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

(10) **DE 691 07 455 T3** 2004.09.23

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 531 372 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 07 455.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK91/00123**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 909 971.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 91/17243**
(86) PCT-Anmeldetag: **08.05.1991**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.11.1991**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.03.1993**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.02.1995**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **14.04.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 9/42**
C12N 15/56, C11D 3/386

(30) Unionspriorität:

1159/90	**09.05.1990**	**DK**
736/91	**22.04.1991**	**DK**

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

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

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

(72) Erfinder:
RASMUSSEN, Grethe, DK-2400 Köbenhavn NV, DK; MIKKELSEN, Jan, Möller, DK-2820 Gentofte, DK; SCHÜLEIN, Martin, DK-2100 Köbenhavn, DK; PATKAR, Shamkant, Anant, DK-2800 Lyngby, DK; HAGEN, Fred, Seattle, WA 98112, US; HJORT, Carsten, Mailand, DK-4000 Roskilde, DK; HASTRUP, Sven, DK-2400 Köbenhavn NV, DK

(54) Bezeichnung: **EINE EIN ENDOGLUCANASE ENZYM ENTHALTENDE ZELLULASEZUBEREITUNG.**

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Cellulase-Präparat, das eine einkomponentige Endoglucanase umfasst, ein Detergens-Additiv, das das Cellulase-Präparat umfasst, eine Detergens-Zusammensetzung, die das Cellulase-Präparat enthält, sowie Verfahren zur Behandlung von Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen mit dem Cellulase-Präparat.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Es ist dem Fachmann bekannt, dass das wiederholte Waschen von Baumwolleenthaltenden textilen Stoffen im Allgemeinen eine ausgeprägte, unangenehm raue Beschaffenheit des textilen Stoffs hervorruft, und es sind auf diesem Fachgebiet bereits mehrere Verfahren vorgeschlagen worden, um dieses Problem zu überwinden. Zum Beispiel lehrt GB 1 368 599 von Unilever Ltd. die Verwendung von cellulytischen Enzymen zur Verringerung der rauen Beschaffenheit von Baumwolle-enthaltenden textilen Stoffen. Außerdem lehrt US 4 435 307 (Novo Industri A/S) die Verwendung eines cellulytischen Enzyms, das aus Humicola insolens abgeleitet ist, sowie einer Fraktion davon, die als AC_xI bezeichnet wird, als Detergens-Additiv zur Verringerung der rauen Beschaffenheit. Weitere Anwendungen für cellulytische Enzyme, die im Stand der Technik genannt werden, beinhalten die Entfernung von Verschmutzungen von textilen Stoffen und die Farbklärung von textilen Stoffen (vgl. z. B. EP 220 016), die Bereitstellung einer erhöhten Wasserabsorption (JP-B-52-48236) und die Bereitstellung einer lokalisierten Farbvariation, um behandelten textilen Stoffen ein „Stone-Washed"-Erscheinungsbild zu geben (EP 307 564). Cellulytische Enzyme können ferner in der Brauereuiindustrie zum Abbau von (β-Glucanen, in der Backwarenindustrie zur Verbesserung der Eigenschaften von Mehl, bei der Verarbeitung von Papierstoff zur Entfernung von nicht-kristallinen Anteilen von Cellulose, wobei auf diese Weise der Anteil an kristalliner Cellulose im Papierstoff erhöht wird, und zur Verbesserung der Entwässerungseigenschaften von Papierstoff sowie in Tiernahrungsmitteln zur Verbesserung der Verdaubarkeit von Glucanen verwendet werden.

[0003] Die praktische Nutzung von cellulytischen Enzymen ist bis zu einem gewissen Maße durch die Beschaffenheit der bekannten Cellulase-Präparate beeinträchtigt worden, bei denen es sich oftmals um komplexe Gemische handelt. Es ist schwierig, die Herstellung von Multienzymsystemen zu optimieren, und daher ist es schwierig, eine großtechnische, kostengünstige Herstellung von cellulytischen Enzymen aufzubauen, und ihr tatsächlicher Einsatz ist durch Schwierigkeiten beschränkt worden, die sich aus der Notwendigkeit ergeben, recht große Mengen an cellulytischen Enzymen anzuwenden, um die gewünschte Wirkung auf cellulosenhaltige textile Stoffe zu erzielen.

[0004] Die Nachteile der bisher vorgeschlagenen Cellulase-Präparate können überwunden werden, indem Präparate verwendet werden, die eine größere Menge an Endoglucanasen enthalten. Ein Cellulase-Präparat, das an Endoglucanase-Aktivität angereichert ist, wird in WO 89/00069 beschrieben.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0005] Es ist nun eine einzelne Endoglucanase-Komponente isoliert worden, die ein günstiges Aktivitätsniveau gegenüber Cellulose enthaltenden Materialien zeigt.

[0006] Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung ein Cellulase-Präparat, das im Wesentlichen aus einem homogenen Enzym mit Endoglucanase-Aktivität besteht, das die Aminosäuresequenz aufweist, die in den beigefügten Sequenzlisten mit ID-Nr. 2 oder ID-Nr. 4 zeigt, oder ein Derivat von beiden hat.

[0007] Der Befund, dass diese spezielle Endoglucanase-Komponente von Cellulase vorteilhaft für die Behandlung von Cellulose-enthaltenden Materialien ist, ist von beträchtlicher praktischer Bedeutung. Er erlaubt eine kostengünstige Herstellung der Cellulase, z. B. durch Einsatz rekombinanter DNA-Techniken zur Herstellung der aktiven Komponente, und macht eine tatsächliche wirksame Anwendung des Enzyms möglich, indem eine kleinre Menge des Cellulase-Präparats erforderlich ist, um die gewünschte Wirkung bei cellulosehaltigen Materialien hervorzurufen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0008] Bei dem erfindungsgemäßen Cellulase-Präparat handelt es sich vorteilhafterweise um ein Präparat, bei dem die Endoglucanase-Komponente eine CMC-Endoase-Aktivität von mindestens etwa 50 CMC-Endoase-Einheiten pro mg Gesamtprotein zeigt.

[0009] Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Ausdruck „CMC-Endoase-Aktivität" auf die Endoglucanase-Aktivität der Endoglucanase-Komponente, ausgedrückt als ihre Fähigkeit, Cellulose zu Glucose, Cel-

lobiose und Triose abzubauen, wie sie durch eine Viskositätsabnahme einer Lösung von Carboxymethylcellulose (CMC) nach Inkubation mit dem erfindungsgemäßen Cellulase-Präparat, wie es nachstehend ausführlich beschrieben wird, bestimmt wird.

[0010] Die bevorzugten Cellulase-Präparate der Erfindung sind solche Präparate, in denen die Endoglucanase-Komponente eine CMC-Endoase-Aktivität von mindestens etwa 60 CMC-Endoase-Einheiten pro mg Gesamtprotein zeigt. Insbesondere zeigt eine bevorzugte Endoglucanase-Komponente eine CMC-Endoase-Aktivität von mindestens 100 CMC-Endoase-Einheiten pro mg Gesamtprotein.

[0011] Die CMC-Endoase(Endoglucanase)-Aktivität kann aus der Viskositätsabnahme von CMC wie folgt bestimmt werden:

[0012] Es wird eine Substratlösung hergestellt, die 35 g/l CMC (Hercules 7 LFD) in 0,1 m Tris-Puffer bei pH-Wert 9,0 enthält. Die zu analysierende Enzymprobe wird im gleichen Puffer gelöst.

[0013] 10 ml Substratlösung und 0,5 ml Enzymlösung werden gemischt und in ein Viskosimeter (z. B. Haake VT 181, NV-Sensor, 181 U/Min.), das bei 40°C thermostatisiert ist, übertragen.

[0014] Ablesungen der Viskosität erfolgen sobald wie möglich nach dem Mischen und erneut 30 Minuten später. Die Menge an Enzym, die die Viskosität auf die Hälfte unter diesen Bedingungen verringert, ist als eine Einheit an CMC-Endoase-Aktivität definiert.

[0015] SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und isoelektrische Fokussierung mit Markerproteinen in einer dem Fachmann bekannten Weise wurden durchgeführt, um das Molekulargewicht bzw. den isoelektrischen Punkt (pI) der Endoglucanase-Komponente im erfindungsgemäßen Cellulase-Präparat zu bestimmen. Auf diese Weise wurde das Molekulargewicht einer spezifischen Endoglucanase-Komponente zu ~43 kD bestimmt. Der isoelektrische Punkt dieser Endoglucanase wurde zu etwa 5,1 bestimmt. Die immunochemische Charakterisierung der Endoglucanase wurde im Wesentlichen durchgeführt, wie es in WO 89/00069 beschrieben ist, wobei festgestellt wurde, dass die Endoglucanase immunoreaktiv mit einem Antikörper ist, der gegen eine hochgereinigte ~43 kD-Endoglucanase aus Humicola insolens DSM 1800 erzeugt wurde. Die Cellobiohydrolase-Aktivität kann als die Aktivität gegenüber Cellobiose-p-nitrophenyl definiert werden. Die Aktivität wird als µMol Nitrophenyl, das pro Minute bei 37 °C und pH-Wert 7,0 freigesetzt wird, bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die vorliegende Endoglucanase-Komponente im Wesentlichen keine Cellobiohydrolase-Aktivität aufweist.

[0016] Die Endoglucanase-Komponente im erfindungsgemäßen Cellulase-Präparat wurde zunächst durch umfangreiche Reinigungsverfahren, die u. a. eine Umkehrphasen-HPLC-Reinigung eines rohen H. insolens-Cellulasegemisches gemäß US 4 435 307 beinhalteten, isoliert (vgl. nachstehendes Beispiel 1). Dieses Verfahren führte überraschenderweise zur Isolierung einer ~43 kD-Endoglucanase als einer einzelnen Komponente mit unerwartet günstigen Eigenschaften aufgrund einer überraschend hohen Endoglucanase-Aktivität.

[0017] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Enzym, das Endoglucanase-Aktivität zeigt (nachstehend als ein „Endoglucanase-Enzym" bezeichnet), wobei das Enzym die Aminosäuresequenz, die in der beigefügten Sequenzliste ID-Nr. 2 gezeigt ist, aufweist, oder ein Homologes davon ist, das Endoglucanase-Aktivität zeigt. Im vorliegenden Zusammenhang soll der Ausbruch „Homologes" ein Polypeptid bezeichnen, das von einer DNA die für das Endoglucanase-Enzym mit dieser Aminosäuresequenz kodiert, unter bestimmten festgelegten Bedingungen (wie vorheriges Tränken mit 5 × SSC und Vorhybridisierung für eine Stunde bei etwa 40°C in einer Lösung von 20% Formamid, 5 × Denhardt-Lösung, 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert 6,8 und 50 µg denaturierter, beschallter Kalbsthymus-DNA, gefolgt von Hybridisierung in der gleichen Lösung, die mit 100 µM ATP angereichert ist, für 18 Stunden bei ungefähr 40°C) hybridisiert. Der Ausdruck soll Derivate der vorstehenden Sequenz umfassen, die durch Addition eines oder mehrerer Aminosäurereste an einer oder mehreren Stellen der nativen Sequenz, durch Deletion eines oder mehrerer Aminosäurereste an einem oder beiden Enden der nativen Aminosäuresequenz oder an einer oder mehreren Stellen innerhalb der nativen Sequenz oder durch Insertion eines oder mehrerer Stellen der nativen Sequenz erhalten wird.

[0018] Bei dem erfindungsgemäßen Endoglucanase-Enzym kann es sich um ein Enzym handeln, das von Spezies von Humicola, wie Humicola insolens, z. B. Stamm DSM 1800, hinterlegt am 1. Oktober 1991 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, BRD, gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags über die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für Zwecke von Patentverfahren (Budapester Vertrag), hergestellt werden kann.

[0019] Alternativ kann es sich bei dem nativen Endoglucanase-Enzym um ein Enzym handeln, das durch eine Spezies von Fusarium, wie Fusarium oxysporum, z. B. Stamm DSM 2672, hinterlegt am 6. Juni 1983 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, BRD, gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages, gebildet werden kann.

[0020] Ferner wird es in Betracht gezogen, dass homologe Endoglucanasen aus anderen Mikroorganismen, die cellulolytische Enzyme bilden, z. B. Spezies von Trichoderma, Mycliphthora, Phanerochaete, Schizophyllum, Penicillium, Aspergillus und Geotricum, abgeleitet werden können.

[0021] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz umfasst, die für

eine Endoglucanase-Enzym, wie es vorstehend definiert wurde, oder eine Vorläuferform des Enzyms kodiert. Insbesondere weist das DNA-Konstrukt eine DNA-Sequenz auf, wie sie in den beigefügten Sequenzlisten ID-Nr. 1 oder ID-Nr. 3 gezeigt ist, oder eine Modifizierung davon. Beispiele für geeignete Modifizierungen der DNA-Sequenz sind Nucleotidsubstitutionen, die jedoch der Codonnutzung des Wirtsorganismus entsprechen, in den das DNA-Konstrukt eingeführt wird, oder Nucleotidsubstitutionen, die zu einer anderen Aminosäuresequenz führen und daher möglicherweise zu einer Endoglucanse-Mutante mit anderen Eigenschaften als das native Enzym führt. Weitere Beispiele für mögliche Modifizierungen sind die Insertion eines oder mehrerer Nucleotide in die Sequenz, die Addition eines oder mehrerer Nucleotide an einem Ende der Sequenz oder die Deletion eines oder mehrerer Nucleotide an einem Ende oder innerhalb der Sequenz.

[0022] Das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt, das für das Endoglucanase-Enzym kodiert, kann synthetisch durch eingeführte Standardverfahren, z. B. das Phosphoamidit-Verfahren, das von S. L. Beaucage und M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters, Bd. 22 (1981), S. 1859–1869 beschrieben wird, oder das Verfahren, das von Matthes et al., EMBO Journal, Bd. 3 (1984), S. 801–805 beschrieben wird, hergestellt werden. Gemäß dem Phosphoamidit-Verfahren werden Oligonucleotide synthetisiert, und zwar z. B. in einem DNA-Syntheseautomaten, gereinigt, anelliert, ligiert und in geeignete Vektoren kloniert.

[0023] Ein DNA-Konstrukt, das für das Endoglucanase-Enzym oder einen Vorläufer davon kodiert, kann z. B. isoliert werden, indem eine cDNA-Bibliothek oder genomische Bibliothek eines Cellulase-bildenden Mikroorganismus, wie Humicola insolens DSM 1800, aufgestellt wird und diese auf positive Klone nach herkömmlichen Verfahren, wie Hybridisierung unter Verwendung von Oligonucleotidsonden, die auf der Basis der vollständigen oder partiellen Aminosäuresequenz der Endoglucanase synthetisiert wurden, gemäß Standardtechniken abgesucht wird (vgl. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor, 1989), oder indem Klone selektiert werden, die die entsprechende Enzymaktivität (d. h. CMC-Endoase-Aktivität, wie sie vorstehend definiert wurde) exprimieren, oder indem Klone selektiert werden, die eine Protein bilden, das reaktiv mit einem Antikörper gegen eine native Cellulase (Endoglucanase) ist.

[0024] Schließlich kann das DNA-Konstrukt einen gemischten synthetischen und genomischen, gemischten synthetischen und cDNA- oder gemischten genomischen und cDNA-Ursprung aufweisen, indem Fragmente verschiedenen Teilen des gesamten DNA-Konstrukts entsprechen, gemäß Standardtechniken ligiert werden. Das DNA-Konsturkt kann auch durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung spezifischer Primer hergestellt werden, wie es z. B. in US 4 683 202 oder R. K. Saiki et al., Science, Bd. 239 (1988), S. 487–491 beschrieben ist.

[0025] Die Erfindung betrifft ferner einen rekombinanten Expressionsvektor, in den das erfindungsgemäße DNA-Konstrukt inseriert ist. Dabei kann es sich um einen beliebigen Vektor handeln, der zweckmäßigerweise rekombinanten DNA-Verfahren unterworfen werden kann, und die Wahl des Vektors hängt oftmals von der Wirtszelle, in die er eingeführt werden soll, ab. Bei dem Vektor kann es sich also um einen sich autonom replizierenden Vektor handeln, d. h. ein Plasmid. Alternativ dazu kann es sich bei dem Vektor um einen Vektor handeln, der beim Einführen in eine Wirtszelle in das Wirtszellgenom integriert wird und zusammen mit dem Chromosom/den Chromosomen, in das/die er integriert worden ist, repliziert wird.

[0026] In dem Vektor sollte die DNA-Sequenz, die die Endoglucanase kodiert, in Funktion mit einem geeigneten Promoter und einer geeigneten Terminatorsequenz verknüpft sein. Bei dem Promoter kann es sich um eine beliebige DNA-Sequenz handeln, die eine transkriptionale Aktivität in der gewählten Wirtszelle zeigt und die von Genen abgeleitet sein kann, die Proteine kodieren, die homolog oder heterolog in Bezug auf die Wirtszelle sind. Die Verfahren, um die DNA-Sequenzen, die für die Endoglucanase, den Promoter und den Terminator kodieren, zu ligieren und sie in geeignete Vektoren zu inserieren, sind dem Fachmann bekannt (vgl. z. B. Sambrook et al., a. a. O).

[0027] Die Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, die mit dem DNA-Konstrukt oder dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformiert ist. Die Wirtszelle kann z. B. zu einer Spezies von Aspergillus niger, insbesondere Aspergillus oryzae oder Aspergillus niger, gehören. Pilzzellen können nach einem Verfahren transformiert werden, das die Protoplastenbildung und die Transformation der Protoplasten, gefolgt von einer Regeneration der Zellwand in einer an sich bekannten Weise, beinhaltet. Die Verwendung von Aspergillus als Wirtsorganismus wird in EP 238 023 (Novo Industri A/S) beschrieben, deren Inhalt durch Verweis zum Gegenstand der vorliegenden Anmeldung gemacht wird. Die Wirtszelle kann auch eine Hefezelle, z. B. ein Stamm von Sacchromyces cerevisiae, sein.

[0028] Alternativ dazu kann es sich bei dem Wirtsorganismus um ein Bakterium handeln, insbesondere um Stämme von Strephomyces und Bacillus sowie E. coli. Die Transformation der bakteriellen Zellen kann gemäß herkömmlicher Verfahren erfolgen, wie es z. B. in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989, beschrieben wird.

[0029] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Endoglucanase-Enzyms, wobei das Verfahren das Züchten einer Wirtszelle, wie sie vorstehend beschrieben wurde, in einem geeigneten Kulturmedium unter Bedingungen, die die Expression des Endoglucanase-Enzyms erlauben, und die Gewinnung des Endoglucanase-Enzyms aus der Kultur umfasst. Bei dem zum Züchten der

transformierten Wirtszellen verwendeten Medium kann es sich um ein beliebiges herkömmliches Medium handeln, das sich zum Züchten der fraglichen Wirtszellen eignet. Die exprimierte Endoglucanase kann zweckmäßigerweise in das Kulturmedium abgesondert und daraus nach bekannten Verfahren unter Einschluss der Abrennung der Zellen von dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration, Ausfällen proteinartiger Komponenten aus dem Medium mittels eines Salzes, wie Ammoniumsulfat, gefolgt von chromatographischen Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder dergleichen, gewonnen werden.

[0030] Durch Anwendung rekombinanter DNA-Techniken, wie es vorstehend angegeben wurde, Techniken der Proteinreinigung, Techniken der Fermentation und Mutation oder anderer Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, ist es möglich, Endoglucanasen von hoher Reinheit bereitzustellen.

[0031] Das erfindungsgemäße Cellulase-Präparat kann zweckmäßigerweise zu Celluloseenthaltenden textilen Stoffen zusammen mit anderen Detergens-Materialien während des Einweichens, Waschens oder Spülens gegeben werden. Dementsprechend betrifft die Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt ein Detergens-Additiv, das das erfindungsgemäße Cellulase-Präparat umfasst. Das Detergens-Additiv kann zweckmäßigerweise in Form eines nicht-staubenden Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms vorliegen. Nicht-staubende Granulate können z. B. gemäß US 4 106 991 und 4 661 452 (beide Novo Industri A/S) hergestellt werden, und sie können wahlweise nach Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, beschichtet werden. Flüssige Enzym-Präparate können z. B. durch Zugabe eines Polyols, wie Propylenglykol, eines Zuckers oder Zuckeralkohols, von Milchsäure oder Borsäure gemäß eingeführter Verfahren stabilisiert werden. Weitere Enzymstabilisatoren sind dem Fachmann bekannt. Geschützte Enzyme können gemäß dem in EP 238 216 beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

[0032] Das Detergens-Additiv kann zweckmäßigerweise 1 bis 500, vorzugsweise 5 bis 250 und insbesondere 10 bis 100 mg Enzymprotein pro g Additiv enthalten. Es ist darauf hinzuweisen, dass Detergens-Additiv ferner ein oder mehrere weitere Enzyme, wie eine Protease, Lipase, Peroxidase oder Amylase, die herkömmlicherweise Detergens-Additiven einverleibt werden, enthalten kann.

[0033] Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass eine erhöhte Lagerstabilität des Endoglucanase-Enzyms erzielt wird, wenn es sich bei der Protease um eine Protease handelt, die einen höheren Grad an Spezifität als Bacillus lentus-Serin-Protease aufweist (für den vorliegenden Zweck ist eine Protease mit einem höheren Grad an Spezifität als B. lentus-Serin-Protease eine Protease, die Humaninsulin in Bund R-Puffer, pH-Wert 9,5, wird mit 75 µl Enzymlösung von 0,6 CPU [vgl. Novo Nordisk Analysis Methods Nr. AF 228/1] pro Liter für 120 Minuten bei 37°C inkubiert, und die Reaktion wird mit 50 µl 1N HCl abgebrochen. Beispiele für derartige Proteasen sind Subtilisin Novo oder Varianten davon (z. B. eine Variante, die in US 4 914 031 beschrieben wird), eine Protease, die aus Nocardia dassonvillei NRRL 18133 (beschrieben in WO 88/03947) abgeleitet werden kann, eine Serin-Protease, die spezifisch für Glutaminsäure und Asparaginsäure ist und von Bacillus licheniformis gebildet werden kann (diese Protease wird ausführlich in der gleichzeitig anhängigen internationalen Patentanmeldung PCT/DK91/00067 beschrieben) oder eine trypsinähnliche Protease, die durch Fusarium sp. DSM 2672 (diese Protease wird ausführlich in WO 89/06270 beschrieben) gebildet werden kann.

[0034] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine Detergens-Zusammensetzung, die das erfindungsgemäße Cellulase-Präparat umfasst.

[0035] Die erfindungsgemäßen Detergens-Zusammensetzungen umfassen zusätzlich oberflächenaktive Mittel, bei denen es sich um Mittel vom anionischen, nichtionischen, kationischen, amphoteren oder zwittertonischen Typ sowie um Gemische dieser Klassen von oberflächenaktiven Mitteln handeln kann. Typische Beispiele für anionische oberflächenaktive Mittel sind lineare Alkylbenzolsulfonate (LAS), α-Olefinsulfonate (AOS), Alkoholethoxysulfate (AES) und Alkalimetallsalze natürlicher Fettsäuren. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Endoglucanase in Gegenwart von anionischen Detergentien weniger stabil ist, und dass sie andererseits in Gegenwart von nicht-ionischen Detergentien oder bestimmten polymeren Verbindungen, wie Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol oder Polyvinylalkohol, stabiler ist. Dementsprechend kann die Detergens-Zusammensetzung eine geringe Konzentration an anionischem Detergens und/oder eine bestimmte an nicht-ionischem Detergens oder stabilisierendem Polymer, wie es vorstehend angegeben wurde, enthalten.

[0036] Die erfindungsgemäßen Detergens-Zusammensetzungen können bestimmte weitere Detergens-Bestandteile, die dem Fachmann bekannt sind, z. B. Gerüststoffe, Bleichmittel, Bleichaktivatoren, Korrosionsschutzmittel, Maskiermittel, Mittel gegen eine Wiederablagerung von Schutz, Parfümen, Enzymstabilisatoren und dergleichen, enthalten.

[0037] Die erfindungsgemäße Detergens-Zusammensetzung kann in einer beliebigen zweckmäßigen Form, z. B. als Pulver oder Flüssigkeit, formuliert werden. Das Enzym kann in einem flüssigen Detergens stabilisiert werden, indem Enzymstabilisatoren, wie sie vorstehend angegeben wurden, einverleibt werden. Üblicherweise beträgt der pH-Wert einer Lösung der erfindungsgemäßen Detergens-Zusammensetzung 7 bis 12 und in einigen Fällen 7,0 bis 10,5. Weitere Detergens-Enzyme, wie Proteasen, Lipasen oder Amylasen, können den erfindungsgemäßen Detergens-Zusammensetzungen entweder getrennt oder in einem kombinierten Additiv, wie es vorsehend beschrieben wurde, einverleibt werden.

[0038] Die Wirkungen hinsichtlich Weichmachung, Schmutzentfernung und Farbklärung, die mittels des er-

findungsgemäßen Cellulase-Präparats erzielt werden können, erfordern im Allgemeinen eine Konzentration der Cellulase-Zubereitung in der Waschlösung von 0,0001 bis 100, vorzugsweise 0,00005 bis 60 und insbesondere 0,01 bis 20 mg/l in der Waschlösung eingesetzt. Im Allgemeinen ist es besonders zweckmäßig, sie als Detergens-Additiv in Mengen von 0,1 bis 5% Gew./Gew. oder vorzugsweise in Mengen von 0,2 bis 2% der Detergens-Zusammensetzung zuzugeben.

[0039] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verringerung der Geschwindigkeit, mit der Cellulose-enthaltende textile Stoffe rau werden oder zur Verringerung der rauen Beschaffenheit von Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen, wobei das Verfahren die Behandlung von Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen mit einem Cellulase-Präparat, wie es vorstehend beschrieben wurde, umfasst. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren, das für eine Farbklärung von gefärbten, Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen zu sorgen, wobei das Verfahren die Behandlung der gefärbten, Cellulose-enthaltenden textilen Stoffe mit einem erfindungsgemäßen Cellulase-Präparat umfasst. Die erfindungsgemäßen Verfahren können durch Behandlung von Celluloseenthaltenden textilen Stoffen während des Waschens ausgeführt werden. Gegebenenfalls kann die Behandlung der textilen Stoffe jedoch auch während des Einweichens oder Spülens oder einfach durch Zugabe des Cellulase-Präparats zu Wasser, in dem sich die textilen Stoffe befinden oder in das sie eingetaucht werden, ausgeführt werden.

[0040] Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass die Entwässerungseigenschaften von Papierstoff wesentlich durch Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Endoglucanase-Präparat verbessert werden können, und zwar ohne irgendeinen wesentlichen gleichzeitigen Verlust an Festigkeit. Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung ferner ein Verfahren zur Verbesserung der Entwässerungseigenschaften von Papierstoff, wobei das Verfahren die Behandlung des Papierstoffs mit einem Cellulase-Präparat der vorliegenden Erfindung umfasst. Beispiele für Faserbreie, die nach diesem Verfahren behandelt werden können, sind Faserbrei als Altpapier, Faserbrei aus einem Recycling unterworfener Pappe, Kraft-Faserbrei, Sulfat-Faserbrei oder thermomechanischer Faserbrei und andere ergiebige Faserbreie.

[0041] Die vorliegende Erfindung wird ausführlicher mit Bezug auf gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen in den nachstehenden Beispielen beschrieben, die den Schutzumfang der Erfindung in keiner Weise beschränken sollen.

Beispiele

Beispiel 1

Isolierung einer ~43 kD-Endoglucanase aus Humicola insolens

1. Herstellung eines Kaninchen-Antikörpers, der reaktiv mit einer 43 kD-Endoglucanase ist, die durch Reinigung aus einem Humicola insolens-Cellulasegemisch erhalten wurde

[0042] Eine Cellulase wurde hergestellt, indem Humicola insolens DSM 1800 gezüchtet wurde, wie es in US 4 435 307, Beispiel 6, beschrieben wird. Die rohe Cellulase wurde aus der Kulturbrühe durch Filtration über Kieselgur, Ultrafiltration und Gefriertrocknen des Retentats erhalten (vgl. Beispiele 1 und 6 von US 4 435 307).

[0043] Die rohe Cellulase wurde gereinigt, wie es in WO 89/09259 beschrieben ist, was zu einer Fraktion F1P1C2 führte, die für die Immunisierung von Mäusen verwendet wurde. Die Immunisierung wurde 5 mal in zweiwöchentlichen Intervallen jeweils unter Verwendung von 25 µg Protein unter Einschluss von Freund-Adjuvans durchgeführt.

[0044] Hybridomzellinien wurden erhalten, wie es in Ed Harlow and David Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, beschrieben ist. Das Verfahren kann kurz wie folgt beschrieben werden:

[0045] Nach der Blutentnahme aus den Mäusen und dem Nachweis, dass das Mäuseserum mit Proteinen, die in der F1P1C2-Fraktion vorhanden sind, reagiert, wurde die Milz entfernt und homogenisiert und anschließend mit PEG und Fox-River-Myelomzellen von Hyclone, Utah, USA, gemischt.

[0046] Die Hybridome wurden gemäß dem eingeführten HAT-Absuchverfahren selektiert.

[0047] Die erneut klonierten Hybridomzelllinien wurden stabilisiert. Die Antikörper, die von diesen Zelllinien hergestellt wurden, wurden im Hinblick auf ihre Zugehörigkeit zur IgG1-Unterklasse unter Verwendung eines handelsüblichen Reagenssatzes zur Typisierung von monoklonalen Mäuseantikörpern von Serotec, Oxford, England, abgesucht und selektiert. Positive Antikörper wurden anschließend auf Reaktivität mit F1P1C2 in einem herkömmlichen ELISA-Test untersucht, was zur Selektion von F4, F15 und F41 führte, da sie alle eine sehr gute ELISA-Reaktion zeigten, jedoch festgestellt wurde, dass eine unterschiedliche Reaktion beim Immunoblotten unter Verwendung von roher H. insolens-DSM 1800-Cellulase bei SDS-PAGE, gefolgt von Western-Blot, zeigten, was darauf hinwies, dass sie verschiedene Epitope erkannten.

[0048] Die drei Antikörper wurden in großen Mengen in Ascites-Flüssigkeit von $CRBF_1$-Mäusen hergestellt.

Das Mäuse-Gammaglobulin wurde aus Ascites-Flüssigkeit durch Protein A-Reinigung unter Verwendung von Protein A, gekoppelt an Sepharose (Kem. En. Tek., Kopenhagen, Dänemark) gereinigt.

[0049] Die verschiedenen monoklonalen Gammaglobuline wurden auf ihre Reaktion in einem Sandwich-ELISA-Test unter Verwendung jedes monoklonalen Antikörpers als Einfangantikörper, verschiedener HPLC-Fraktionen von Celluzym als Antigen und eines Kaninchen-Antikörpers, der gegen Endoglucanase B aus Celluzym erzeugt worden war, als Nachweisantikörper untersucht.

[0050] Um die Bindung im ELISA-Test sichtbar zu machen, wurde ein Schweine-Antikörper gegen Kaninchen-IgG, der kovalent an eine Peroxidase von Dakopatts (Kopenhagen, Dänemark) gekuppelt war, verwendet und mit OPD (1,2-Phenylendiamin-dihydrochlorid)/H_2O_2 sichtbar gemacht.

[0051] Die stärkste Reaktion im ELISA-Test wurde mit dem monoklonalen Antikörper F41 erzielt, der daher in den Immunoaffinitäts-Reinigungsstufen verwendet wurde.

[0052] Das gereinigte Mäuse-Gammaglobulin F41 wurde an 43 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekuppelt, wie es vom Hersteller (Pharmacia, Schweden) beschrieben wird, gefolgt von Waschen.

2. Immunoaffinitäts-Reinigung der ~43 kD-Endoglucanase aus einem H. insolens-Cellulasegemisch

[0053] Das H. insolens-Cellulasegemisch (wie vorstehend beschrieben) wurde auf 3 Trockenmasse verdünnt, und der pH-Wert wurde auf 3,5 in 15 Minuten bei 4°C eingestellt. Der Niederschlag wurde durch Filtration nach Einstellung des pH-Werts auf 7,5 entfernt. Anschließend wurde Natriumsulfat zugegeben, um das aktive Enzym auszufällen, und dies erfolgte bei 40°C (260 g pro kg pH-Wert 5,5). Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst und filtriert. Die Säurebehandlung wurde wiederholt. Schließlich wurde das Produkt filtriert und durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Polyvinylsulfonat-Membran mit einer Molekulargewichtsgrenze von 10 000 eingeengt.

[0054] Das Cellulase-Produkt wurde dann auf 3% Trockenmasse verdünnt, und der pH-Wert wurde auf 9,0 eingestellt. Das Produkt wurde einer Anionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Sepharose-Säule unterworfen, wie es vom Hersteller (Pharmacia, Schweden) empfohlen wird.

[0055] Das proteasefreie Cellulase-Produkt wurde auf eine F41-Gammaglobulingekuppelte Sepharose-Säule die vorstehend beschrieben wurde, bei einem pH-Wert von 8,0 in den Natriumphosphatpuffer aufgetragen.

[0056] Nach dem Auftragen wurde die Säule mit dem gleichen Puffer mit einem Gehalt an 0,5 m Natriumchlorid gewaschen. Die Säule wurde dann mit 0,1 m Natriumacetatpuffer mit einem Gehalt an 0,5 m Natriumchlorid, pH-Wert 4,5 gewaschen, und danach wurde die Säule mit 5 mM Natriumacetatpuffer, pH-Wert 4,5 gewaschen. Schließlich wurde die ~43 kD-Endoglucanase mit 0,1 m Citronensäure eluiert.

[0057] Gesamtausbeute: 25 mg mit einer Endoglucanase-Aktivität von 1563 CMC-Endoase-Einheiten.

[0058] Das eluierte Protein wandert als eine Bande bei der SDS-PAGE mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ~43 kD und einem pH-Wert nach isoelektrischer Fokussierung von etwa 5,0 bis 5,2.

[0059] Inaktives Protein wurde durch Umkehrphasenreinigung entfernt.

[0060] Inaktives und aktives Protein wurden durch HPLC unter Verwendung eines Gradienten von 2-Propanol getrennt. Inaktives Protein wird bei etwa 25% 2-Propanol eluiert, und die aktive ~43 kD-Endoglucanase wird bei 30% 2-Propanol eluiert, wobei die aktive Endoglucanase durch eine CMC-Kongorot-Klärungszone nachweisbar ist.

[0061] Auf diese Weise wurden insgesamt 0,78 mg aktives Protein mit 122 CMC-Endoase-Einheiten gewonnen. Dieses Verfahren wurde 30 mal wiederholt.

[0062] Die ~43 kD-Endoglucanase wurde gewonnen, indem sie zuerst zur Entfernung von TFA und Propanol gefriergetrocknet und dann in Phosphatpuffer gelöst wurde.

[0063] Die Endoglucanase-Aktivität des gereinigten Materials betrug 156 CMC-Endoase-Einheiten pro mg Protein, und die Gesamtausbeute unter Einschluss des Gefriertrocknens betrug 65% der Endoglucanase-Aktivität.

[0064] Das auf diese Weise erhaltene ~43 kD-Enzym wurde zur Immunisierung von Kaninchen gemäß dem Verfahren, das von N. Axelsen et al. in: A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Kapitel 23, beschrieben wird, verwendet. Gereinigte Immunglobuline wurden aus den Antiseren durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende Dialyse und Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephadex in an sich bekannter Weise gewonnen. Die Bindung von gereinigtem Immunglobulin an die Endoglucanase wurde bestimmt, und das Kaninchen-Immunglobulin AS 169 wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

3. Charakterisierung der ~43 kD-Endoglucanase

[0065] Aminosäurezusammentsetzung: Unter Anwendung einer vollständigen Hydrolyse wurde die folgende Aminosäurezusammensetzung gemäß Aminosäureanalyse erhalten:

Asp	17
Asn	15
Thr	25
Ser	29
Glu	6
Gln	13
Pro	21
Gly	32
Ala	23
Cys	20
Val	14

Met	1
Ile	7
Leu	8
Tyr	6
Phe	15
Lys	9
His	2
Trp	9
Arg	12

[0066] Das Molekulargewicht des nicht-glycosylierten Proteins wurde zu 30 069 auf der Basis der Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Die Glycosylierung wurde durch Messung zu

Galactose	10
Mannose	28

[0067] Bestimmt, was einem Molekulargewicht von 6840 entspricht und zu einem gesamten Molekulargewicht der Endoglucanase von 36 900 (±2400) führt. Der Extinktinoskoeffizient pro Mol wurde wie folgt bestimmt.

Tryptophan	9 mal 5690
Tyrosin	6 mal 1280
Cystein	20 mal 120
Gesamt	61 290 pro Mol

[0068] Ein Extinktionskoeffizient von 1,66 bei 280 nm entspricht 1 mg Protein pro ml (Literatur: S. C. Gill und P. Hippel, Anal. Biochemistry, Bd. 182 (1989), S. 312– 326).

[0069] Die Aminosäuresequenz wurde mit einem Applied Biosystems 475A Protein Sequenator unter Anwendung des Edman-Abbaus bestimmt. Nur eine Sequenz zeigte die Reinheit des Proteins. Die Aminosäuresequenz ist in der beigefügten Sequenzliste ID-Nr. 2 gezeigt.

Enzymeigenschaften

[0070] Das Enzym ist zwischen pH-Wert 3 und 9,5 stabil.
[0071] Das Enzym baut nicht hochkristalline Cellulose oder das Substrat Cellobiose-β-p-nitorphenyl (Cellobiohydrolase-Substrat) ab, es baut jedoch amorphe Cellulose hauptsächlich zu Cellobiose, Cellotiose und Cellotraose ab, was zeigt, dass das Enzym zur Herstellung von Cellodextrinen aus unlöslicher amorpher Cellulose verwendet werden kann.
[0072] Das Enzym ist aktiv zwischen pH-Wert 6,0 und 10,0 mit einer maximalen Aktivität bei etwa 50°C.

Beispiel 2

Klonierung und Expression der ~43 kD-Endoglucanase in Aspergillus oryzae

Partielle cDNA

[0073] Eine cDNA-Bibliothek wurde aus mRNA des Stamms DSM 1800 von Humicola insolens (Kaplan et al., Biochem. J., Bd. 183 (1979), S. 181–184) gemäß dem Verfahren von Okayama und Berg (Mol. Cell. Biol., Bd. 2 (1982), S. 161–170) hergestellt. Diese Bibliothek wurde durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonucleotiden an Filter mit immobilvisierter DNA aus den Rekombinanten abgesucht (Gergen et al., Nucleic Acids Res., Bd. 7 (1979), S. 2115–2136). Die Oligonucleotidsonden wurden auf der Basis der Aminosäuresequenzen von tryptischen Fragmenten der gereinigten ~43 kD-Endoglucanase hergestellt. Es wurde festgestellt, dass eine Kolonie an drei Sonden hybridisierte (NOR 1251, 2048 und 2050), und diese Kolonie wurde isoliert. Die Sequenz zeigte, dass die inserierte, 680 bp umfassende cDNA für die 181-C-terminalen Aminosäuren des ~43 kD-Proteins und die 3'-nicht-translatierte mRNA kodierte. Ein 237 bp langes Pvu I-Xho I-Fragment aus diesem Klon wurde zur Untersuchung eines Northern-Blots (wie es in Sambrook et al., a. a. O., S. 7.40.7.42 und S. 7.46–7.48 beschrieben wird) mit H. insolens-mRNA verwendet, und es wurde gezeigt, dass die gesamte ~43 kD-mRNA eine Länge von ca. 1100 bp aufweist. Das gleiche 237 bp umfassende Fragment wurde zur Untersuchung einer genomischen Bibliothek aus dem gleichen Stamm verwendet.

Genomischer Klon

[0074] Eine genomische Bibliothek des Stamms DSM 1800 von Humicola insolens wurde aus der gesamten DNA hergestellt, die nach dem Verfahren von Yelton (M. M. Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 81 (1984), S. 1470–1474) gewonnen und partiell mit Sau 3A verdaut wurde. Fragment, die größer als 4 kb waren, wurden aus einem Agarosegel isoliert und in pBR 322, das mit BamHI verdaut und dephosphoryliert worden war, ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in E. coli MC1000 (Casadaban und Cohen, J. Mol. Biol., Bd. 138 (1980), S. 179–207) transformiert, die nach herkömmlichen Verfahren r^-m^+ gemacht worden waren. 40 000 Rekombinanten wurden mit dem 237 bp umfassenden partiellen Pvu I-Xho I-cDNA-Fragment, das im Abschnitt „Partielle cDNA" beschrieben wurde, abgesucht. Zwei Kolonien, die die gesamte ~43 kD-Endoglucanase-Sequenz enthielten, wurden ausgewählt, und das Gen wurde nach dem Dedesoxy-Verfahren unter Verwendung des Sequenase^R-Reagenssatzes (United States Biochemical Corporation) gemäß der Anleitung des Herstellers sequenziert. Die Sequenz war identisch zu der Sequenz des Volllängen-cDNA-Gens (vgl. den nachstehenden Abschnitt „Volllängen-cDNA"), mit Ausnahme eines Introns in dem genomischen Gen.
[0075] Das genomische Gen wurde nach dem PCR-Verfahren unter Verwendung eines Perkin-Elmer-Cetus DNA Amplification System gemäß der Anleitung des Herstellers amplifiziert. Für das 5'-Ende des Gens wurde der Primer NOR 2378 verwendet. Dieser Primer ist ein 25-mer, das zum 5'-nicht-translatierten Ende des Gens mit Ausnahme des Austausches eines C gegen T, was eine Bcl I-Stelle erzeugt, passt. Für das 3'-Ende des Gens wurde der Primer in NOR 2389 verwendet. Dieser Primer ist ein 26-mer, von dem 21 Basen zum 3'-nicht-translatierten Teil des Gens passen, wobei 5 Basen mit 5'-Ende des Primers eine Sal I-Stelle komplettieren.
[0076] Der Aspergillus-Expressionsvektor pToC 68 wurde aus dem Plasmid p775 (dessen Konstruktion in EP 238 023 beschrieben wird) durch Insertion der folgenden Linker konstruiert:

```
KFN 514: 5'-AGCTGCGGCCGCAGGCCGCGGAGGCCA-3'
KFN 515:     3'-CGCCGGCGTCCGGCGCCTCCGGTTCGA-5'
                          SacII        HindIII

            EcoRI  NotI     StiI
KFN 516: 5'-AATTCGCGGCCGCCGCCATGGAGGCC-3'
KFN 519:     3'-GCGCCGGCGCCGGTACCTCCGGTTAA-5'
                          NcoI
```

[0077] Die Konstruktion von pToC ist in der beigefügten **Fig.** 1 gezeigt.
[0078] Das vorstehend erhaltene PCR-Fragment wurde mit Bcl I und Sal I verdaut und in pToC 68, das mit BamH I und Xho I verdaut worden war, inseriert. Das Insert des erhaltenen Plasmids (pCaHj 109) wurde sequenziert, und es wurde gezeigt, dass es identisch zum ursprünglichen Klon war.

Volllängen

[0079] Der erste cDNA-Strang wurde ausgehend von einem spezifischen Primer innerhalb der bekannten Sequenz (NOR 2153) synthetisiert, und die Synthese des zweiten Strangs erfolgte nach dem Verfahren, das von Gubler und Hoffman, Gene, Bd. 25 (1983), S. 263–269 beschrieben wurde. Die Sequenz des genomischen Gens ermöglichte es, einen PCR-Primer zu entwerfen, der den 5'-teil der mRNA erfasste und gleichzeitig eine BamH I-Stelle unmittelbar vor dem ATG-Startcodon einführte (NOR 2334). Unter Verwendung dieses Primers am 5'-Ende und erneut von NOR 2153 am 3'-Ende wurde die PcR für das doppelsträngige cDNA-Produkt durchgeführt. Der kodierende Teil voller Länge der PCR-cDNA wurde dann durch Klonieren des 5'-BamH I-Pvu I-Fragments aus der PcR-Reaktion zusammen mit dem 3'-Pvu I-Eco 0109, aufgefüllt mit Klenow-Polymerase, um stumpfe Enden zu erzielen, in den mit BamH I-Nru I geschnittenen Aspergillus-Expressionsvektor pToC 68 konstruiert (**Fig.** 1), und die Sequenz der inserierten DNA wurde überprüft (pSX 320) (vgl. **Fig.** 2). Die Sequenz der Volllängen-cDNA ist in der beigefügten Sequenzliste ID-Nr. 1 gezeigt.

Verwendete Oligonucleotid-Primer:

```
NOR 1251:  5'- AAYGCYGACAAAYCC -3'
NOR 2048:  5'- AACGAYGAYGGNAAYTTCCC -3'
NOR 2050:  5'- AAYGAYTGGTACCAYCARTG -3'
NOR 2153:  5'- GCGCCAGTAGCAGCCGGGCTTGAGGG -3'
NOR 2334:  5'- ACGTCTCAACTCGGATCCAAGATGCGTT -3'
                           Bam HI
NOR 2078:  5'- CTCAACTCTGATCAAGATGCGTTCC -3'
                        Bcl I

NOR 2389:  5'- TCTCGACCAGTAAGGCCCTCAAGCTG -3'
                 Sal I
```

Nomenklatur:

Y: Pyrimidin (C + T)
R: Purin (A + G)
N: Alle vier Basen
Verstärkt: Veränderungen oder Insertionen, bezogen auf die ursprüngliche Sequenz.
Unterstrichen: Restriktionsstellen, die durch PCR eingeführt werden.

Expression der ~43 kD-Endoglucanase

[0080] Das Plasmid pSX 320 wurde in Aspergillus oryzae A1560-T40, ein Protease-Mangelderivat von A. oryzae IFO 4177, bei Selektion auf Acetamid durch Cotransformation mit pToC 90, das das amdS-Gen von A. nidulans als ein 2,7 kb umfassendes Xba I-Fragment (Corrick et al., Gene, Bd. 53 (1987), S. 63–71) auf einem pUC 19-Vektor (Yannisch-Perron et al., Gene Bd. 33 (1985), S. 103–119) enthielt, transformiert. Die Transfor-

mation wurde durchgeführt, wie es in der veröffentlichten EP-Patentanmeldung 238 023 beschrieben ist. Eine Anzahl von Transformanten wurde dann auf Co-Expression der ~43 kD-Endoglucanase abgesucht. Transformanten wurden durch SDS-PAGE (S. 3) und CMC-Endoglucanase-Aktivität bewertet.

[0081] Das Plasmid, das das genomische Gen enthielt (pCaHj 109), wurde nach dem gleichen Verfahren in Aspergillus oryzae A1560-T40 transformiert. Die Bewertung der Transformanten zeigte, dass der Grad der Expression ähnlich zu dem der cDNA-Transformanten war.

[0082] Die gereinigte ~43 kD-Endoglucanase wurde auf ihre N-terminale Sequenz und den Kohlenhydratgehalt analysiert. Es wurde gezeigt, dass die N-terminale Aminosäuresequenz identisch zu der durch HPLC gereinigten ~43 kD-Endoglucanase war. Der Kohlenhydratgehalt unterscheidet sich von dem den HPLC-gereinigten ~43 kD-Enzyms, wobei das rekombinante Enzym 10 ± 8 Galactose-Zucker pro Mol anstelle von Glucose enthält.

Beispiel 3

Isolierung von genomischer DNA aus Fusarium oxysporum

[0083] Eine gefriergetrocknete Kultur von Fusarim oxysporum wurde mit Phosphatpuffer rekonstituiert, 5 mal auf jede von 5 FOX-Mediumplatten (6% Hefeextrakt; 1,5% K_2HPO_4; 0,75% $MgSO_4$ mal $7H_2O$; 22,5% Glucose; 1,5% Agar; pH-Wert 5,6) aufgetragen und bei 37°C inkubiert. Nach 6 Tagen der Inkubation wurden die Kolonien von den Platten in 15 ml 0,001% Tween-80 abgeschabt, was zu einer dicken und trüben Suspension führte.

[0084] Vier 1 Liter fassende Kolben, die jeweils 300 ml flüssiges FOX-Medium enthielten, wurden mit 2 ml der Sporensuspension angeimpft und bei 30°C und 240 U/Min. inkubiert. Am 4. Tag der Inkubation wurden die Kulturen durch vier Schichten von steriler Gaze filtriert und mit sterilem Wasser gewaschen. Die Mycelien wurden auf Whatman-Filterpapier getrocknet, in flüssigem Stickstoff eingefroren, zu feinem Pulver in einem kalten Mörser zerkleinert und zu 75 ml frischem Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4; 1% SDS; 50 mM EDTA; 100 µl DEPC) gegeben. Die gründlich gemischte Suspension wurde 1 Stunde in einem Wasserbad bei 65°C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 4000 U/Min. und 5°C in einer Arbeitsplatz-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit EtOH gefällt. Nach 1 Stunde auf Eis wurde die Lösung 20 Minuten bei 19 000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 U/Min. wurde der Überstand dekantiert, und man ließ die Pellets trocknen.

[0085] 1 ml TER-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4; 1 mM EDTA 2000 100 µg RNAseA) wurden in jedes Röhrchen gegeben, und die Röhrchen wurden 2 Tage bei 4°C gelagert. Der Inhalt der Röhrchen wurde dann vereinigt und 30 Minuten in ein Wasserbad bei 65°C gegeben, um nicht-gelöste DNA zu suspendieren. Die Lösung wurde 2 mal mit $CHCl_3$/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Man ließ das Pellet sich absetzen, und das EtOH wurde entfernt. 70% EtOH wurden zugegeben, und die DNA wurde über Nacht bei –20°C gelagert. Nach Dekantieren und Trocknen wurde 1 ml TER zugegeben, und die DNA wurde durch Inkubieren der Röhrchen für 1 Stunde bei 65°C gelöst. Die Präparation ergab 1,5 mg genomische DNA.

Klonierung der ~43 kD-Endoglucanase aus Fusarium oxysporum

[0086] Um das Fusarium-Homologe der Humicola-~43 kD-Cellulase zu isolieren, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt (wie es in US 4 683 195 und US 4 683 202 beschrieben ist) und kloniert. Dieses Produkt wurde dann sequenziert, und Primer, die als Sonden für die Bibliothek und für die PCR-Amplifizierung verwendet werden sollten, wurden konstruiert. Diese Oligonucleotide wurden verwendet, um den entsprechenden Klon aus einer cDNA-Bibliothek zu isolieren.

[0087] Die PCR wurde verwendet, um cDNA partieller Länge und genomische Fragmente des ~43 kD-Homologen zu isolieren. Sieben verschiedene Kombinationen von hochgradig degenerierten Oligonucleotiden (vgl. die nachstehende Tabelle) wurden bei den PCR-Reaktionen mit cDNA oder genomischer DNA als Matrizen verwendet. Nur eine Kombination ergab partielle Klone des Fusarium-~43 kD-Homologen. Zwei getrennte Sätze von PCR-Bedingungen wurden für jedes Oligonucleotidpaar gewählt; der erste Satz wurde festgelegt, um sehr wenig Produkt, jedoch mit sehr hoher Spezifität, zu erhalten. Verschiedene Faktoren stellten die Spezifität bei diesem Satz von 28 Zyklen sicher: Die Anellirungstemperatur von 65°C war sehr hoch für diese Oligonucleotide; die Zeit bei der Anellirungstemperatur wurde auf nur 30 Sekunden festgelegt; 20 Picomol jedes degenerierten Primergemisches wurden pro 100 µl Reaktionslösung verwendet. Die verwendeten Oligonucleotide enthielten nur eine degenerierte Region ohne ein „Klonierungselement"; eine Einheit Amplitay^R-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus) wurde pro 100 µl Reaktionslösung verwendet; und EDTA wurde zu den Reaktionsröhrchen am Ende der abschließenden 10-minütigen Inkubation bei 72°C gegeben, um eine Erweiterung von nicht-passenden Primern bei den Kühltemperaturen nach den PCR-Zyklen zu verhindern. Es war nicht zu erwarten, dass Produkte des ersten Satzes von Zyklen durch Ethidiumbromid-Anfärbung bei der Agarosegel-Elektrophorese sichtbar sein würden, und zwar aufgrund des niedrigen Wirkungsgrades der Amplifizie-

rung, der zur Sicherstellung der hohen Spezifität erforderlich war. Der zweite Satz von Amplifikationen wurde jedoch durchgeführt, um die Produkte aus dem ersten Satz in wirksamer Weise zu amplifizieren. Faktoren, um dies sicherzustellen, umfassen: Verringerung der Anellierungstemperatur auf 55°C; Verlängerung der Anellierungszeit auf 1 Minute, Erhöhung der Menge an Oligonucleotiden auf 100 Picomol jedes Gemisches pro 100 µl Reaktionslösung; Verwendung eines anderen Satzes von Oligonucleotiden, die ein „Prime"-Klonierungselement zusammen mit dem degenerierten Abschnitt umfassen (was die Schmelztemperatur dramatisch erhöht) und Verwendung von 2,5 Einheiten Amplitaq-Polymerase pro 100 µl Reaktionslösung.

[0088] Die PCR-Ansätze wurden durchgeführt, wie es von Perkin-Elmer-Cetus empfohlen wird. Ein Stammgemisch wurde für jede von zwei DNA-Quellen, nämlich genomische DNA und cDNA, angesetzt. Dies bestand aus 1 × PcR-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH-Wert 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,1% Gelatine; Perkin-Elmer-Cetus), 0,2 mM Desoxynucleotiden (Ultrapure^R dNTP, 100 mM Lösung, Pharmacia), 1 Einheit Amplitaq^R-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus) und 0,5 µg genomische DNA oder 50 ng cDNA pro 100 µl Reaktionsgemischvolumen und entionisiertem Wasser, um das Volumen auf 98 µl pro 100 µl Reaktionslösung zu bringen. Zu markierten, 0,5 ml fassenden Röhrchen (Eppendorf) wurden 20 Picomol (1 µl bei einer Konzentration von 20 Picomol/µl) der einzelnen Oligonucleotidgemische (vgl. nachstehende Tabelle) gegeben. Diese wurden in einem Perkin-Elmer-Cetus-Temperaturwechsler bei 75°C zusammen mit den Stammgemischen und leichtem Mineralöl (ebenfalls in den 0,5 ml fassenden Röhrchen) gegeben. 98 µl des entsprechenden Stammgemisches und 55 µl leichtes Mineralöl wurden in die einzelnen Röhrchen zusammen mit den Oligonucleotiden gegeben. Die Reaktionen wurden dann in einem „step-cycle file" gestartet (vgl. nachstehende Aufstellung für die Parameter). Am Ende der abschließenden Inkubation bei 72°C wurden 50 µl einer 10 mM EDTA-Lösung bei pH-Wert 8,0 zu jedem Röhrchen gegeben, und es erfolgte eine weitere 5-minütige Inkubation bei 72°C.

Tabelle von Oligonucleotidpaaren, die bei der PCR für das 43 kD-Homologe verwendet wurden:

Reaktion		Oligonucleotide für ersten Satz	Oligonucleotide für zweiten Satz, degeneriert nur mit „Prime“	Erwartete Größe in degenerierten Basenpaaren
cDNA	genomisch			
1	11	ZC3485/ZC3558	ZC3486/ZC3559	288
2	12	ZC3485/ZC3560	ZC3486/ZC3561	510
3	13	ZC3485/ZC3264	ZC3486/ZC3254	756
4	14	ZC3556/ZC3560	ZC3557/ZC3561	159
5	15	ZC3556/ZC3264	ZC3557/ZC3254	405
6	16	ZC3556/ZC3265	ZC3557/ZC3466	405
7	17	ZC3485/ZC3465	ZC3486/ZC3466	756

Anmerkung: Vgl. die Oligonucleotid-Tabelle für Oligonucleotid-Sequenzen

Die Bedingungen für die PCR im „step-cycle file“ waren:

Satz 1:			Satz 2:		
28 x	94°C	1 Min.	28 x	94°C	1 Min.
	65°C	30 Sec.		55°C	1 Min.
	72°C	2 Min.		72°C	2 Min.
	72°C	10 Min.		72°C	10 Min.

[0089] Nach dem ersten Satz von PCR-Zyklen wurde die DNA aus dem Reaktionsgemisch durch Fällung mit

Isopropylalkohol zur Verwendung im zweiten Satz von Zyklen gereinigt. Der größte teil des leichten Mineralöls wurde oben von jeder Probe vor der Überführung der Probe in ein neues markiertes Röhrchen entfernt. Jedes Röhrchen wurde dann mit einem gleichen Volumen an PCI (49% Phenol: 40% Chloroform: 2% Isoamlalkohol) und dann mit einem gleichen Volumen an Chloroform extrahiert. DNA wurde aus den Reaktionslösungen durch Zugabe von 75 µl 7,5 m Ammoniumacetat, 1 µl Glycogen und 226 µl Isopropylalkohol gefällt. Die Pellets wurden in 20 µl entionisiertem Wasser re-suspendiert. 2 µl jeder Suspension wurden in markierte Röhrchen für die zweite Runde der PCR-Amplifizierungen zusammen mit 100 Picomol (5 µl bei einer Konzentration von 20 Picomol/µl) jedes neuen Primergemisches (vgl. vorstehende Tabelle) gegeben. Das Stammgemisch wurde hergestellt, wie es vorstehend beschrieben wurde, mit der Ausnahme, dass genomische und cDNA-Matrizen weggelassen wurden und die erhöhten Oligonucleotid- und cDNA-Volumina in den Reaktionsröhrchen durch Verringerung des Volumens an zugegebenem Wasser ausgeglichen wurden. Die Reaktionen und Zyklen wurden durchgeführt, wie es vorstehend beschrieben wurde (vgl. die vorstehende Tabelle).

[0090] Nachdem die 28 Zyklen abgeschlossen waren, wurde das leichte Mineralöl oben von den Proben entfernt, und die PCR-Gemische wurden in neue Röhrchen überführt. 10 µl jeder Probe wurden auf Parafilm aufgetragen und bei 45°C für ungefähr 5 Minuten inkubiert, so dass das Volumen der Probe abnahm und der Parafilm restliches leichtes Mineralöl absorbierte. Die Tropfen wurden dann mit 2 µl 6 mal Aufgabefarbstoff vereinigt und einer Elektorphorese auf einem 1%igen Agarosegel (Seakem GTG™, FMC, Rockland, ME) unterworfen. Es wurde eine einzelne Bande von ungefähr 550 Basenpaaren im Reaktionsgemisch Nr. 2, wo die Matrize cDNA war, gefunden. Eine Bande von ungefähr 620 Basenpaaren wurde in Reaktionsgemisch Nr. 12 gefunden, wo die Matrize genomische DNA war. Bei diesen Reaktionen waren die Oligonucleotide ZC3486 und ZC3561 (Tabelle 1) Primer. Dies war sehr nahe zu dem 510 Basenpaar umfassenden PCR-Produkt, das durch den Vergleich mit der Humicola ~43 kD-Sequenz vorhergesagt wurde. Die Synthese eines größeren Produkts bei der Reaktion mit der genomischen Matrize hat ihre Ursache im Vorhandensein eines Introns innerhalb dieser Region. Die Agarose, die diese beiden banden enthielt, wurde ausgeschnitten, und DNA wurde unter Verwendung eines Prop-A-Gene™-Reagenssatzes (BioRad) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. DNA wurde mit 50 µl entionisiertem Wasser eluiert und mit 5 µl 3 m Natriumacetat, 1 µl Glycogen und 140 µl Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in einem Volumen von 7 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0; 1 mM EDTA) re-suspendiert.

[0091] Die PCR-Fragmente wurden in den Vektor pBS sk-'kloniert, der konstruiert wurde, indem zuerst pBluescript II sk- (Stratagene, La Jolla, CA) mit EcoRI verdaut und das geschnittene Plasmid aus 0,8% Seaplaque GTG™-Agarose (FMC) mit einem Prop-A-Gene™-Reagnessatz (BioRad) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt wurde. Die Oligonucleotide ZC1773 und ZC1774 (Tabelle 1) wurden durch Mischen von zwei Picomol jedes Oligonucleotids, Erhöhung des Reaktionsvolumens auf 4 µl mit entionisiertem Wasser, anschließende Zugabe von 0,5 µl Anellierpuffer (200 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,6; 50 mM $MgCl_2$), Erhöhung der Temperatur auf 65°C für 30 Sekunden und langsames Abkühlen auf 20°C in 20 Minuten in einem Perkin-elmer-Cetus-PCR-Temperaturwechsler anelliert. Die Oligonucleotide wurden dann in den mit EcoRI verdauten pBluescript-Vektor durch Mischen von 5,5 µl entionisiertem Wasser, 2 µl anellierte Oligonucleotide, 1 µl einer Verdünnung des verdauten Vektors von 1 : 3 in entionisiertem Wasser, 1 µl 10 mal T4 DNA-Ligasepuffer (Boehringer-Mannheim Biochemicals, Indianaposlis, IN) und 0,5 T4-DNA-Ligase (Gibco-BRL) und Inkubieren des Gemisches bei 16°C für 2,5 Stunden ligiert. Das Ligationsgemisch wurde anschließend auf eine Volumen von 100 µl mit entionisiertem Wasser gebracht und mit PCI und Chloroform extrahiert. Um den Elektroporations-Wirkungsgrad zu erhöhen, wurde die DNA dann mit 50 µl Ammoniumacetat, 1 µl Glycogen und 151 µl Isopropanol gefällt. 1 µl einer erneut hergestellten Suspension von 10 µl in entionisiertem Wasser wurden dann durch Elektroporation in E. coli DH10-B Elektromax-Zellen (Gibco-BRL) unter Anwendung der Anweisungen des Herstellers in einer Bio-Rad-Elektroporationsvorrichtung gebracht. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde 1 ml 2 mal YT-Brühe (pro Liter: 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 10 g NaCl) in die Küvette gegeben und gemischt. Verschiedene Verdünnungen wurden auf 100 mm-LB-Platten (pro Liter: 10 g Trypton, 8 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 14,5 g Agar) mit 100 µg/ml Ampicillin plattiert und mit 100 µl an 20 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid; Sigma, St. Louis, MO) in Dimethylformamid und 20 µl an 1 m IPTG (Sigma) überschichtet. Nach Wachstum über Nacht wurden verschiedene blaue und weiße Kolonien durch PCR auf kleine Inserts unter Verwendung der Oligonucleotide ZC3424 (reverser Bluescript-Primer) und ZC3425 (T7-Promoter-Primer) (Tabelle 1) analysiert, indem man den vorstehend angegebenen Bedingungen für das Absuchen von bakteriellen Plaques folgte. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 94°C für 1 Minute 45 Sekunden wurden 30 Zyklen bei 94°C für 45 Sekunden, 40°C für 30 Sekunden und 72°C für 1 Minute durchgeführt. Bei Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Produkte wurde eine blaue Kolonie, die zu einer PCR-Bande führte, die konsistent mit einem kleinen Insert in der pBluescript-Klonierungsregion war, für die DNA-Reinigung ausgewählt und über Nacht in einer 100 ml umfassenden flüssigen Kultur in TB (pro Liter: 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, Autoklave. Anschließende Zugabe von 100 ml 0,17 m KH_2PO_4, 0,72 m KH_2PO_4; Sambrook et al., Molecular Cloning, 2. Auflage, 1989, A.2) mit 150 µg/ml Ampicillin gezüchtet. DNA wurde durch alkalische Lyse und PEG-Fällung isoliert (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2. Auflage, 1.38–1.41, 1989).

Die Sequenzanalyse zeigte, dass das korrekte Oligonucleotid inseriert war, während das (β-Galactosidasegen, das in pBluescript-Vektoren vorhanden ist, im Rahmen mit dem Promoter blieb. 50 µg der DNA-Zubereitung wurde mit EcoRI verdaut, mit PCl und Chloroform extrahiert und mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl entionisiertem Wasser re-suspendiert. Verdautes pBS sk-' wurde mit T4-DNA-Plymerase (Gibco-BRL) durch Zugabe von 50 µl 10 mal T4-DNA-Polymerase-Puffer (0,33 m Tris-Acetat; pH-Wert 8,0; 0,66 m Kaliumacetat; 0,1 m Magnesiumacetat; 5 mM Dithiothreit; 5 mM BSA (New England Biolabs); 260 µl entionisiertes Wasser, 40 µl 1 mM dTTP (Ultrapure™, Pharmacia) und 40 µl T4-DNA-Polymerase (1 U/µl) (Gibco-BRL) zu 20 µl an 1 mg/ml Vektor-DNA zurückgeschnitten. Das Gemisch wurde 15 Minuten bei 12°C und anschließend 10 Minuten bei 75°C inkubiert. Um die DNA für die Verwendung bei Ligation herzustellen, erfolgte eine Extraktion mit PCl und Chloroform und eine Fällung mit Natriumacetat und Ethanol. Das Pellet wurde in 200 µl entionisiertem Wasser re-suspendiert, was zu einer Konzentration von 0,1 µg/µl führte.

[0092] Um die PCR-Produkte des 43 kD-Homologen für die Insertion in den zurückgeschnittenen Vektor pBS sk-' vorzubereiten, wurden sie mit T4-DANN-Polymerase (Gibco-BRL) in Reaktionsvolumina von 10 µl unter Einschluss von dATP anstelle von dTTP zurückgeschnitten. Die erhaltenen DNA-Lösungen wurden mit PCl und Chloroform extrahiert und mit Natriumacetat, Glycogen und Ethanol gefällt. Die DNA-Pellets wurden in 15 µl entionisiertem Wasser resuspendiert. DNA-Proben von 7,5 µl wurden in 0,1 µg geschnittenes pBS sk-' (0,1 µg/µl) mit 1 µl 10 mal Ligasepuffer (Boehringer Mannheim) und 0,5 µl T4-DNA-Ligase (Boehringer-Mannheim) ligiert. Die Ligationsgemische wurden dann auf ein Volumen von 150 µl mit entionisiertem Wasser gebracht und mit PCl und Chloroform extrahiert. Um den Elektorporations-Wirkungsgrad zu erhöhen, wurde die DNA dann mit 15 µl Natriumacetat, 1 µl Glycogen und 166 µl Isopropanol gefällt. 1 µl einer 10 µl Suspension in entionisiertem Wasser wurde durch Elektroporation in E. coli DH10-B-Elektromax-Zellen (BRL) unter Verwendung einer Bio-Rad-Elektroporationsvorrichtung gemäß den Anweisungen des Herstellers gebracht. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde 1 ml SOB-Brühe (pro Liter: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 ml 1 m $MgSO_4$) in die Küvette gegeben, und das Zellgemisch wurde in ein 100 mm-Röhrchen überführt und 1 Stunde bei 37°C unter Belüftung inkubiert. Verschiedene Verdünnungen wurden auf 100 mm-LB-Platten mit einem Gehalt an 100 µg/ml Ampicillin plattiert und mit 100 µl 20 mg/ml X-Gal (Sigma) in Dimethylformamid und 20 µl 1 m IPTG (Sigma) überschichtet. Drei weiße Kolonien jeder der beiden Transformationen (cDNA und genomisch) wurden zum Sequenzieren aufgenommen. Die Sequenzanalyse zeigte, dass die Inserts hochgradig homolog zur Humicola 43-kD-Cellulase waren. Das genomische Insert war identisch zur cDNA mit Ausnahme des Vorhandenseins eines Introns. Zwei 42-mere Oligonucleotide ZC3709 und ZC3710 (Tabelle 1) wurden aus der Sequenz für die Verwendung als Bibliothekssonden und PCR-Primer entworfen. Die Oligonucleotide stammten von entgegengesetzten Enden des PCR-Produkts und wurden so entworfen, dass sie mit entgegengesetzten Strängen der DNA hybridisierten, so dass sie als Primer in einer PCR-Reaktion zur Untersuchung möglicher Klone beim Absuchen der Bibliothek verwendet werden konnten.

Konstruktion einer cDNA-Bibliothek von Fusarum oxysporum

[0093] Fusarum oxysporum wurde durch Fermentation gezüchtet, und Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten zur RNA-Extraktion und Cellulase-Aktivitäts-Analyse entnommen. Die Aktivitäts-Analyse umfasste einen Assay auf die gesamte Cellulase-Aktivität sowie einen Assay auf die Farbklärung. Aus Proben von Fusarium oxysporum, die eine maximale Farbklärung zeigten, wurde die gesamte RNA extrahiert, woraus Poly(A)+RNA isoliert wurde.

[0094] Um eine cDNA-Bibliothek von Fusarum oxysporum aufzustellen, wurde ein Erststrang-cDNA in zwei Reaktionen synthetisiert, und zwar einer mit radioaktiv markiertem dATP und einer ohne radioaktiv markiertes dATP. Ein 2,5 mal Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur durch Mischen der nachstehenden Reagentien in der angegebenen Reihenfolge hergestellt: 10 µl 5 mal reverse Transkriptase-Puffer (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland), 2,5 µl 200 mM Dithiothreit (frisch hergestellt oder aus einer bei –70°C gelagerten Stammlösung) und 2,5 µl eines Gemisches, das 10 mM jedes Desoxynucleotidtriphosphats (dATP, dGTP, dTTP und 5-Methyl-dCTP, bezogen von Pharmacia LKB Biotechnology, Alameda, CA) enthielt. Das Reaktionsgemisch wurde auf zwei Röhrchen von 7,5 µl aufgeteilt. 1,3 µl an 10 µCi/µl ^{32p}-α-dATP (Amersham, Arligton Heights, IL) wurden zu einem Röhrchen gegeben, und 1,3 µl Wasser zum anderen. 7 µl jedes Gemisches wurden in Röhrchen für die endgültige Reaktion gegeben. In einem getrennten Röhrchen wurden 5 µg Fusarium oxysporum-Poly(A)+RNA in 14 µl an 5 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 50 µMolar EDTA mit 2 µl an 1 µg/µl Erststrangprimer (ZC2938 GACAGAGCACAGAATTCACTAGTGAGCTCT$_{15}$) gemischt. Das RNA-Primer-Gemisch wurde 4 Minuten auf 65°C erwärmt, in Eiswasser abgekühlt und kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. 8 µl des RNA-Primer-Gemisches wurden in die Röhrchen für die endgültige Reaktion gegeben. 5 µl an 200 U/µl reverse Transkriptase Superscript™ (Gibco-BRL) wurden in jedes Röhrchen gegeben. Nach leichtem Schütteln wurden die Röhrchen 30 Minuten bei 45°C inkubiert. 8 µl an 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 1 mM EDTA wurden in jedes Röhrchen gegeben, und die Proben wurden einer Vortex-Behandlung unterzogen und kurz zentrifugiert. 3 µl wurden aus jedem Röhrchen entnommen, um die Zählrate, die durch TCA-Fällung einverleibt

wurde, und die gesamten Zählraten der Reaktionslösungen zu bestimmen. Eine Probe von 2 µl aus jedem Röhrchen wurde durch Gelelektrophorese analysiert. Der Rest jeder Probe wurde mit Ethanol in Gegenwart von Austerglycogen gefällt. Die Nucleinsäuren wurden durch Zentrifugation pelletiert, und die Pellets wurden mit 80 Ethanol gewaschen. Anschließend an das Waschen mit Ethanol wurden die Proben 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die Synthese des ersten Strangs ergab 1,6 µg an Fusarium oxysporum-cDNA, eine 33%ige Umsetzung von Poly(A)+RNA in DNA.

[0095] Die Synthese des zweiten cDNA-Strangs wurde mit dem RNA-DNA-Hybrid aus den Reaktionen für den ersten Strang unter Bedingungen durchgeführt, die die Nutzung des ersten Strangs als Primer für die Synthese des zweiten Strangs unter Bildung von Haarnadel-DNA forderten. Die Erststrangprodukte aus jeder der beiden Erststrangreaktionen wurden in 71 µl Wasser re-suspendiert. Die nachstehenden Reagentien wurden bei Raumtemperatur zu den Reaktionsröhrchen gegeben: 20 µl an 5 mal Zweitstrangpuffer (100 mM Tris, pH-Wert 7,4; 450 mM KCl; 23 mM $MgCl_2$ und 50 mM $(NH_4)SO_4$), 3 µl an 5 mM β-NAD und µl eines Desoxynucleotidtriphosphat-Gemisches mit jedem bei 10 mM. 1 µl an α^{32p}-dATP wurde zu dem Reaktionsgemsich gegeben, bei dem nicht-markiertes dATP für die Synthese des ersten Strangs eingesetzt wurde, während in das Röhrchen, bei dem markiertes dATP für die Synthese des ersten Strangs eingesetzt worden war, 1 µl Wasser gegeben wurde. In jedes Röhrchen wurden dann 0,6 µl an 7 U/µl E. coli-DNA-Ligase (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 3,1 µl an 8 U/µl E. coli-DNA-Polymerase I (Amersham) und 1 µl an 2 U/µl RNase H (Gibco-BRL) gegeben. Die Reaktionslösungen wurden 2 Stunden bei 16°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2 µl aus jeder Reaktionslösung wurden durch Gelelektrophorese analysiert. Zum Rest jeder Probe wurden 2 µl an 2,5 µg/µl Austerglycogen, 5 µl an 0,5 EDTA gegeben. Die Proben wurden mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation wurden die Pellets mit 100 µl 80% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Ausbeute an doppelsträngiger cDNA betrug ei jeder der Reaktionen ungefähr 2,5 µg.

[0096] Eine Behandlung mit Mungobohnen-Nuclease wurde durchgeführt, um die einzelsträngige DNA der Haarnadel zu schneiden. Jedes cDNA-Pellet wurde in 15 µl Wasser re-suspendiert, und 2,5 µl an 10 mal Mungobohnen Puffer (0,3 m NaAc, pH-Wert 4,6; 3 m NaCl und 10 mM $ZnSO_4$), 2,5 µl an 10 mM DTT, 2,5 µl an 50% Glycerin und 2,5 µl an 10 U/µl Mungobohnen-Nuclease (New England Biolabs, Beverly, MA) wurden in jedes Röhrchen gegeben. Anteile von 2 µl wurden durch alkalische Agarosegelanalyse analysiert. 100 µl an 1 m Tris-HCl, pH-Wert 7,4 wurden in jedes Röhrchen gegeben, und die Proben wurden 2 mal mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Ausbeute betrug etwa 2 µg an DNA für jede der beiden Reaktionen.

[0097] Die cDNA-Enden wurden durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase stumpf gemacht. DNA aus beiden Proben wurde nach erneutem Suspendieren in einem Gesamtvolumen von 24 µl Wasser kombiniert. 4 µl an 10 mal T4-Puffer (330 mM Tris-Acetat, pH-Wert 7,9; 670 mM Kac; 100 mM MgAc und 1 mg/ml Gelatine), 4 µl an 1 U/µl an T4-DANN-Polymerase (Boehringer-Mannheim) wurden zu der DNA gegeben. Die Proben wurden 1 Stunde bei 15°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 160 µl an 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 1 mM EDTA zugegeben, und die Probe wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die Dann wurde mit Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde die DNA mit 80% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

[0098] Nach dem erneuten Suspendieren der DANN in 6,5 µl Wasser wurden EcoRI-Adapter an die stumpf gemachte DNA addiert. 1 µl an 1 µg/µl EcoRI-Adapter (Invitrogen, San Diego, CA, Kat. Nr. N409-20), 1 µl an 10 mal Ligasepuffer (0,5 tris, pH-Wert 7,8 und 50 mM $MgCl_2$), 0,5 µl an 10 mM ATP, 0,5 µl an 100 mM DTT und 1 µl an 1 U/µl T4-DNA-Ligase (Boehringer-Mannheim) wurden zu der DNA gegeben. Nachdem die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden war, wurde die Ligase durch Erwärmen auf 65°C für 15 Minuten denaturiert.

[0099] Die Sst I-Klonierungsstelle, die vom Erststrangprimer kodiert wurde, wurde einem Verdau mit der Sst I-Endonuclease ausgesetzt. 33 µl Wasser, 5 µl an 10 mal Sst I-Puffer (0,5 Tris, pH-Wert 8,0; 0,1 m $MgCl_2$ und 0,5 m NaCl) und 2 µl an 5 U/µl Sst I wurden zu der DNA gegeben, und die Proben wurden 2 Stunden bei 37°C induziert. 150 µl an 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 1 mM EDTA wurden zugegeben, und die Proben wurden mit Phenol-Chloroform extrahiert, und die DNA wurde mit Isopropanol gefällt.

[0100] Die cDNA wurde einer Chromatographie über eine Sepharose Cl 2B-Säule (Pharmacia LKB Biotechnology) zur Größenselektion der cDNA und zur Entfernung freier Adapter unterworfen. Eine Säule von 1,1 ml mit Sepharose CL 2B wurde in eine 1 ml Kunststoff-Wegwerfpipette gegossen, und die Säule wurde mit 50 Säulenvolumina an Puffer (10 mM Tris, pH-Wert 7,4 und 1 mM EDTA) gewaschen. Die Probe wurde aufgetragen, Fraktionen von 1 Tropfen wurden gesammelt, und die DANN in dem Hohlraumvolumen wurde vereinigt. Die fraktionierte DNA wurde mit Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation wurde die DNA mit 80% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

[0101] Eine cDNA-Bibliothek von Fusarium oxysporum wurde aufgestellt, indem die cDNA an den Vektor pYcDE8' (vgl. WO 90/10698) ligiert wurde, der mit EcoRI und Sst I verdaut worden war. 390 ng Vektor wurden

an 400 ng cDNA in 80 µl Ligationsreaktionslösung mit einem Gehalt an 8 µl 10 mal Ligasepuffer, 4 µl mM ATP, 4 µl 200 mM DTT und 1 Einheit T4-DNA-Ligase (Boehringer-Mannheim) ligiert. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden 5 µg Austerglycogen und 120 µl an 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA zugegeben, und die Probe wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und zentrifugiert, und das DNA-Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen. Nach Trocknen an der Luft wurde die DANN in 3 µl Wasser re-suspendiert. 38 µl Elektroporations-kompetente DH10B-Zellen (Gibco-BRL) wurden zu der DNA gegeben, und die Elektroporation wurde mit einem Bio-Rad-Gene-Pulser (Modell Nr. 1652076) und Bio-Rad-Pulse-Controller (Modell Nr. 1652098) in einer Elektroporationseinheit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) abgeschlossen. 4 ml SOC (Hanahan, J. Mol. Biol., Bd. 166 (1983), S. 557–580) wurden zu den der Elektroporation unterzogenen Zellen gegeben, und 400 µl der Zensuspension wurden auf jeder von 10 150 mm-LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht wurden 10 ml LB-amp-Medium zu jeder Platte gegeben, und die Zellen wurden in das Medium abgeschabt. Glycerin-Stammlösungen und Plasmidzubereitungen wurden von jeder Platte hergestellt. Es wurde festgestellt, dass der Bibliothekshintergrund (Vektor ohne Insert) ungefähr 1% betrug, und zwar durch Ligation des Vektors ohne Insert und Titrieren der Anzahl der Klone nach der Elektroporation.

[0102] Um Volllängen-cDNA-Klone des 43 kD-Homologen zu isolieren, wurde eine Bibliothek von 1,1 Millionen Klonen auf 150 mm-LB-Platten mit 100 µl/ml Ampicillin plattiert. 100 000 Klone wurden aus Glycerin-Stammlösungen auf jede von 10 Platten plattiert, und 20 000 Klone wurden auf jede von 5 Platten ausplattiert. Material wurde doppelt entnommen, wie es vorstehend beschrieben wurde. Zwei endmarkierte 42-mere Oligonucleotide, nämlich ZC3709 und ZC3710 (die für das 43 kD-Homologe spezifische sind), wurden für die Hybridisierung verwendet. Filter wurden einmal 20 Minuten mit TMACL bei 77°C gewaschen. 22 Flecken, die sich auf doppelten Filtern zeigten, wurden festgestellt. Entsprechende Bereiche auf den Platten wurden mit dem großen Ende einer Pipette in i ml 1 mal PCR-Puffer aufgenommen. Diese isolierten Analysen durch PCR erfolgten mit 2 Sätzen von Oligonucleotiden für jede Isolierung. Ein Satz enthielt zwei 43 kD-spezifische Oligonucleotide, die als Hybridisierungssonden verwendet wurden, und der andere enthielt ein 43 kD-spezifisches Oligonucleotid, nämlich ZC3709, und ein vektorspezifisches Oligonucleotid, nämlich ZC3634. Eine PCR wurde wie vorstehend gemäß der Perkin-Elmer-Cetus-Anleitungen durchgeführt. 20 Picomol jedes Primers und 5 µl der Zellsuspension wurden in jedem Reaktionsgemisch von 50 µl verwendet. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 94°C für 1 Minute 30 Sekunden wurden 30 Zyklen von 1 Minute bei 94°C und 2 Minuten bei 72°C durchgeführt, wobei die abschließende Erweiterungszeit 10 Minuten bei 72°C betrug. Die Ergebnisse zeigten, dass 17 der 22 die beiden 43 kD-spezifischen Oligonucleotid-Erkennungstellen enthielten. Die restlichen 5 Klone enthielten eine der beiden Stellen, ZC3709, durch PCR mit dem vektorspezifischen Primer wurde jedoch gezeigt, dass sie verkürzt und nicht lang genug waren, um die andere Stelle zu enthalten. Die 9 längsten Klone wurden für die Einzelkolonie-Isolierung durch eine weitere stufe des Absuchens ausgewählt. 5–10-fache Verdünnungen von jedem wurden ausplattiert und verarbeitet, wie es vorstehend für den ersten Satz von entnommenen Materialien beschrieben wurde. Alle 9 wiesen Signale auf Autoradiogrammen der zweiten Stufe des Absuchens auf. Die Kolonien waren recht dicht angeordnet, so dass wenige getrennte Kolonien im Bereich des radioaktiven Signals einzelne Kolonien waren, die auf 150 mm-LB-Platten mit 70 µl/ml Ampicillin isoliert wurden. Diese wurden durch PCR auf Homologe der ~43 kD-Endoglucanase mit den Oligonucleotiden ZC3709 und ZC3710, wie es vorstehend für die erste stufe des Absuchens beschrieben worden war, untersucht, mit Ausnahme, dass die Kolonien mit einem Zahnstocher in 25 µl Stammgemisch aufgenommen wurden. Banden der erwarteten Größe wurden für 7 der 9 Klone erhalten. Kulturen davon wurden in 20 ml „Terrific Broth" mit 150 µl/ml Ampicillin angesetzt. DNA wurde durch alkalische Lyse und PEG-Fällung wie zuvor isoliert.

DNA-Sequenzanalyse

[0103] Die cDNAs wurden im Hefeexpressionsvektor pYCDE8' sequenziert. Die Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 74 (1977), S. 5463–5467) unter Verwendung von @35-S dATP von New England Nuclear (vgl. M. D. Biggin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, BD. 80 (1983), S. 3963–3965) wurde für alle Sequenzierreaktionen angewandt. Die Reaktionen wurden durch modifizierte T7-DNA-Polymerase von Pharmacia (vgl. S. Tabor und C. C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 84 (1987), S. 4767–4771) katalysiert, und als Primer wurden ein Oligonucleotid, das komplementär zum ADH1-Promoter (ZC996: ATT GTT CTC GTT CCC TTT CTT) war, oder Oligonucleotide, die komplementär zur fraglichen DNA waren, verwendet. Doppelsträngige Matrizen wurden mit NaOH denaturiert (E. Y. Chen und P. H. Seeburg, DNA, Bd. 4 (1985), S. 165–170), und zwar vor der Hybridisierung mit einem Sequenzier-Oligonucleotid. Oligonucleotide wurden mit einem Applied Biosystems Modell 380A-DNA-Syntheseautomaten synthetisiert. Die Oligonucleotide, die für die Sequenzierreaktionen verwendet wurden, sind in der nachstehenden Oligonucleotid-Tabelle angegeben:

Tabelle 1
Oligonucleotide für die PCR für das 43 kD-Homologe:

ZC3485 TGG GA(C/T) TG(C/T) TG(C/T) AA(A/G) CC

ZC3486 AGG GAG ACC GGA ATT CTG GGA (C/T)TG (C/T)TG (C/T) AA(A/G) CC

ZC3556 CC(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GG(A/C/G/T) GT(A/C/G/T) GG

ZC3557 AGG GAG ACC GGA ATT CCC (A/C/G/T)GG (A/C/G/T)GG (A/C/G/T)GG (A/C/G/T)GT (A/C/G/T)GG

ZC3558 AC(A/C/G/T) A(C/T)C AT(A/C/G/T) (G/T)T/C/T) TT(A/C/G/T) CC

ZC3559 GAC AGA GCA CAG AAT TCA C(A/C/G/T)A (C/T)CA T(A/C/G/T)(G/T) T(C/T)T T(A/C/G/T)C C

ZC3560 (A/C/G/T)GG (A/G)TT (A/G)TC (A/C/G/T)GC (A/C/G/T)(G/T)(C/T) (C/T)T(C/T) (A/G)AA CCA

ZC3561 GAC AGA GCA CAG AAT TC(A/C/G/T) GG(A/G) TT(A/G) TC(A/C/G/T) GC(A/C/G/T) (G/T)(C/T)(C/T) T(C/T)(A/G) AAC CA

Oligonucleotide für die Klonierung des 43 kD-Homologen:

ZC3709 GGG GTA GCT ATC ACA TTC GCT TCG GGA GGA GAT ACC GCC GTA

ZC3710 CTT CTT GCT CTT GGA GCG GAA AGG CTG CTG TCA ACG CCC CTG

PYCDE8'-Vektor-Oligonucleotide:

ZC3635 TGT ACG CAT GTA ACA TTA [illegible] CYC 1 terminator

ZC3634 CTG CAC AAT ATT TCA AGC ADH 1 promoter

Spezifische Sequenzierprimer für das 43 kD-Homologe:

ZC3709 GGG GTA GCT ATC ACA TTC GCT TCG GGA GGA GAT ACC GCC GTA

ZC3710 CTT CTT GCT CTT GGA GCG GAA AGG CTG CTG TCA ACG CCC CTG

ZC3870 AGC TTC TCA AGG ACG GTT

ZC3881 AAC AAG GGT CGA ACA CTT

ZC3882 CCA GAA GAC CAA GGA TT

Beispiel 4

Farbklärtest

[0104] Die Humicola ~43 kD-Endoglucanase (ein Gemisch aus 30 Reinigungsansätzen) wurde in einem Farbklärtest mit dem H. insolens-Cellulase-Präparat, das in US 4 435 307, Beispiel 6, beschrieben ist, verglichen.

[0105] Alte, getragene, schwarze Baumwolltücher wurden als Testmaterial verwendet. Der Klärtest wurde in einem „Terg-O-tomer" durchgeführt, wobei 3 wiederholte Waschfänge durchgeführt wurden. Zwischen den Waschgängen wurden die Tücher über Nacht getrocknet.

Bedingungen

[0106] 2 g/l Flüssigdetergens bei 40°C für 30 Minuten und einer Wasserhärte von 9° dH. Die Größe der Tü-

cher betrug 10 × 15 cm, und es waren zwei Tücher in jedem Becherglas.
[0107] Die Zusammensetzung des Detergens war wie folgt:
10% anionisches oberflächenaktives Mittel (Nansa 1169/p)
15% nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel (Berol 160)
10% Ethanol
5% Triethanolamin
60% Wasser
pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Dosierung

[0108] Die beiden Enzyme wurden mit 63 und 125 CMC-Endoase-Einheiten/1 dosiert.

Ergebnisse

[0109] Die Ergebnisse wurden von einer Gruppe von 22 Personen bewertet, die die Tücher auf einer Skala von 1 bi 7 Punkten einstuften. Je höher die Bewertung, um so stärker war die erzielte Farbklärung.

Enzyme	CMC-Endoase/l	Protein mg/l	PSU*
Kein Enzym			1,4 ± 1,0
H. insolens-Cellulase-Gemisch	63	14	5,8 ± 1,0
	125	28	6,1 ± 1,0
Erfindung	63	0,4	4,6 ± 0,9
	125	0,8	6,2 ± 0,8
*PSU = Panel-Bewertungseinheiten			

[0110] Es wird gezeigt, das die ~43 kD-Endoglucanase eine etwa 30-fach bessere Leistungsfähigkeit als das H. insolens-Cellulase-Gemsich nach dem Stand der Technik und eine etwa 6-fach bessere Leistungsfähigkeit als das Cellulase-Präparat gemäß WO 89/09259 aufweist.

Beispiel 5

[0111] Stabilität der Humicola ~43 kD-Endoglucanase in Gegenwart von Proteasen Die Lagerstabilität der ~43 kD-Endoglucanase in Flüssigdetergentien in Gegenwart von verschiedenen Proteasen wurde unter den folgenden Bedingungen bestimmt:

Enzyme

~43 kD-Endoglucanase der Erfindung
Glu/Asp-spezifische B. licheniformis-Serinprotease
Trypsin-ähnliche Fusarium sp. DSM 2672-Protease
B. lentus-Serinprotease
Subtilisin Novo

Detergens

[0112] Handelsübliches flüssiges US-Detergens ohne Trübungsmittel, Parfum oder Enzyme (abgesehen von denen, die im Versuch zugegeben wurden). ±1% (Gew./Gew.) Borsäure als Enzymstabilisator.

Dosierung

Endoglucanase:	12 CMCU/g Detergens
Proteasen:	0,2 mg/g Detergens

Inkubation

7 Tage bei 35°C

Restaktivität

[0113] Die Restaktivität der Endoglucanase nach 7 Tagen der Inkubation mit den entsprechenden Proteasen wurde als ihre CMCase-Aktivität (CMCU) bestimmt.
[0114] Die CMCase-Aktivität wurde wie folgt bestimmt:
[0115] Eine Substratlösung von 30 g/l CMC (Hercules 7 LFD) in entionisiertem Wasser wurde hergestellt. Die Enzymprobe, die untersucht werden sollte, wurde in 0,01 m Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5 gelöst. 1,0 ml der Enzymlösung und 2,0 ml 0,1 m Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5 wurden in einem Teströhrchen gemischt, und eine Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 1,0 ml der Substratlösung in das Teströhrchen eingeleitet. Das Gemisch wurde 20 Minuten bei 40°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,0 ml 0,125 m Trinatriumphosphat $12H_2O$ abgebrochen. Eine Blindprobe wurde ohne Inkubation hergestellt.
[0116] 2,0 ml einer Hexacyanoferrat(III)-Lösung (1,60 g Kaliumhexacyanoferrat(III) und 14,0 g Trinatriumphosphat $12H_2O$ in 1 l entionisiertem Wasser) wurde zur Testprobe sowie zur Blindprobe, gegeben unmittelbar gefolgt von Eintauchen in kochendes Wasser und Inkubation für 10 Minuten. Nach der Inkubation wurden die Proben mit Leitungswasser gekühlt. Die Extinktion bei 420 nm wurde gemessen, und eine Eichkurve wurde mit Glucoselösung aufgestellt.
[0117] 1 CMCase-Einheit (CMCU) ist als die Menge an Enzym definiert, die unter den vorstehend angegebenen Bedingungen eine Menge an reduzierenden Kohlenhydraten bildet, die 1 µMol Glucose pro Minute entspricht.

Ergebnisse

[0118] Die Lagerstabilität der erfindungsgemäßen Endoglucanase wurde als ihre Restaktivität (in CMCU,%) unter den vorstehend angegebenen Bedingungen bestimmt.

Protease	Restaktivität (%)	
	+ Borsäure	- Borsäure
Glu/Asp-spezifisch Tryp-	105	93
sin-ähnlich	77	63
B. lentus-Serin	57	24
Subtilisin Novo	63	55

[0119] Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lagerstabilität der erfindungsgemäßen Endoglucanase in flüssigen Detergentien verbessert wird, wenn eine Protease mit einem höheren Grad an Spezifität als Savinase der Detergens-Zusammensetzung einverbleibt wird.

Beispiel 6

[0120] Verwendung von Humicola ~43 kD-Endoglucanase, um für eine lokalisierte Variation der Farbe von textilen Denim-Stoffen zu sorgen
[0121] Denim-Jeans wurden einer Behandlung mit der ~43 kD-Endoglucanase in einem 12 kg „Wascator" FL120-Waschextraktor im Hinblick auf eine lokalisierte Variation der Oberflächenfarbe der Jeans, die ungefähr einem "„Stone-Washed"-Erscheinungsbild entsprach, unterworfen.
[0122] 4 Paare von Jeans wurden pro Maschinenbeladung verwendet. Die experimentellen Bedingungen waren wie folgt:

Entschlichtung

40 l Wasser
100 ml B. amyloliquefaciens-Amylase*, 120 l
70 kg KH_2PO_4
30 g Ma_2HPO_4

55°C
10 Minuten
pH-Wert: 6,8
*erhältlich von Novo Nordisk A/S.

[0123] Dem entschlichtungsverfahren folgte eine Entwässerung.

Scheuern

40 l Wasser
120 g H. insolens-Cellulase-Gemisch oder mal g ~43 kD-Endoglucanase
70 g KH_2PO_4
30 g Na_2HPO_4
55°C
75 Minuten
pH-Wert: 6,6

[0124] Dem Scheuerverfahren folgten Entwässerung, Spülen, Nachwaschen und Spülen.
[0125] Die Ergebnisse wurden bewertet, indem das visuelle Erscheinungsbild der Jeans beurteilt wurde.
[0126] Es wurden verschiedene Dosierungen der ~43 kD-Endoglucanase verwendet, um einen Scheuergrad zu erzielen, der äquivalent zu dem war, der mit 120 g H. insolens-Cellulase-Gemisch erzielt wurde. Ein derartiger äquivalenter Grad wurde mit 1,0 bis 1,25 g ~43 kD-Endoglucanase erzielt. Messungen der Reißfestigkeit der behandelten Kleidungsstücke zeigten keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Enzymbehandlungen.

Beispiel 7

[0127] Verwendung der Humicola ~43 kD-Endoglucanase zur Entfernung von Faserstückchen von der Oberfläche von textilen Stoffen
[0128] Gewebe aus 100% Baumwolle wurden mit der ~43 kD-Endoglucanase in einem 12 kg „Wascator" FL120-Waschextraktor im Hinblick auf die Untersuchung der Fähigkeit des Enzyms behandelt, neuen textilen Stoffen einen höheren Grad an Weichheit zu verleihen.
[0129] Die experimentellen Bedingungen waren wie folgt:

Textiler Stoff

[0130] Gewebe aus 100% Baumwolle wurden von Nordisk Textil erhalten, und zwar gebleicht (NT2116-b) oder ungebleicht (NT2116-ub). 400 g textiler Stoff wurden pro Maschinenladung verwendet.

Entschlichtung

40 l Wasser
200 ml B. amyloliquefaciens-Amylase, 120 l
60 g KH_2PO_4
20 g Na_2HPO_4
60°C
10 Minuten
pH-Wert: 6,4

[0131] Dem Entschlichtungsverfahren folgte eine Entwässerung.

Hauptwaschgang

40 l Wasser
0–600 g H. insolens-Cellulase-Gemisch oder mal g ~43 kD-Endoglucanase
60 g KH_2PO_4
40 g Na_2HPO_4
60°C
60 Minuten
pH-Wert: 6,7

[0132] Der Scheuerstufe folgte eine Entwässerung.

Nachwaschen

40 l Wasser
40 g Na_2CO_3
10 g Berol 08
80°C
15 Minuten
pH-Wert: 10,0

[0133] Dem Nachwaschen folgte ein Spülen.
[0134] Drei verschiedene Konzentrationen der ~43 kD-Endoglucanase wurden im Hauptwaschgang zugegeben.
[0135] Der Gewichtsverlust der Proben des textilen Stoffs wurde vor und nach der Behandlung gemessen. Der Gewichtsverlust wird als % ausgedrückt und auf den entschlichteten textilen Stoff bezogen.
[0136] Die Dicke des textilen Stoffs wurde mittels einer Dickenmessvorrichtung L & W Typ 22/1 gemessen. 2 Tücher des textilen Stoffs (10 × 6 cm) wurden vermessen, und 5 Messungen in um wurden für jedes Tuch aufgezeichnet. Das Tuch wurde bei einem druck von 98,07 kPa vermessen. Die verbliebene Dicke wird in% in Bezug zum entschlichteten textilen Stoff ausgedrückt.
[0137] Die Festigkeit des textilen Stoffs wurde mittels einer Reißtestvorrichtung (Elmendorf 09) gemessen. 6 Tücher (10 × 6 cm) wurden in Kettenrichtung geschnitten, und 6 Tücher (10 × 6 cm) wurden in Schussrichtung geschnitten. Die Reißfestigkeit wurde in mN gemäß ASTM D 1424 gemessen. Die Festigkeit der enzymbehandelten textilen Stoffe wird in % in Bezug auf den entschlichteten textilen Stoff ausgedrückt.
[0138] Die Steifigkeit des textilen Stoffs wurde mittels eines King Fabric Stiffness Tester gemessen. 4 Tücher (10 × 20 cm; 10 cm in Kettenrichtung) werden aus dem textilen Stoff ausgeschnitten, und jedes Tuch wird Rücken an Rücken (10 × 10 cm) gefaltet und auf einem Tisch angeordnet, der in der Mitte mit einem offenen Ring versehen ist. Ein Kolben drückt den textilen Stoff unter Anwendung einer bestimmten Kraft, die in g ausgedrückt wird, durch den Ring. Die Bestimmung erfolgt gemäß dem Kreisbiegetestverfahren ASTM D 4032. Die verbliebene Steifigkeit des textilen Stoffs wird in% in Bezug auf den entschlichteten textilen Stoff ausgedrückt.
[0139] Die Ergebnisse dieser Tests sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt:

Enzymdosierung EUG/l	Gewichtsverlust %	Verbliebene Dicke %	Verbliebene Festigkeit %	Verbliebene Steifigkeit %
0	0	100	100	100
13	4,0	95,3	85,4	88,6
50	5,1	94,5	73,3	85,0
150	7,7	91,9	70,7	79,3

Beispiel 8

Verwendung der Humicola ~43 kD-Endoglucanase zur Behandlung von Papierfaserbrei

[0140] Die ~43 kD-Endoglucanase wurde zur Behandlung von mehreren Typen von Papierfaserbrei im Hinblick auf die Untersuchung der Wirkung des Enzyms auf die Faserbrei-Entwässerung verwendet.
[0141] Die experimentellen Bedingungen waren wie folgt.

Faserbreie

1. Altpapier-Gemisch: bestand zu 33% aus Zeitungspapier, 33% aus Zeitschriften und 33% aus Computerpapier. Mit und ohne Chemikalien zum Denken (WPC bzw. WP).
2. Einem Recycling unterworfene Kartonbehälter (RCC).
3. Gebleichter Kraft-Faserbrei: hergestellt aus Kiefer (BK).
4. Ungebleichter thermomechanischer Faserbrei: hergestellt aus Nadelbäumen (TMP).

Bestimmung der Cellulase-Aktivität (CEVU)

[0142] Eine Substratlösung mit einem Gehalt an 33,3 g/l CMC (Hercules 7 LFD) in Tris-Puffer, pH-Wert: 9,0, wird hergestellt. Die Enzymprobe, die untersucht werden soll, wird im gleichen Puffer gelöst. 10 ml Substratlösung und 0,5 ml Enzymlösung werden gemischt und in ein Viskosimeter (Haake VT 181, NV Sensor, 181 U/min), das bei 40°C thermostatisiert ist, übertragen. 1 Cellulase-Viskositätseinheit (CEVU) ist in Novo Nordisk Analytical Method Nr. AF 253 (erhältlich von Novo Nordisk) definiert.

Bestimmung der Faserbrei-Entwässerung (Schopper-Riegler)

[0143] Die Schopper-Riegler-Zahl (SR) wird gemäß dem ISO-Standard 5267 (Teil 1) für einen homogenen Faserbrei mit einer Konsistenz von 2 g/l bestimmt. Man lässt ein bekanntes Volumen an Faserbrei durch ein Metallsieb in einen Trichter ablaufen. Der Trichter ist mit einem axialen Loch und einem seitlichen Loch versehen. Das Volumen des Filtrats, das durch das seitliche Loch tritt, wird in einem Gefäß, das in Schopper-Riegler-Einheiten eingeteilt ist, gemessen.

Enzymatische Behandlung

[0144] Ein Präparat der ~43 kD-Endoglucanase wurde auf 7 CEVU/ml verdünnt und zu jedem der vorstehend angegebenen Faserbreie gegeben (50 g DS, Konsistenz: 3%) Die Enzymdosierung betrug 2400 CEVU/kg trockener Faserbrei. Die enzymatische Behandlung wurde bei einem pH-Wert von 7,5 und bei 40°C unter leichtem Rühren für 60 Minuten durchgeführt. Eine Probe wurde nach 30 Minuten entnommen, um den Fortschritt der Reaktion zu überwachen. Nach 60 Minuten wurde der Faserbrei auf eine Konsistenz von 0,5% mit kaltem Wasser (+4°C) verdünnt, um die Reaktion abzubrechen.

[0145] Die Entwässerung des nassen Faserbreis wurde bestimmt, wie es vorstehend beschrieben wurde, und durch Schopper-Riegler-Werte (SR) bewertet. Die Entwässerungszeit (DT) unter Vakuum wurde ebenfalls bestimmt.

[0146] Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

	Altpapier + Chemikalien	
	Kontrolle	Enzym
SR (3 %)	61	55
Entwässerungszeit (s) 150 g/m^2	18,2	17
Masse g/m^2	65,6	66,4
Volumen cm^3/g	1,65	1,66
Reißlänge, m	3650	3970
Bruchindex	2,19	2,47

	Altpapier	
	Kontrolle	Enzym
SR (3 %)	59	51
Entwässerungszeit (s) 150 g/m^2	18,2	12,7
Masse g/m^2	68,0	67,9
Volumen cm^3/g	1,68	1,64
Reißlänge, m	3810	3790
Bruchindex	2,25	2,33

	Einem Recycling unterworfene Pappbehälter	
	Kontrolle	Enzym
SR (3 %)	45	33
Entwässerungszeit (s) 150 g/m^2	6,8	5,3
Masse g/m^2	70,2	67,3
Volumen cm^3/g	1,91	1,99
Reißlänge, m	3640	3530
Bruchindex	2,25	2,22

	Kraft-Faserbrei	
	Kontrolle	Enzym
SR (3 %)	42	31
Entwässerungszeit (s) 150 g/m^2	10,7	6
Masse g/m^2	67,5	69,1
Volumen cm^3/g	1,44	1,42
Reißlänge, m	7010	7190
Bruchindex	5,14	4,96

	TMP	
	Kontrolle	Enzym
SR (3 %)	68	60
Entwässerungszeit (s) 150 g/m^2	13,8	11,3
Masse g/m^2	68,7	70,2
Volumen cm^3/g	2,13	2,04
Reißlänge, m	3630	3620
Bruchindex	1,95	1,91

Tabelle 3: Ergebnisse der Messungen von Entwässerung und Festigkeit Kontrollversuche. Die gleichen Bedingungen wie bei der Enzymbehandlung.

[0147] Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Behandlung mit der ~43 kD-Endoglucanase zu einer wesentlichen Abnahme der SR-Werte führt und die Entwässerung von Faserbreien, die bei der Papierherstellung verwendet werden, wesentlich verbessert.

[0148] Papierblätter wurden aus den verschiedenen Faserbreien auf einer Rapid-Köthen-Vorrichtung hergestellt und auf ihre Festigkeit gemäß der verschiedenen Parameter (unter Einschluss der Reißlänge) vermessen. Es wurde keine Verringerung der Festigkeitseigenschaften aufgrund der Enzymeinwirkung beobachtet.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

Novo Nordisk A/S, N N

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ein Cellulase-Präparat

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Novo Nordisk A/S, Patentabteilung

(B) STASSE: Novo Alle

(C) ORT: Bagsvaerd

(E) LAND: Dänemark

(F) POSTLEITZAHL: DK-2880

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANGABEN ÜBER DEN ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Thalsoe-Madsen, Birgit

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:

(A) TELEFON: +4544448888

(B) TELEFAX: +4544493256

(C) TELEX: 37304

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1060 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Humicola insolens

(B) STAMM: DSM 1800

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

(B) Lage: 73..927

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

(B) Lage: 10..72

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) Lage: 10..927

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
GGATCCAAG ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CCG TCC GCC GTT GTG GCC          48
          Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala
          -21 -20                 -15                 -10

GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AGG TCC ACC CGC TAC        96
Ala Leu Pro Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr
             -5                  1               5

TGG GAC TGC TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG        144
Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val
    10                  15                  20

AAC CAG CCT GTC TTT TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT ATC ACG GAC        192
Asn Gln Pro Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp
 25                  30                  35                  40

TTC GAC GCC AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC        240
Phe Asp Ala Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys
                45                  50                  55
```

```
GCC GAC CAG ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG CTC GGT TTT      288
Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe
            60                  65                  70

GCT GCC ACC TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC      336
Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala
        75                  80                  85

TGC TAC GAG CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG      384
Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met
    90                  95                  100

GTC GTC CAG TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC      432
Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe
105                 110                 115                 120

GAT CTC AAC ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT      480
Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr
                125                 130                 135


CCC CAG TTC GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC      528
Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
            140                 145                 150

CGC AAC GAG TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC      576
Arg Asn Glu Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr
        155                 160                 165

TGG CGC TTC GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAT CCG AGC TTC AGC TTC      624
Trp Arg Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe
    170                 175                 180

CGT CAG GTC CAG TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC      672
Arg Gln Val Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg
185                 190                 195                 200

CGC AAC GAC GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC      720
Arg Asn Asp Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser
                205                 210                 215

ACC AGC TCT CCG GTC AAC CAG CCT ACC AGC ACC AGC ACC ACG TCC ACC      768
Thr Ser Ser Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr
            220                 225                 230

TCC ACC ACC TCG AGC CCG CCA GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC      816
Ser Thr Thr Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys
        235                 240                 245

ACT GCT GAG AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC      864
Thr Ala Glu Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys
    250                 255                 260
```

```
ACC ACC TGC GTC GCT GGC AGC ACT TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC      912
Thr Thr Cys Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr
265                 270                 275                 280

CAT CAG TGC CTG TAGACGCAGG GCAGCTTGAG GGCCTTACTG GTGGCCGCAA      964
His Gln Cys Leu
               285

CGAAATGACA CTCCCAATCA CTGTATTAGT TCTTGTACAT AATTTCGTCA TCCCTCCAGG   1024

GATTGTCACA TAAATGCAAT GAGGAACAAT GAGTAC                          1060
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 305 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
-21 -20                 -15                 -10

Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
 -5                   1                   5                  10

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
             15                  20                  25

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
         30                  35                  40

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
     45                  50                  55

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
 60                  65                  70                  75

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
             80                  85                  90

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
             95                 100                 105

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
        110                 115                 120

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
    125                 130                 135
```

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
140 145 150 155

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
160 165 170

Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
175 180 185

Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
190 195 200

Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
205 210 215

Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
220 225 230 235

Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
240 245 250

Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
255 260 265

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
270 275 280

Leu

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1473 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Fusarium oxysporum

(B) STAMM: DSM 2672

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL CDS

(B) LAGE: 97..1224

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```
GAATTCGCGG CCGCTCATTC ACTTCATTCA TTCTTTAGAA TTACATACAC TCTCTTTCAA      60

AACAGTCACT CTTTAAACAA AACAACTTTT GCAACA ATG CGA TCT TAC ACT CTT        114
                                        Met Arg Ser Tyr Thr Leu
                                          1               5

CTC GCC CTG GCC GGC CCT CTC GCC GTG AGT GCT GCT TCT GGA AGC GGT        162
Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser Ala Ala Ser Gly Ser Gly
             10                  15                  20

CAC TCT ACT CGA TAC TGG GAT TGC TGC AAG CCT TCT TGC TCT TGG AGC        210
His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Ser
         25                  30                  35

GGA AAG GCT GCT GTC AAC GCC CCT GCT TTA ACT TGT GAT AAG AAC GAC        258
Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu Thr Cys Asp Lys Asn Asp
     40                  45                  50

AAC CCC ATT TCC AAC ACC AAT GCT GTC AAC GGT TGT GAG GGT GGT GGT        306
Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn Gly Cys Glu Gly Gly Gly
 55                  60                  65                  70

TCT GCT TAT GCT TGC ACC AAC TAC TCT CCC TGG GCT GTC AAC GAT GAG        354
Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu
                 75                  80                  85

CTT GCC TAC GGT TTC GCT GCT ACC AAG ATC TCC GGT GGC TCC GAG GCC        402
Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala
             90                  95                  100

AGC TGG TGC TGT GCT TGC TAT GCT TTG ACC TTC ACC ACT GGC CCC GTC        450
Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Thr Gly Pro Val
         105                 110                 115

AAG GGC AAG AAG ATG ATC GTC CAG TCC ACC AAC ACT GGA GGT GAT CTC        498
Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu
     120                 125                 130

GGC GAC AAC CAC TTC GAT CTC ATG ATG CCC GGC GGT GGT GTC GGT ATC        546
Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile
135                 140                 145                 150

TTC GAC GGC TGC ACC TCT GAG TTC GGC AAG GCT CTC GGC GGT GCC CAG        594
Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys Ala Leu Gly Gly Ala Gln
                155                 160                 165
```

```
TAC GGC GGT ATC TCC TCC CGA AGC GAA TGT GAT AGC TAC CCC GAG CTT      642
Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys Asp Ser Tyr Pro Glu Leu
            170                 175                 180

CTC AAG GAC GGT TGC CAC TGG CGA TTC GAC TGG TTC GAG AAC GCC GAC      690
Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp Trp Phe Glu Asn Ala Asp
        185                 190                 195

AAC CCT GAC TTC ACC TTT GAG CAG GTT CAG TGC CCC AAG GCT CTC CTC      738
Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln Cys Pro Lys Ala Leu Leu
    200                 205                 210

GAC ATC AGT GGA TGC AAG CGT GAT GAC GAC TCC AGC TTC CCT GCC TTC      786
Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp Ser Ser Phe Pro Ala Phe
215                 220                 225                 230

AAG GTT GAT ACC TCG GCC AGC AAG CCC CAG CCC TCC AGC TCC GCT AAG      834
Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln Pro Ser Ser Ser Ala Lys
                235                 240                 245

AAG ACC ACC TCC GCT GCT GCT GCC GCT CAG CCC CAG AAG ACC AAG GAT      882
Lys Thr Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gln Pro Gln Lys Thr Lys Asp
            250                 255                 260

TCC GCT CCT GTT GTC CAG AAG TCC TCC ACC AAG CCT GCC GCT CAG CCC      930
Ser Ala Pro Val Val Gln Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gln Pro
        265                 270                 275

GAG CCT ACT AAG CCC GCC GAC AAG CCC CAG ACC GAC AAG CCT GTC GCC      978
Glu Pro Thr Lys Pro Ala Asp Lys Pro Gln Thr Asp Lys Pro Val Ala
    280                 285                 290

ACC AAG CCT GCT GCT ACC AAG CCC GTC CAA CCT GTC AAC AAG CCC AAG      1026
Thr Lys Pro Ala Ala Thr Lys Pro Val Gln Pro Val Asn Lys Pro Lys
295                 300                 305                 310

ACA ACC CAG AAG GTC CGT GGA ACC AAA ACC CGA GGA AGC TGC CCG GCC      1074
Thr Thr Gln Lys Val Arg Gly Thr Lys Thr Arg Gly Ser Cys Pro Ala
                315                 320                 325

AAG ACT GAC GCT ACC GCC AAG GCC TCC GTT GTC CCT GCT TAT TAC CAG      1122
Lys Thr Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser Val Val Pro Ala Tyr Tyr Gln
            330                 335                 340

TGT GGT GGT TCC AAG TCC GCT TAT CCC AAC GGC AAC CTC GCT TGC GCT      1170
Cys Gly Gly Ser Lys Ser Ala Tyr Pro Asn Gly Asn Leu Ala Cys Ala
        345                 350                 355

ACT GGA AGC AAG TGT GTC AAG CAG AAC GAG TAC TAC TCC CAG TGT GTC      1218
Thr Gly Ser Lys Cys Val Lys Gln Asn Glu Tyr Tyr Ser Gln Cys Val
    360                 365                 370
```

CCC AAC TAAATGGTAG ATCCATCGGT TGTGGAAGAG ACTATGCGTC TCAGAAGGGA 1274
Pro Asn
375

TCCTCTCATG AGCAGGCTTG TCATTGTATA GCATGGCATC CTGGACCAAG TGTTCGACCC 1334

TTGTTGTACA TAGTATATCT TCATTGTATA TATTTAGACA CATAGATAGC CTCTTGTCAG 1394

CGACAACTGG CTACAAAAGA CTTGGCAGGC TTGTTCAATA TTGACACAGT TTCCTCCATA 1454

AAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1473

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 376 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Ala Leu Ala Gly Pro Leu Ala Val Ser
1 5 10 15

Ala Ala Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys
20 25 30

Pro Ser Cys Ser Trp Ser Gly Lys Ala Ala Val Asn Ala Pro Ala Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Lys Asn Asp Asn Pro Ile Ser Asn Thr Asn Ala Val Asn
50 55 60

Gly Cys Glu Gly Gly Gly Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Asn Tyr Ser Pro
65 70 75 80

Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Lys Ile
85 90 95

Ser Gly Gly Ser Glu Ala Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr
100 105 110

Phe Thr Thr Gly Pro Val Lys Gly Lys Lys Met Ile Val Gln Ser Thr
115 120 125

Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Asp Asn His Phe Asp Leu Met Met Pro
130 135 140

```
Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Ser Glu Phe Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser Glu Cys
                165                 170                 175

Asp Ser Tyr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Gly Cys His Trp Arg Phe Asp
            180                 185                 190

Trp Phe Glu Asn Ala Asp Asn Pro Asp Phe Thr Phe Glu Gln Val Gln
        195                 200                 205

Cys Pro Lys Ala Leu Leu Asp Ile Ser Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
    210                 215                 220

Ser Ser Phe Pro Ala Phe Lys Val Asp Thr Ser Ala Ser Lys Pro Gln
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Asn
    370                 375
```

Patentansprüche

1. Cellulase-Präparat, bestehend im Wesentlichen aus einer homogenen Endoglucanase-Aktivität, dessen Enzym die Aminosäuresequenz aufweist, die in der beigefügten Sequenzlisten ID-Nr. 2 oder ID-Nr. 4 zeigt, oder die ein Derivat von diesen beiden ist.

2. Cellulase-Präparat nach Anspruch 1, das von einer Spezies von Humicola, z. B. Humicola insolens, gebildet werden kann.

3. Cellulase-Präparat nach Anspruch 1, das von einer Spezies von Fusarium, z. B. Fusarium oxysporum, gebildet werden kann.

4. DNA-Konstrukt, umfassend eine DNA-Sequenz, die ein Endoglucanase-Enzym nach einem der Ansprüche 1–3 kodiert.

5. DNA-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei die DNA-Sequenz den Angaben in den beigefügten Sequenzlisten ID-Nr. 1 oder ID-Nr. 3 oder einer Modifikation davon entspricht.

6. Expressionsvektor, der eine inserierte DNA-Sequenz nach Anspruch 4 oder 5 trägt.

7. Zelle, die mit einem DNA-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5 oder mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformiert ist.

8. Zelle nach Anspruch 7, bei der es sich um eine Pilzzelle, die beispielsweise zu einem Stamm von Trichoderma oder Aspergillus, insbesondere Aspergillus oryzae oder Aspergillus niger, gehört, oder um eine Hefezelle handelt, die beispielsweise zu einem Stamm von Hansenula oder Saccharomyces, z. B. Saccharomyces cerevisiae, gehört.

9. Verfahren zur Herstellung eines Endoglucanase-Enzyms gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1–3, wobei das Verfahren das Züchten einer Zelle gemäß Anspruch 7 oder 8 in einem geeigneten Kulturmedium unter Bedingungen, die die Expression des Endoglucanase-Enzyms ermöglichen, und das Gewinnen des Endoglucanse-Enzyms aus der Kultur umfasst.

10. Detergens-Additiv, enthaltend ein Cellulase-Präparat nach einem der Ansprüche 1–3, vorzugsweise in Form eines staubfreien Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms.

11. Detergens-Additiv nach Anspruch 10, das 1–500, vorzugsweise 5–250 und insbesondere 10–100 mg Enzymprotein pro Gramm Additiv enthält.

12. Detergens-Additiv nach Anspruch 10, das zusätzlich ein weiteres Enzym enthält, wie eine Protease, Lipase, Peroxidase und/oder Amylase.

13. Detergens-Additiv nach Anspruch 12, wobei es sich bei der Protease um eine Protease handelt, die eine höhere Spezifität als Bacillus lentus-Serin-Protease aufweist.

14. Detergens-Additiv nach Anspruch 12, wobei es sich bei der Protease um Subtilisin-Novo oder um eine Variante davon, eine von Nocardia dassonvillei NRRL 18133 ableitbare Protease, eine für Glutamin- und Asparagin-Säure spezifische Serin-Protease, die durch Bacillus licheniformis gebildet werden kann, oder eine trypsinähnliche Protease, die durch Fusarium sp. DSM 2672 gebildet werden kann, handelt.

15. Detergens-Zusammensetzung, enthaltend ein Cellulase-Präparat nach einem der Ansprüche 1–3.

16. Detergens-Zusammensetzung nach Anspruch 15, die zusätzlich ein weiteres Enzym, z. B. eine Protease, Lipase, Peroxidase und/oder Amylase enthält.

17. Detergens-Zusammensetzung nach Anspruch 16, wobei es sich bei der Protease um eine Protease handelt, die eine höhere Spezifität als Bacillus lentus-Serin-Protease aufweist.

18. Detergens-Zusammensetzung nach Anspruch 17, wobei es sich bei der Protease um Subtilisin-Novo oder um eine Variante davon, eine von Nocardia dassonvillei NRRL 18133 ableitbare Protease, eine für Glutamin- und Asparagin-Säure spezifische Serin-Protease, die durch Bacillus licheniformis gebildet werden kann, oder eine trypsinähnliche Protease, die durch Fusarium sp. DSM 2672 gebildet werden kann, handelt.

19. Detergens-Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei das Endoglucanase-Enzym in einer Konzentration enthalten ist, die 0,01–100, vorzugsweise 0,05– 60 und insbesondere 0,1–20 mg Enzymprotein pro Liter Waschlösung entspricht.

20. Detergens-Zusammensetzung, enthaltend ein Detergens-Additiv nach einem der Ansprüche 10–14.

21. Verfahren zur Verringerung der Geschwindigkeit, mit der Cellulose-enthaltende textile Stoffe hart werden, oder zur Verminderung der Härte von Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen, wobei das Verfahren die Behandlung der Cellulose-enthaltenden textilen Stoffe mit einem Cellulase-Präparat nach einem der Ansprüche 1–3 umfasst.

22. Verfahren zur Erzielung einer Farbklärung von gefärbten, Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen, wo-

bei das Verfahren die Behandlung von gefärbten, Baumwolle-enthaltenden textilen Stoffen mit einem Cellulase-Präparat nach einem der Ansprüche 1–3 umfasst.

23. Verfahren zur Erzielung einer lokalisierten Farbvariation von gefärbten, Cellulose-enthaltenden textilen Stoffen, wobei das Verfahren die Behandlung von gefärbten, Baumwolle-enthaltenden textilen Stoffen mit einem Cellulase-Präparat nach einem der Ansprüche 1–3 umfasst.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21, 22, oder 23, wobei die Behandlung der textilen Stoffe mit dem Cellulase-Präparat während des Einweichens, Waschens oder Spülens der textilen Stoffe durchgeführt wird.

25. Verfahren zur Verbesserung der Entwässerungseigenschaften von Papierstoff, wobei das Verfahren die Behandlung von Papierstoff mit einem Cellulase-Präparat nach einem der Ansprüche 1–3 umfasst.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

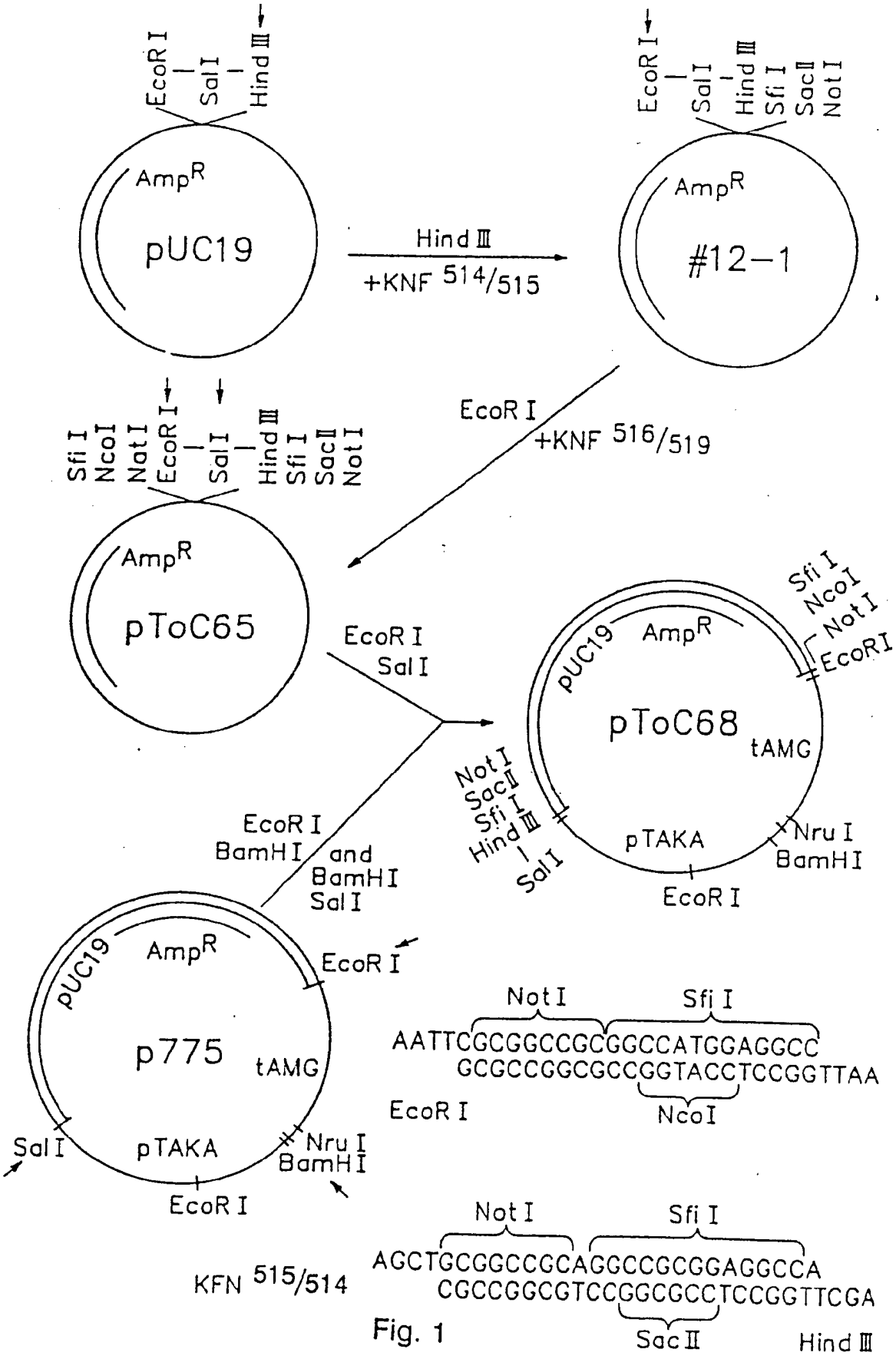


Fig. 1

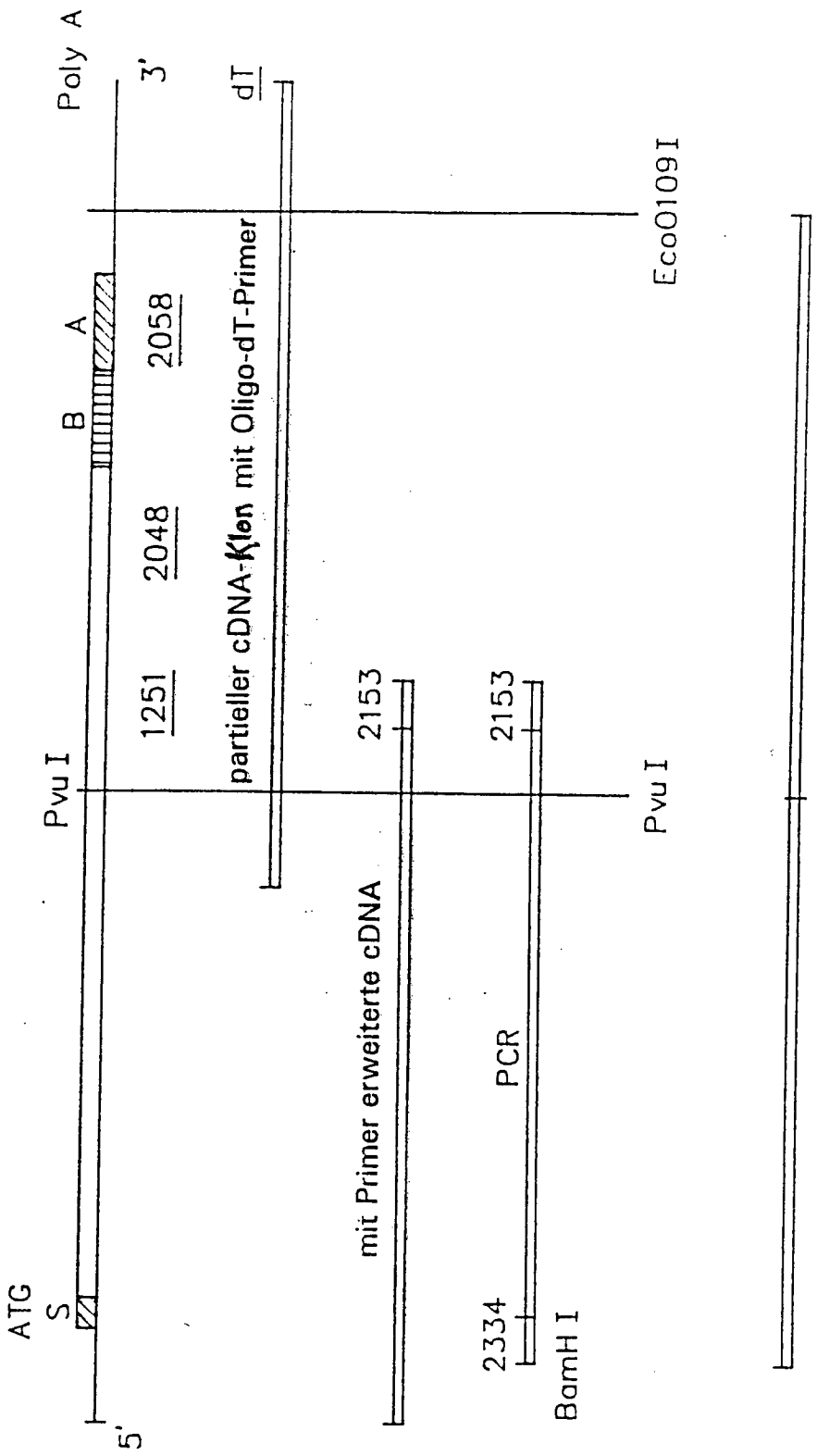

Poly A
3'
dT
EcoO109I
B
A
2058
2048
1251
partieller cDNA-Klon mit Oligo-dT-Primer
2153
2153
Pvu I
Pvu I
mit Primer erweiterte cDNA
PCR
2334
BamH I
ATG
S
5'

Fig. 2