kulturbrühe von Phytophthora cactorum vorliegenden Transglutaminase, ein α-Kasein zu polymerisieren, wurde unter Verwendung einer SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.
[0100] Zu 20 µl Phythophthora cactorum Kulturbrühe wurden 20 µl 1,5%-iges α-Kasein in 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5, zugegeben. Die Mischung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Kontrollproben, bei denen die Kulturbrühe oder das α-Kasein mit Wasser ersetzt wurden, wurden gleichzeitig inkubiert.
[0101] SDS-PAGE von 10 µl von jeder der drei Proben zeigte deutlich, dass nur die Phytophthora cactorum Kulturbrühe das α-Kasein in hochmolekulare Polymere umsetzte.

BEISPIEL 3

Aktivitätsabhängigkeit in der Anwesenheit von Cystein oder Ca^{2+}-Ionen bei verschiedenen Temperaturen

[0102] Der Effekt von reduzierenden Reagenzien wie z. B. Cysteine und Ca^{2+}-Ionen auf die Transglutaminaseaktivität bei verschiedenen Temperaturen wurde unter Verwendung einer Abänderung des in Beispiel 1 beschriebenen Putrescin-Rests untersucht.
[0103] Die Transglutaminasezubereitungen wurden unter Verwendung eines Macrosep™-Konzentrators von Filtron ungefähr 10-fach konzentriert. Die folgenden der Proben wurden 10-fach verdünnt in entweder:
(a) 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5;
(b) 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM Cystein, pH 7,5;
(c) 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7,5; oder
(d) 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM Cystein, 5 mM $CaCl_2$, pH 7,5.

[0104] Zur Aktivitätsbestimmung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur, 40°C bzw. 55°C inkubiert.
[0105] Die unten aufgeführten Tabellen zeigen die Aktivitätsabhängigkeiten der verschiedenen Parameter. Die Enzymaktivitäten sind in relativen Aktivitäten angegeben. Die Aktivität, die in Puffer + EDTA bei Raumtemperatur erhalten wird, wird auf 100 gesetzt. Die Aktivität der Transglutaminase ist von Calcium abhängig und in den meisten Fällen wird die in der Kulturbrühe gemessene Aktivität durch die Anwesenheit von Cystein wei-

ter erhöht.

Stamm: Phythophthora cactorum, CGS 618.4

	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5			
Temperatur	2 mM EDTA	2 mM EDTA + 1 mM Cys	+ 5 mM Ca^{2+}	+ 1 mM Cys + 5 mM Ca^{2+}
Raumtemp.	100	125	986	991
40 °C	68	85	1954	2350
55 °C	70	58	1073	829

Stamm: Phytophthora cryptogea, CBS 651.94

	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5			
Temperatur	2 mM EDTA	2 mM EDTA + 1 mM Cys	+ 5 mM Ca^{2+}	+ 1 mM Cys + 5 mM Ca^{2+}
Raumtemp.	100	115	1267	2527
40 °C	69	69	4372	7423
55 °C	78	143	3865	5518

Stamm: Pythium sp., CBS 702.95

	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5			
Temperatur	2 mM EDTA	2 mM EDTA + 1 mM Cys	+ 5 mM Ca^{2+}	+ 1 mM Cys + 5 mM Ca^{2+}
Raumtemp.	100	57	487	991
40 °C	0	0	3216	5773
55 °C	100	96	4191	5896

Stamm: Pathium irregulare, CBS 701.95

	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5			
Temperatur	2 mM EDTA	2 mM EDTA + 1 mM Cys	+ 5 mM Ca^{2+}	+ 1 mM Cys + 5 mM Ca^{2+}
Raumtemp.	100	110	87	86
40 °C	167	168	462	450
55 °C	50	43	130	114

Stamm: Pythium ultimum, CBS 705.95

	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5			
Temperatur	2 mM EDTA	2 mM EDTA + 1 mM Cys	+ 5 mM Ca^{2+}	+ 1 mM Cys + 5 mM Ca^{2+}
Raumtemp.	100	93	107	141
40 °C	142	164	416	483
55 °C	15	22	89	88

Stamm: Pythium intermedium, CBS 803.95

	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5			
Temperatur	2 mM EDTA	2 mM EDTA + 1 mM Cys	+ 5 mM Ca^{2+}	+ 1 mM Cys + 5 mM Ca^{2+}
Raumtemp.	100	138	459	2438
40 °C	129	142	3872	6117
55 °C	181	180	733	1716

BEISPIEL 4

pH-Abhängigkeit von Oomyceten-Transglutaminasen

[0106] Die pH-Abhängigkeit der in der vorliegenden Transglutaminasezubereitung von Pythium irregulare (CBS 701.95), Pythium sp. (CBS 702.95), Pythium intermedium (CBs 703.95), Pythium sp. (CBS 704.95), Pythium ultimum (CBS 705.95), Phytophthora cactorum (CBS 618.94/IFO 30474) und Phytophthora cryptogea (CBS 651.94) wurde unter Verwendung eines in Beispiel 1 beschriebenen abgeänderten Putrescintests untersucht.

[0107] Eine 4%-ige α-Kasein-Lösung wurde in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 1 mM Cystein, pH 7,5, hergestellt, und 1 : 1 in einem abgeänderten 200 mM Britton-Robinson-Puffer (0,1 M CH_3COOH, 0,2 M H_3BO_3) zu den unten erwähnten pH-Werten verdünnt.

[0108] Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur bei pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 bzw. 9,0 inkubiert.

[0109] Die unten aufgeführte Tabelle zeigt die pH-Abhängigkeiten der Oomyceten-Transglutaminasen. Die angegebenen Enzymaktivitäten sind relative Aktivitäten.

	pH						
Stämme	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Pythium irregulare, CBS 701.95	20	24	36	46	62	100	46
Pythium sp., CBS 702.95	9	16	27	31	48	93	100
Pythium intermedium, CBS 703.95	63	90	99	100	95	54	25
Pythium sp., CBS 704.95	23	33	41	72	95	100	78

Pythium ultimum, CBS 705.95	28	62	68	68	100	93	69
Phytophthora cactorum, CBS 618.94	28	38	46	59	74	100	92
Phytophthora cryptogea, CBS 651.94	63	78	86	100	99	93	56

BEISPIEL 5

Klonierung und Expression einer Transglutaminase aus Phytophthora cactorum, CBS 618.94 und IFO 30474

[0110] mRNA wurde aus Phytophthora cactorum, CBS 618.94 und IFO 30474, hochgezogen in SFM-4 Fermentationsmedium unter Bewegung, um genügend Belüftung sicherzustellen, isoliert. Nach 3 bis 5 Tagen Wachstum wurden Pilzgeflechte geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80°C gelagert. Eine aus ungefähr 9×10^5 einzelnen Klonen bestehende Bibliothek von P. cactorum, CBS 618.94 oder IFO 30474 wurde wie beschrieben in E. coli mit einem Vektorhintergrund von 1% konstruiert. Plasmid-DNA aus einigen der Reservoirs wurde in Hefe transformiert, und 50–100 250–400 Hefekolonien enthaltende Platten wurden aus jedem Reservoir erhalten.
[0111] Transglutaminase-positive Klone wurden mit dem 5-(Biotinamido)-pentylamin-Test identifiziert und auf Agarplatten isoliert. cDNA-Einsätze wurden direkt aus den Hefekolonien amplifiziert und wie in dem obigen Material- und Methodenteil beschrieben, charakterisiert. Die DNA-Sequenz der die Transglutaminase kodierende cDNA ist in SEQ ID Nr. 1 gezeigt, und die entsprechende Aminosäuresequenz ist in SEQ ID Nr. 2 gezeigt.
[0112] Die cDNA kann aus dem Plasmid in DSM 10256 erhalten werden.
[0113] Gesamt-DNA wurde aus einer Hefekolonie isoliert und Plasmid-DNA wurde durch Transformation von E. coli, wie oben beschrieben, wiedergewonnen. Um die Transglutaminase in Aspergillus zu exprimieren, wurde die DNA mit HindI-II/XbaII verdaut, der Größe nach auf Gel aufgetrennt, und ein das dem Transglutaminase-Gen entsprechende Fragment wurde aufgereinigt. Das Gen wurde anschließend mit einem HindIII/XbaII verdautem pHD414 legiert, resultierend in dem Plasmid pA2TG3.
[0114] Nach der Amplifizierung der DNA in E. coli wurde das Plasmid wie oben beschrieben in Aspergillus oryzae transformiert.

Test der A. oryzae-Transformanden

[0115] Jede der Transformanden wurde wie oben beschrieben auf Enzymzktivität beschrieben. Einige der Transformanden zeigten eine Transglutaminase-Aktivität, die signifikant höher war als der Aspergillus oryzae-Hintergrund. Das zeigt die effiziente Expression der Transglutaminase in Aspergillus oryzae an.

Fed-Batch-Fermentation

[0116] Fermentationen wurden als Fed-Batch-Prozesse ausgeführt, mit Maltosesirup als Kohlenstoffquelle und Ammoniak als Stickstoffquelle. Die Batch-Phase wurde bei pH 6,5 ausgeführt und der pH wurde während der Fed-Batch-Phase auf 7,5 angehoben. Die Temperatur wurde während des gesamten Prozesses auf 34°C gehalten.

BEISPIEL 6

Herstellung der Transglutaminase aus Phytophthora cactorum, CBS 918.94 /IFO 60474

[0117] Phytophthora cactorum, CBS 618.94/IFO 30474 wurde in 8 l SFM-4-Medium eingeimpft und unter Schütteln bei 26°C für 7 Tage kultiviert. Die resultierende Kulturbrühe wurde durch Miracloth filtriert, um 5 l Kulturfiltrat zu geben. Die Transglutaminase-Aktivität in dem Kulturfiltrat war 22 Units/ml.

BEISPIEL 7

Aufreinigung und Charakterisierung von nativer und rekombinanter Phytophtora cactorum-Transglutaminase.

[0118] Transglutaminase-Aktivität gemessen mit Putrescin-Rest: Der Putrescin-Rest wurde im Prinzip gemäß Lorand et al. durchgeführt.
[0119] Die Reaktionsmischung enthält: 2 µmol $CaCl_2$, 1 µmol Cystein, 75 nmol [^{14}C]-Putrescin (4,03 GBq/mmol; Amersham), 0,7 mg α-Kasein und 0,6 µg Transglutaminase, mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,9, auf 1 ml aufgefüllt. Die Inkubationen wurden bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Aliquots von 30 µl wurden nach 60 min Inkubation weggenommen und auf Whatman-3-MM-Filtern (D = 2 cm) gespritzt. Die Filter wurden sofort in einen Korb gegeben, in eiskaltes 10% TCA untergetaucht und für 20 min gewaschen. Nach dem ersten Waschschritt wurden die Filter 3 × mit eiskaltem 5%-igen TCA gewaschen und 2 × mit eiskaltem Aceton. Bei jedem Waschschritt sollten mindestens 5 ml Waschlösung pro Filter sein. Die Filter wurden getrocknet, in Zählröhrchen, die 8 ml Szintillationsflüssigkeit (Optiphase, Wallac) enthalten, gegeben, und die Radioaktivität wurde in einem Packard Tri-Carb-Flüssigszintillationsspektrometer gemessen. Jede Bestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt.

Teilweise Aufreinigung der nativen P. cactorum Transglutaminase

[0120] Die Kulturbrühe wurde keimfiltriert und 5-fach angereichert durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Filtron-Minisette-Membran mit einem Cut-Off von 10 kDa. Nach Dialyse gegen 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, durchlief die Probe eine Q-Sepharosesäule, equilibriert mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die Transglutaminase wurde aus der Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M Natriumchlorid eluiert. Fraktionen mit Transglutaminase-Aktivität (Putrescin-Test) wurden zusammengefasst und in einer Amicon-Zelle, ausgestattet mit einer 10 kDA Diaflo-Membran, konzentriert. Diese Zubereitung von nativer Transglutaminase war nur teilweise rein.

Aufreinigung, spezifische Aktivität und N-terminales Sequenzieren von rekombinanter P. cactorum-Transglutaminase

[0121] Die Aspergillus oryzae-Kulturbrühe wurde Keim-filtriert und durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Filtron-Minisette-Membran mit einem Cut-Off bei 10 kDa 5-fach konzentriert. Nach Dialyse gegen 50 mM Natriumborat, pH 8,0, durchlief die Probe eine Q-Sepharosesäule, equilibriert mit 50 mM Natriumborat, pH 8,0. Die Transglutaminase wurde aus der Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M Natriumchlorid eluiert. Fraktionen, die Kasein gelieren, wurden zusammengefasst und in einer Amicon-Zelle, ausgestattet mit einer 10 kDa Diaflo-Membran, aufkonzentriert.
[0122] In Aspergillus oryzae wird die rekombinante Transglutaminase in zwei Formen hergestellt, und auf Grund von SDS-PAGE konnten die Molekulargewichte auf 57 kDa, bzw. 43 kDa geschätzt werden. Das Verhältnis zwischen den beiden Formen ist abhängig von der Fermentationszeit. Früh in der Fermentation dominiert die 57-kDa-Form, aber diese Form wird während der Fermentation zu der niedrigmolekularen Form prozessiert. Beide Formen der Transglutaminase sind katalytisch aktiv, die spezifische Aktivität der rekombinanten Transglutaminase wurde im Putrescin-Test bestimmt, und es wurde entdeckt, dass sie 3.000 U/mg ist.
[0123] N-terminale Aminosäuresequenzierung der beiden Formen der Transglutaminase zeigte, dass die 57-kDa-Form einen blockierten N-Terminus hat und dass die 43-kDa-Form bei Leu168 beginnt, vgl. SEQ ID Nr. 2.

Der Einfluss von Calcium und Cystein auf die Aktivität der rekombinanen P. cactorum-Transglutaminase

[0124] Der Effekt von Calcium und Cystein (benutzt als ein reduzierendes Agens) wurde in dem Putrescin-Test untersucht. Die unten dargestellten Ergebnisse sind als relative Aktivitäten wiedergegeben. Die Aktivität, die in einem Puffer bei 25°C erhalten wird, wird auf 100 gesetzt.
[0125] Die Aktivität der Transglutaminase ist von Calcium abhängig, und die Aktivität ist durch die Anwesenheit von Cystein als reduzierendes Agens nicht weiter erhöht.

Temp.(°C)	Puffer	2 mM EDTA	1 mM Cys	2 mM Ca^{2+}	1 mM Cys 2 mM Ca^{2+}
25	100	15	180	270	280
30	105	10	210	430	490
40	30	10	75	750	780
55	10	5	75	350	350

Der Einfluss von Calcium und Cystein auf die Gelbildung von Kasein durch P. cactorum-Transglutaminase

[0126] Der Einfluss von Calcium und Cystein auf die Gelbildung von Kasein wurde wie unten beschrieben untersucht.

[0127] Die Gelbildungsmischung enthielt 80 mg Hammarsten-Kasein, 2 µmol Calcium, 1 µmol Cystein, und ungefähr 0,03 mg Transglutaminase, aufgefüllt auf 1 ml mit 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5. Inkubation über Nacht bei 37°C folgend, wurden die Proben auf Umgebungstemperatur temperiert, und die Gelbildung wurde durch visuelle Inspektion beurteilt.

[0128] Beide, native und rekombinante Transglutaminase, sind in der Lage, Kasein zu gelieren. Im Gegensatz zu dem nativen Enzym, ist es für das rekombinante Enzym nicht essentiell, dass Cystein als reduzierendes Agens anwesend ist.

	Puffer	1 mM Cys	2 mM Ca^{2+}	1 mM Cys+ 2 mM Ca^{2+}
Rekombinantes P. cactorum	˙-	-	¨+	+
Natives P. cactorum#	-	-	-	+

˙ - bezeichnet nicht-sichtbare Gelbildung

¨ + bezeichnet die Bildung eines stabilen Gels

teilweise gereinigt

Temperaturprofil der P. cactorum-Transglutaminase

[0129] Das Temperaturprofil wurde unter Verwendung des Putrescin-Rests mit 0,1 M Natriumborat/Acetatpuffer pH 7,9, anstelle von 0,1 M Tris-HCl, pH 7,9, bestimmt.

[0130] Wie aus der Tabelle ersehen werden kann, liegt das Temperaturoptimum für beide, die native und die rekombinante Transglutaminase, bei 45°C.

Temp. (°C)	Natives P. cactorum# Relative Aktivität (%)	Rekomb. P. cactorum Relative Aktivität (%)
25	20	30
30	40	50
35	60	60
40	85	75
45	100	100

50	75	85
55	15	25

teilweise gereinigt.

[0131] pH-Profil von rekombinanter P. cactorum Transglutaminase.
[0132] Das pH-Profil wurde unter Verwendung des Putrescin-Tests mit 0,1 M Natriumborat/Acetatpuffer bestimmt.
[0133] Es wurde entdeckt, dass das pH-Optimum der rekombinanten Phytophthora cactorum-Transglutaminase bei pH 8,5 liegt.

pH	Rekombinantes P. cactorum Relative Aktivität (%)
6,5	10
7,0	15
7,5	35
8,0	45
8,5	100
9,0	85
9,5	80

sichtbare Präzipitate in dem Substrat

BEISPIEL 8

Vernetzung von Natriumkaseinat in Lösung, gemessen durch den Viskositätsanstieg als Funktion der Zeit

[0134] Eine 9%-ige Proteinlösung aus Natriumkaseinat (Miprodan 30, MD Foods, Denmark, 87,8% Protein) wurde hergestellt. Calciumchlorid wurde in der Lösung zu einer Konzentration von 5 mM gelöst und der pH wurde auf 7,0 unter Verwendung von NaOH eingestellt. Die Lösung wurde auf 40°C erhitzt.
[0135] Ein Haake-Viskosimeter, VT 501 (Haake Mess-Technik GmbH, Deutschland), wurde für Viskositätsmessungen bei 40°C durch Sensorsystem MV1 im Drehzahlbereich H, Geschwindigkeit 3, vorbereitet.
[0136] Zu der Proteinlösung wurde rekombinante Phytophtora-cactorum-Transglutaminase, vgl. Beispiel 7, hinzugefügt, aufgereinigt zu Elektrophoresereinheit bis zu einer Dosierung von 0,08% (Gewicht des Enzyms/Gewicht des Proteins). Die Lösung wurde sofort zu dem Viskosimeter zur Messung überführt. Anschließend wurde die Viskosität einer Kontrolllösung ohne Enzym gemessen.

Ergebnisse: Viskosität (mPa*s) als Funktion der Zeit:

Zeit (Minuten)	Kaseinatlösung + Enzym	Kontrolle
2,66	17,5	21
7,33	25,4	22,8
12	36,9	27,2
24	88,6	35
36	186,9	41,1
48	355,3	47,3
60	800,2	50,7

[0137] Anschließend erstarrt die Kaseinlösung mit Enzym innerhalb weniger Minuten zu einem Gel, wohingegen die Viskosität der Kontrolle bei 53 mPa*s für 120 Minuten konstant bleibt.

BEISPIEL 9

Transglutaminase zur Gluten-Verfestigung

[0138] Der Verfestigungseffekt eines gegebenen Teigverbesserers auf Weizenteigmehl oder Glutenteig kann durch dynamische rheologische Messungen gemessen werden. Diese Messungen sind in der Lage, die Stärke eines Teiges unter Oszillation zu zeigen. Sowohl Weizenmehlteig als auch Glutenteig sind viskoelastische Materialien. In oszillatorischen Messungen können die viskoelastischen Eigenschaften eines Weizenteiges und eines Glutenteiges in zwei Bestandteile geteilt werden, der dynamische Scherspeicher Modul G' und der dynamische Scherverlust Modul G". Das Verhältnis der Verlust- und der Speichermoduli ist numerisch der Tangente des viskoelastischen Phasenwinkels δ gleich. Ein Anstieg in dem Speichermodul G' und ein Abfall in dem Phasenwinkel δ zeigt einen stärkeren und mehr elastischen Teig an.
[0139] Der dynamische Scherspeichermodul G' und der viskoelastische Phasenwinkel δ wurden in den Gluten von drei Teigen, die mit der in Beispiel 6 beschriebenen rekombinanten Transglutaminase in zwei Dosierungen, z. B. 4 mg bzw. 10 mg, behandelt wurden, gemessen. Die Transglutaminase wurde zu dem Mehl vor dem Teigmischen zugegeben. Das Gluten wurde aus dem Teigmehl, das den Verbesserer enthält, ausgewaschen, nachdem das Teigmehl bei 32°C für eineinhalb Stunden inkubiert worden war. Die Ergebnisse der Tests sind in der Tabelle unten gezeigt, wo die gemessenen Werte von G' und δ, resultierend aus dem Einschluss von 4 mg bzw. 10 mg Enzym pro kg Mehl, als Indexwerte relativ zu dem Kontrollteig (Index 100) mit keinem Transglutaminase-Einschluss gezeigt werden.

Dosierung der Transglutaminase	G'-Index	δ-Index
4 mg	135	117
10 mg	167	131

[0140] Aus den Ergebnissen kann es überraschenderweise ersehen werden, dass der Speichermodul G' signifikant höher ist, wenn Transglutaminase in dem Teig vorhanden ist, verglichen mit der Kontrolle ohne dem Enzym. Das zeigt an, dass das Gluten, und somit auch der Teig, durch die Aktion des Enzyms signifikant verfestigt werden.
[0141] Ferner ist gezeigt, dass der viskoelastische Phasenwinkel δ relativ zu der Kontrlle erniedrigt ist, wenn Transglutaminase in dem Teig vorhanden ist, anzeigend, dass durch die Aktion des Enzyms eine mehr elastische rheologische Eigenschaft des Glutens und somit des Teigs erreicht wird.

IN DER BESCHREIBUNG ZITIERTE REFERENZEN:

Washizu et al., Bioscience, Biotechnology and Biochemistry vol. 58, 1994, pages 82–87.
Tahekana et al., ibid. Vol. 58, 1994, pages 88–87.

Takagi et al., EP-0 481 504 A1.
Klein et al., J. Bacteriol. Vol. 174, 1992, pages 2599–2605.
Lipman and Pearson, Science 227, 1435 (1985).
Hudson, L., and Hay, F., Practical Immunology, Thid edition (1989), Blackwell Scientific Publications.
Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.
Folk, J. B. & Cole, P. W. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5518–5525.
Curtis, C. G. & Lorand, L. (1976) Methods in Enzymology 45, 177–191.
Lorand, L., Campbell-Wilkes, L. K., and Cooperstein, L. (1972) Anal. Biochem., 50, 623–631.
Newhook, F. J., Waterhouse, G. M., and Stamps, D. J., 1978: Tabular key to the species of Phytophthora De Bary, Mycological Papers No. 109, CAB, Surrey, England.
Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95–107, 1991.
Cunningham and Wells, Science 244, 1081–1085, 1989.
de Vos et al., Science 255: 306–312, 1992.
Smith et al., J. Mol. Biol. 224: 899–904, 1992.
Wlodaver et al., FEBS Lett. 309: 59–64, 1992.
O. Ouchterlony in: Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655–706.
N. Axelsen et al. in: A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973.
A. Johnstone and R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982, pp. 27–31.
Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51–56.
WO 95/02043.
WO 94/14953.
Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463–5467.
Becker and Guarante (1991) Methods Enzymol. 194: 182–187.
Gubler and Hoffman (1983) Gene 25: 263–269.
Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132, 6–13.

AUFLISTEN DER SEQUENZEN

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) Antragsteller:
- (A) Name: Novo Nordisk A/S
- (B) Strasse: Novo Alle
- (C) Stadt: DK-2880 Bagsvaerd
- (E) Land: Dänemark
- (F) Postleitzahl (PLZ): DK-2880
- (G) Telefon: +45 44 44 88 88
- (H) Telefax: +45 44 49 32 56
- (I) Telex: 37304

(ii) Titel der Erfindung: Titel

(iii) Anzahl der Sequenzen: 2

(iv) Computerlesbare Form:
- (A) Art des Mediums: Floppy disk
- (B) Computer: IBM PC-kompatibel
- (C) Betriebssystem: PC-DOS /MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 1:

(i) Sequenzeigenschaften:
- (A) Länge: 1901 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: einzel
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(vi) Originalquelle:
- (A) Organismus: Phytophtora cactorum
- (B) Stamm: CBS 618.94

(ix) Eigenschaft:
- (A) Name /Schlüssel: CDS
- (B) Ort: 46..1765

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 1:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

```
CGACATCGAG AAGATTACAA ACTCATTGTT GCAGGTTTCA CAACC ATG GTC TAC     54
                                                  Met Val Tyr
                                                    1

TCA CCC AGC TCC TAC CTC ATC TCC GCC GCC GTG GCT GCG GTG GCC TTC  102
Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Ile Ser Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Phe
      5                  10                  15

CAG ATT CAG CAA GCG ACT GCC GGA TCG CTG TAC TAC GGG GCG TTC TCC  150
Gln Ile Gln Gln Ala Thr Ala Gly Ser Leu Tyr Tyr Gly Ala Phe Ser
 20                  25                  30                  35

GTG TCC GAC ACG GAT GGC AAA ATC AGC AAC GAC TCT CCT CTT GTC GGT  198
Val Ser Asp Thr Asp Gly Lys Ile Ser Asn Asp Ser Pro Leu Val Gly
                 40                  45                  50

ACC GAA ATT TCC GAC CAG GAC TGC GCC ATC GAG GTG GAG GTC GAC CCG  246
Thr Glu Ile Ser Asp Gln Asp Cys Ala Ile Glu Val Glu Val Asp Pro
             55                  60                  65

ACG CTG CCG GAC ATC ACG ACC ATC TCG ACG GTG CCG GTG ACC TAC CCT  294
Thr Leu Pro Asp Ile Thr Thr Ile Ser Thr Val Pro Val Thr Tyr Pro
         70                  75                  80

GAC CTG CTG GCC AAC TTG ACG ACG GCT CCG TCG GAG CCG GTG TTC TCA  342
Asp Leu Leu Ala Asn Leu Thr Thr Ala Pro Ser Glu Pro Val Phe Ser
     85                  90                  95

AAG GTG GGC ACG GTG ATC ATG TCG GAG GAG ACC CCC GCC ACC GAC GCC  390
Lys Val Gly Thr Val Ile Met Ser Glu Glu Thr Pro Ala Thr Asp Ala
100                 105                 110                 115

GAC CAG GAC GCG TAC ATC GAC TCG ACG CTT CCG TGG ATT GGC ACT GGT  438
Asp Gln Asp Ala Tyr Ile Asp Ser Thr Leu Pro Trp Ile Gly Thr Gly
                120                 125                 130

ACG CCG ACC AAG ACG GGT GTG GAG AAG ACC GCC AAG GAC TGC GCT ACT  486
Thr Pro Thr Lys Thr Gly Val Glu Lys Thr Ala Lys Asp Cys Ala Thr
            135                 140                 145

GGG TGG GAG GAG ACC GCG GCC GGC GAT AAG CTC CAG GAG AAG CTC GAA  534
Gly Trp Glu Glu Thr Ala Ala Gly Asp Lys Leu Gln Glu Lys Leu Glu
        150                 155                 160
```

```
AAG AAG CGT CGC CTG GAG GAA AAC ACG AAC AGG GAT ATC GCT AGG CTC  582
Lys Lys Arg Arg Leu Glu Glu Asn Thr Asn Arg Asp Ile Ala Arg Leu
    165                 170                 175

GAG GCC TAC TTT GGC ACC AAG ATG GAG ATG ACC CTG AAG GAC CTG CCT  630
Glu Ala Tyr Phe Gly Thr Lys Met Glu Met Thr Leu Lys Asp Leu Pro
180                 185                 190                 195

ACC CAG GGT GTC CAC ACA CCG TCG CCG TGG GCT GGA CCG TAC TGG CCG  678
Thr Gln Gly Val His Thr Pro Ser Pro Trp Ala Gly Pro Tyr Trp Pro
                200                 205                 210

ACT TAC CAG GAC AGT ATC AAC GTT GTC TGG AGC GAG GGA GAA GCC AGC  726
Thr Tyr Gln Asp Ser Ile Asn Val Val Trp Ser Glu Gly Glu Ala Ser
            215                 220                 225

CCC GCT GAG AAG TAC GCC AAG GCT TTC GGT CTG GAC GTG ACG GAC TTC  774
Pro Ala Glu Lys Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Leu Asp Val Thr Asp Phe
        230                 235                 240

ATG GAC AAG GTG TCG AAG GAC AAT GCT GTG GAC TCT CAG AGC AAA CGC  822
Met Asp Lys Val Ser Lys Asp Asn Gly Val Asp Ser Gln Ser Lys Arg
    245                 250                 255

AGA CAG TGC CAG ACT GAC GAG GGA TGC GAG TCC CTT AAC AAC GCC AGC  870
Arg Gln Cys Gln Thr Asp Glu Gly Cys Glu Ser Leu Asn Asn Ala Ser
260                 265                 270                 275

AAG TGC GCC ATT CGT GCC GGC AAG ACC TCG GGC TAC TGC ATC CCG ACG  918
Lys Cys Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ser Gly Tyr Cys Ile Pro Thr
                280                 285                 290

TGG TTC GGG ATC TGC CAC GCT TGG GCC CCG GCT GCC ATT CTC GAG GCA  966
Trp Phe Gly Ile Cys His Ala Trp Ala Pro Ala Ala Ile Leu Glu Ala
            295                 300                 305

GAG CCG ACC TGC CCG GTG ACG CAC AAC GGC GTG ACG TTC CAG CCG ATT 1014
Glu Pro Thr Cys Pro Val Thr His Asn Gly Val Thr Phe Gln Pro Ile
        310                 315                 320

GAC ATC AAG GGG CTG ATC TCG GAC GTC TAC GAT GGC GCA GGT GTG GCA 1062
Asp Ile Lys Gly Leu Ile Ser Asp Val Tyr Asp Gly Ala Gly Val Ala
    325                 330                 335
```

```
ACG GTT TTC ACG GGT GCC CGG TAC AAC GGC GGT GAC GAT GCT GCC GAT 1110
Thr Val Phe Thr Gly Ala Arg Tyr Asn Gly Gly Asp Asp Ala Ala Asp
340                 345                 350                 355

GAG TAT GGC CGT CAC ACG AAT GCC GCC TAC CGC GAC CTG AAC CCT GCC 1158
Glu Tyr Gly Arg His Thr Asn Ala Ala Tyr Arg Asp Leu Asn Pro Ala
                360                 365                 370

TAC TTC CAC ATT GCG TCT GCC AAT ATC CTG GGC AAG CTA AAC GCT ACA 1206
Tyr Phe His Ile Ala Ser Ala Asn Ile Leu Gly Lys Leu Asn Ala Thr
            375                 380                 385

TTT GTT GCT GAC GTC GAC GCC GCC GCA GAA GTG TGG AAC CAG CCC GTG 1254
Phe Val Ala Asp Val Asp Ala Ala Ala Glu Val Trp Asn Gln Pro Val
        390                 395                 400

CGC GGT TTC AAG GTG TTC GAG CAG ACC GCC ATG TCG CTC GAG GAG GCC 1302
Arg Gly Phe Lys Val Phe Glu Gln Thr Ala Met Ser Leu Glu Glu Ala
    405                 410                 415

GCT CAG ACC TTC TAC GGC CTT GAG GAG TAC CCG TGG AAT GCC GCC GCC 1350
Ala Gln Thr Phe Tyr Gly Leu Glu Glu Tyr Pro Trp Asn Ala Ala Ala
420                 425                 430                 435

AAG AGC ATT GTG TAC GTC AAG TCG CGT CTC TCG TGG ATC TTC GAG ACG 1398
Lys Ser Ile Val Tyr Val Lys Ser Arg Leu Ser Trp Ile Phe Glu Thr
                440                 445                 450

TAC ACC GAC GGT GGC CTG GTG GCC TCG GGT GAG ATC AAC CGA TAC ACA 1446
Tyr Thr Asp Gly Gly Leu Val Ala Ser Gly Glu Ile Asn Arg Tyr Thr
            455                 460                 465

ACG GGC AAG TAC TAC TAC TAC CTT CTG GAG CTG GAC GAT GCT GGT GAG 1494
Thr Gly Lys Tyr Tyr Tyr Tyr Leu Leu Glu Leu Asp Asp Ala Gly Glu
        470                 475                 480

ATC ATT GGC GGT GAG TGG GTT TAC GAT TCG GAC AGC GAC CAC CCT GAC 1542
Ile Ile Gly Gly Glu Trp Val Tyr Asp Ser Asp Ser Asp His Pro Asp
    485                 490                 495

TTC CTG TGG GTG CCC AAG GCG AAG CCT GCT GCG GAC ACG GTG ACC AGC 1590
Phe Leu Trp Val Pro Lys Ala Lys Pro Ala Ala Asp Thr Val Thr Ser
500                 505                 510                 515
```

```
ATT GGC CTG AGC TAC GCG GAC GTG AGC ATG CTT CTG GAG AAA TCC GTC 1638
Ile Gly Leu Ser Tyr Ala Asp Val Ser Met Leu Leu Glu Lys Ser Val
                520                 525                 530

GCT TGC TCC GAC TCC ACT TCG GCT GCC GGC TCC GTG TCG TCC GGA TCG 1686
Ala Cys Ser Asp Ser Thr Ser Ala Ala Gly Ser Val Ser Ser Gly Ser
            535                 540                 545

GTG GGT GAG TCC ACG GAG GCG CCT ACG GAA GTG CCC ACG ACG TCG ACG 1734
Val Gly Glu Ser Thr Glu Ala Pro Thr Glu Val Pro Thr Thr Ser Thr
        550                 555                 560

AGT GCT CCC ACT TCT GGC AGT GGC GCG CTG T AAGTATGTCG CAGCTCGTCT 1785
Ser Ala Pro Thr Ser Gly Ser Gly Ala Leu
    565                 570

TCCGTATTTG TCGTTGCACA TGAATGTGTA GCTTCGTTTA GATTGCCAGC          1835
TATTCACAAG AAATGGTTCA AAACATGCAC TAAGTTCAAG TTGTAAAAAA          1885
AAAAAAAAAA AAAAAA      1901
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 2:

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 573 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(C) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR: 2:

```
Met Val Tyr Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Ile Ser Ala Ala Val Ala Ala
  1               5                  10                  15

Val Ala Phe Gln Ile Gln Gln Ala Thr Ala Gly Ser Leu Tyr Tyr Gly
             20                  25                  30

Ala Phe Ser Val Ser Asp Thr Asp Gly Lys Ile Ser Asn Asp Ser Pro
         35                  40                  45

Leu Val Gly Thr Glu Ile Ser Asp Gln Asp Cys Ala Ile Glu Val Glu
     50                  55                  60

Val Asp Pro Thr Leu Pro Asp Ile Thr Thr Ile Ser Thr Val Pro Val
 65                  70                  75                  80

Thr Tyr Pro Asp Leu Leu Ala Asn Leu Thr Thr Ala Pro Ser Glu Pro
                 85                  90                  95
```

```
Val Phe Ser Lys Val Gly Thr Val Ile Met Ser Glu Glu Thr Pro Ala
            100                 105                 110

Thr Asp Ala Asp Gln Asp Ala Tyr Ile Asp Ser Thr Leu Pro Trp Ile
        115                 120                 125

Gly Thr Gly Thr Pro Thr Lys Thr Gly Val Glu Lys Thr Ala Lys Asp
    130                 135                 140

Cys Ala Thr Gly Trp Glu Glu Thr Ala Ala Gly Asp Lys Leu Gln Glu
145                 150                 155                 160

Lys Leu Glu Lys Lys Arg Arg Leu Glu Glu Asn Thr Asn Arg Asp Ile
                165                 170                 175

Ala Arg Leu Glu Ala Tyr Phe Gly Thr Lys Met Glu Met Thr Leu Lys
            180                 185                 190

Asp Leu Pro Thr Gln Gly Val His Thr Pro Ser Pro Trp Ala Gly Pro
        195                 200                 205

Tyr Trp Pro Thr Tyr Gln Asp Ser Ile Asn Val Val Trp Ser Glu Gly
    210                 215                 220

Glu Ala Ser Pro Ala Glu Lys Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Leu Asp Val
225                 230                 235                 240

Thr Asp Phe Met Asp Lys Val Ser Lys Asp Asn Gly Val Asp Ser Gln
                245                 250                 255

Ser Lys Arg Arg Gln Cys Gln Thr Asp Glu Gly Cys Glu Ser Leu Asn
            260                 265                 270

Asn Ala Ser Lys Cys Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ser Gly Tyr Cys
        275                 280                 285

Ile Pro Thr Trp Phe Gly Ile Cys His Ala Trp Ala Pro Ala Ala Ile
    290                 295                 300

Leu Glu Ala Glu Pro Thr Cys Pro Val Thr His Asn Gly Val Thr Phe
305                 310                 315                 320

Gln Pro Ile Asp Ile Lys Gly Leu Ile Ser Asp Val Tyr Asp Gly Ala
                325                 330                 335
```

```
Gly Val Ala Thr Val Phe Thr Gly Ala Arg Tyr Asn Gly Gly Asp Asp
            340                 345                 350

Ala Ala Asp Glu Tyr Gly Arg His Thr Asn Ala Ala Tyr Arg Asp Leu
        355                 360                 365

Asn Pro Ala Tyr Phe His Ile Ala Ser Ala Asn Ile Leu Gly Lys Leu
    370                 375                 380

Asn Ala Thr Phe Val Ala Asp Val Asp Ala Ala Ala Glu Val Trp Asn
385                 390                 395                 400

Gln Pro Val Arg Gly Phe Lys Val Phe Glu Gln Thr Ala Met Ser Leu
                405                 410                 415

Glu Glu Ala Ala Gln Thr Phe Tyr Gly Leu Glu Glu Tyr Pro Trp Asn
            420                 425                 430

Ala Ala Ala Lys Ser Ile Val Tyr Val Lys Ser Arg Leu Ser Trp Ile
        435                 440                 445

Phe Glu Thr Tyr Thr Asp Gly Gly Leu Val Ala Ser Gly Glu Ile Asn
    450                 455                 460

Arg Tyr Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Tyr Tyr Leu Leu Glu Leu Asp Asp
465                 470                 475                 480

Ala Gly Glu Ile Ile Gly Gly Glu Trp Val Tyr Asp Ser Asp Ser Asp
                485                 490                 495

His Pro Asp Phe Leu Trp Val Pro Lys Ala Lys Pro Ala Ala Asp Thr
            500                 505                 510

Val Thr Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Ala Asp Val Ser Met Leu Leu Glu
        515                 520                 525

Lys Ser Val Ala Cys Ser Asp Ser Thr Ser Ala Ala Gly Ser Val Ser
    530                 535                 540

Ser Gly Ser Val Gly Glu Ser Thr Glu Ala Pro Thr Glu Val Pro Thr
545                 550                 555                 560

Thr Ser Thr Ser Ala Pro Thr Ser Gly Ser Gly Ala Leu
                565                 570
```

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 4, Linie 17 - 18.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland	
Datum der Ablage 18. September 1995	Zugangsnummer DSM 10256
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 30 - 31.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 19. Oktober 1995	Zugangsnummer CBS 705.95
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 30.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 19. Oktober 1995	Zugangsnummer CBS 704.95
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 29 - 30.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 19. Oktober 1995	Zugangsnummer CBS 703.95
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 29.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 19. Oktober 1995	Zugangsnummer CBS 702.95
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 28 - 29.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 19. Oktober 1995	Zugangsnummer CBS 701.95
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 27.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 27. Dezember 1994	Zugangsnummer CBS 651.94
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 27 - 28.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 20. Dezember 1994	Zugangsnummer CBS 620.94
F. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
G. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
H. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

ANGABEN, DIE SICH AUF EINEN ABGELEGTEN MIKROORGANISMUS BEZIEHEN (PCT-Richtlinie 13bis)

A. Die unten gemachten Angaben beziehen sich auf den in der Beschreibung genannten Mikroorganismus auf Seite 3, Linie 26.	
B. KENNZEICHNUNG DER ABLAGE	Weitere Ablagen sind auf einem zusätzlichen Blatt Papier beschrieben ☐
Name der Hinterlegungsstelle CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Adresse der Hinterlegungsstelle (*einschließlich Postleitzahl und Land*) Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn, Niederlande	
Datum der Ablage 20. Dezember 1994	Zugangsnummer CBS 618.94
C. ZUSÄTZLICHE ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	Diese Information kann auf einem zusätzlichen Papierbogen fortgesetzt werden ☐
Bezüglich solcher Benennungen, in denen ein europäisches und/oder australisches Patent erstrebt wird, ist während des Schwebens des Patentantrags nur einem unabhängigen Experten, der von der Person, die die Probe anfordert, benannt wird, eine Probe zur Verfügung zu stellen (Richtlinie 28(4) EPC /Anordnung 3,25 der Gesetzlichen Australischen Richtlinien 1991 Nr. 71).	
D. BENANNTE STAATEN, FÜR DIE DIE ANGABEN GEMACHT WURDEN (*falls die Angaben nicht für alle benannten Staaten sind*)	
E. SEPARATER EINTRAG VON ANGABEN (*freizulassen, falls keine Angabe*)	
Die unten aufgeführten Angaben werden später dem Internationalen Büro übermittelt (*Spezifizieren der allgemeinen Art der Angaben, z. B. „Zugangsnummer der Ablage"*)	

Nur für empfangenden Beamten	Nur für internationalen Bürogebrauch
☒ Dieser Bogen Papier wurde mit der internationalen Anwendung erhalten	☐ Dieser Bogen Papier wurde vom Internationalen Büro erhalten am:
Bevollmächtigter Beamter	Bevollmächtigter Beamter

Patentansprüche

1. Verfahren für die Herstellung einer Transglutaminasezubereitung, umfassend: Kultivieren eines Stammes, welcher der Klasse Oomyceten angehört, und Zubereiten einer zell-freien Kulturbrühe.

2. Verfahren nach Anspruch 1, in welchem die Transglutaminasezubereitung eine Transglutaminase als Einzelkomponente umfasst, im Wesentlichen frei von anderen Enzymkomponenten.

3. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 2, in welchem der Stamm einer Ordnung angehört, ausgewählt aus Peronosporales, Saprolegniales, Leptomitales, Lagenidiales.

4. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Peronosporales zu einer Familie gehört, ausgewählt aus Pythiaceae, Peronophytophthoraceae, Albuginaceae, Peronosporaceae.

5. Verfahren nach Anspruch 4, in welchem der Stamm der Familie Pythiaceae zu einem Genus gehört, ausgewählt aus Phythium und Phytophthora.

6. Verfahren nach Anspruch 1, in welchem der Stamm einer Spezies angehört, ausgewählt aus Pythium sp., Pythium irregulare, Pythium dissotocu, Pythium periilum (oder P. periplocum), Pythium periilum (oder P. periplocum), Pythium torulosum, Pythium ultimum und Pythium aphanidermatum, vorzugsweise aus der Spezies Pythium irregulare, CBS 701.95, Pythium sp., CBS 702,95, Pythium intermedium, CBS 703.95, Pythium sp., CBS 704.95, oder Pythium ultimum, CBS 705.95.

7. Verfahren nach Anspruch 5, in welchem der Stamm einer Spezies angehört, ausgewählt aus Phytophthora cactorum, Phytophthora palmivora, Phytophtora porri, Phytophthora infestans, Phytophthora megasperma, Phytophthora cinnamomi und Phytophthora cryptogea, vorzugsweise aus der Spezies Phytophthora cactorum, CBS 618.94 oder IFO 30474, oder der Spezies Phytophthora cryptogea, CBS 651.94.

8. Verfahren nach Anspruch 4, in welchem der Stamm der Familie Peronosporaceae dem Genus Plasmopara angehört.

9. Verfahren nach Anspruch 8, in welchem der Stamm der Spezies Plamopara halstedii angehört.

10. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Saprolegniales der Familie Saprolegniaceae angehört.

11. Verfahren nach Anspruch 10, in welchem der Stamm einem Genus angehört, ausgewählt aus Achlya, Saprolegnia und Aphanomyces.

12. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Saprolegniales einer Familie angehört, ausgewählt aus Ectrogellaceae, Haliphothoraceae und Leptolegniellaceae.

13. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Leptomitales der Familie Leptomitaceae angehört.

14. Verfahren nach Anspruch 13, in welchem der Stamm einem Genus angehört, ausgewählt aus Apodachlya und Leptomitus.

15. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Leptomitales der Familie Rhiphidiaceae angehört.

16. Verfahren nach Anspruch 15, in welchem der Stamm einem Genus angehört, ausgewählt aus Aqualinderella und Rhiphidium.

17. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Lagenidiales der Familie Lagenidiaceae angehört.

18. Verfahren nach Anspruch 17, in welchem der Stamm einem Genus angehört, ausgewählt aus Lagenidium und Olpidiopsis.

19. Verfahren nach Anspruch 3, in welchem der Stamm der Ordnung Lagenidiales einer Familie angehört, ausgewählt aus Olpidiaceae und Sirolpidiaceae.

20. Transglutaminaseenzym, welches
(i) mindestens 80% identisch ist zu (a) SEQ ID NO: 2, oder (b) den Aminosäuren 168–573 hiervon; und/oder
(ii) durch eine Nukleinsäuresequenz kodiert wird, welche mindestens 80% identisch ist zu (a) SEQ ID NO: 1, (b) den Nukleotiden 46–1765 hiervon, oder (c) der Transglutaminase-kodierenden DNA-Sequenz, welche von dem Plasmid in E. coli DSM 10256 erhältlich ist;

21. Transglutaminaseenzym nach Anspruch 20, welches erhältlich ist von Phytophthora cactorum, CBS 618.94 oder IFO 30474.

22. DNA-Konstrukt, umfassend eine DNA-Sequenz, welche ein Enzym kodiert, welches Transglutaminaseaktivität aufweist, welche DNA-Sequenz ausgewählt ist unter
(i) der in SEQ ID No. 1 gezeigten Sequenz oder den Nukleotiden 46–1765 hiervon, und/oder der Transglutaminase-kodierenden DNA-Sequenz, welche von dem Plasmid in E. coli DSM 10256 erhältlich ist;
(ii) DNA-Sequenzen, welche mindestens 80% identisch sind zu (a) SEQ ID NO: 1, (b) den Nukleotiden

46–1765 hiervon, oder (c) der Transglutaminase-kodierenden DNA-Sequenz, welche von dem Plasmid in E. coli DSM 10256 erhältlich ist; und/oder
(iii) DNA-Sequenzen, welche ein Enzym kodieren, welches mindestens 80% identisch ist zu (a) SEQ IID NO: 2, oder (b) den Aminosäuren 168–573 hiervon.

23. Rekombinanter Expressionsvektor, umfassend ein DNA-Konstrukt nach Anspruch 22.

24. Zelle, umfassend einen rekombinanten Expressionsvektor nach Anspruch 23.

25. Verfahren zum Herstellen eines Enzyms, welches Transglutaminaseaktivität aufweist, das Verfahren umfasst das Kultivieren einer Zelle nach Anspruch 24 unter Bedingungen, welche die Herstellung des Enzyms und die Rückgewinnung des Enzyms aus der Kulturbrühe erlauben.

26. Verfahren zum Kreuzvernetzen von Proteinen durch In-Kontakt-Bringen eines Transglutaminaseenzyms mit einem proteinhaltigen Substrat, in welchem die Transglutaminase
(i) eine Transglutaminase nach Anspruch 20 ist; und/oder
(ii) eine Transglutaminasezubereitung ist, welche durch das Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–19 und 25 hergestellt wird.

27. Verfahren nach Anspruch 26, in welchem das proteinhaltige Substrat Mehl, Fleischprodukte, Fischprodukte, Kosmetika, Käse, Milchprodukte, Gelled Nahrungsmittelprodukte oder Leder ist.

28. Verfahren nach Anspruch 26, welches ferner das Zubereiten eines Teigs oder gebackener Produkte umfasst.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen