



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 33 825 T2 2005.11.10

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 839 186 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 33 825.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK96/00322

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 923 878.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/004079

(86) PCT-Anmeldetag: 12.07.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 06.02.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 06.05.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 10.11.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.11.2005

(51) Int Cl.⁷: C12N 9/20

C12N 9/18, C11D 3/386

(30) Unionspriorität:

83295	14.07.1995	DK
101395	13.09.1995	DK
109695	29.09.1995	DK
130695	21.11.1995	DK
37296	01.04.1996	DK
20461 P	07.05.1996	US

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:

Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

FUGLSANG, Crone, Claus, DK-2880 Bagsvaerd,
DK; OKKELS, Sigurd, Jens, DK-2880 Bagsvaerd,
DK; PETERSEN, Aaby, Dorte, DK-2880 Bagsvaerd,
DK; PATKAR, Anant, Shamkant, DK-2880
Bagsvaerd, DK; THELLERSEN, Marianne, DK-2880
Bagsvaerd, DK; VIND, Jesper, Novo Alle, DK-2880
Bagsvaerd, DK; HALKIER, Torben, Novo Alle,
DK-2880 Bagsvaerd, DK; JÖRGENSEN, Troels,
Steen, DK-2880 Bagsvaerd, DK

(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTES ENZYM MIT LIPOLYTISCHER AKTIVITÄT

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein modifiziertes Enzym mit lipolytischer Aktivität, eine für das modifizierende Enzym kodierende DNA-Sequenz, ein Vektor umfassend die DNA-Sequenz, eine Wirtszelle, welche die DNA-Sequenz oder den Vektor birgt, und ein Verfahren zum Herstellen des Enzyms mit lipolytischer Aktivität.

[0002] Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Anfügen eines Peptids an das Stammenzym mit lipolytischer Aktivität, eine Zusammensetzung umfassend das erfindungsgemäße modifizierte Enzym mit lipolytischer Aktivität, die vorteilhafte Verwendung des erfindungsgemäßen modifizierten Enzyms in Waschmittelzusammensetzungen und weiterhin ein Verfahren zum Verbessern der Waschleistung von Waschmittelzusammensetzungen.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Waschmittelenzyme sind nun seit 20 Jahren auf dem Markt und heutzutage als übliche Waschmittelhaltsstoffe in sowohl pulverförmigen als auch flüssigen Waschmitteln weltweit gängig.

[0004] Waschmittelzusammensetzungen können viele verschiedene Enzyme umfassen, von denen Proteasen, Amylasen, Zellulasen, Lipasen und Cutinasen heutzutage die wichtigsten darstellen.

Lipolytische Enzyme

[0005] Lipolytische Enzyme (d. h. Enzyme, die unter der Enzymklassifizierungsnummer E. C. 3.1.1 (Carboxylesterhydrolasen) in Übereinstimmung mit den Recommendations (1992) of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) klassifiziert sind) sind Enzyme, die zum Entfernen von Lipid- und Fettflecken von Kleidung und anderen Textilien verwendet werden können.

[0006] Als Waschmittelenzyme kommen vielfältige mikrobielle Lipasen in Betracht. Beispiele solcher Lipasen umfassen eine Humicola lanuginosa-Lipase, z. B. beschrieben in EP 258 068 und EP 305 216, eine Rhizomucor miehei-Lipase, z. B. beschrieben in EP 238 023, lipolytische Enzyme aus Absidia sp. (WO 96/13578), eine Candida-Lipase, wie z. B. eine C. antarctica-Lipase, z. B. die C. antarctica-Lipase A oder B, beschrieben in EP 214 761, eine Pseudomonas-Lipase wie z. B. eine P. alcaligenes und eine P. pseudoalcaligenes Lipase, z. B. beschrieben in EP 218 272, eine P. cepacia-Lipase, z. B. beschrieben in EP 331 376, eine Pseudomonas sp Lipase wie z. B. in WO 95/14783 offenbart, eine Bacillus-Lipase, z. B. B. subtilis-Lipase (Dartois et al., (1993) Biochemica and Biophysica acta 1131, 253–260), eine B. stearothermophilus-Lipase (JP 64/744992) und eine B. pumilus-Lipase (WO 91/16422).

[0007] Weiterhin sind eine Reihe klonierte Lipasen beschrieben worden, einschließlich der Penicillium camembertii-Lipase beschrieben von Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61–67), die Geotrichum candidum-Lipase (Schimada, Y. et al., (1989), J. Biochem., 106, 383–388), und verschiedene Rhizopus-Lipasen wie z. B. eine R. delemar-Lipase (Hass, M. J. et al., (1991), Gene 109, 117–113), eine R. niveus-Lipase (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716–719) und eine R. oryzae-Lipase.

[0008] Andere Typen lipolytischer Enzyme, die als Waschmittelenzyme in Betracht kommen, schließen Cutinasen, z. B. aus Pseudomonas mendocina beschrieben in WO 88/09367, oder eine Cutinase aus Fusarium solani pisi (z. B. beschrieben in WO 90/09446) ein.

[0009] In den letzten Jahren hat man Versuche unternommen, modifizierte lipolytische Enzyme, wie z. B. Varianten und Mutanten mit verbesserten Eigenschaften für Waschmittelzwecke, herzustellen.

[0010] In den meisten Fällen hat man lipolytische Enzyme mit verbesserter Waschleistung mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt, wodurch Substitutionen spezifischer Aminosäurereste, die man entweder aufgrund ihres Typs oder aufgrund ihrer Position innerhalb der Sekundär- oder Tertiärstruktur des reifen Enzyms ausgewählt hat, entstehen.

[0011] Eine alternative generelle Vorgehensweise zum Modifizieren von Proteinen und Enzymen basiert auf Zufallsmutagenese, zum Beispiel wie in US 4,894,331, WO 93/01285 und WO 95/22615 offenbart.

Anmerkungen zum Stand der Technik

[0012] Aus dem Stand der Technik ist bekannt, lipolytische Enzyme mittels zielgerichteter Mutagenese zu modifizieren, um eine verbesserte Leistung, insbesondere die Waschleistung lipolytischer Enzyme, zu erzielen. Als allgemeines Konzept galt die Insertion, Deletion oder Substitution von Aminosäuren innerhalb des strukturellen Teils einer Aminosäurekette des fraglichen lipolytischen Stammenzys. Auf diese Weise hat man lipolytische Enzyme mit einer signifikant verbesserten Waschleistung erhalten.

[0013] Jedoch ist Bedarf zum Bereitstellen lipolytischer Enzyme mit noch besserer Leistung vorhanden, wie z. B. Waschleistung und/oder sogar noch bessere Geschirrspüleigenschaften gegenüber den lipolytischen Enzyme, die mittels der Verfahren des Standes der Technik hergestellt werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, die Eigenschaften von Enzymen mit lipolytischer Aktivität zu verbessern, insbesondere die Waschleistung solcher Enzyme zu verbessern.

[0015] Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es möglich ist, die Waschleistung lipolytischer Enzyme signifikant zu erhöhen, indem man ein Peptid an den N- oder C-Terminus des Enzyms anhängt.

[0016] Demnach betrifft die Erfindung in einem ersten Aspekt ein modifiziertes Enzym mit lipolytischer Aktivität, welches im Vergleich mit seinem Stammenzym einen oder mehrere Peptidanhänge an seinem C- und/oder N-terminalen Ende aufweist.

[0017] Im vorliegenden Zusammenhang soll der Begriff „Peptidanhang“ bezeichnen, dass ein Abschnitt von einer oder mehreren aufeinander folgender Aminosäuren an einem oder beiden N- und/oder C-terminalen Ende(n) des Stammenzys angehängt ist oder innerhalb des nicht-strukturellen Teils des/der N- und/oder C-terminalen Ende/s(n) des Stammenzys angehängt ist.

[0018] Der Begriff „nicht-struktureller Teil“ soll den Teil des N- beziehungsweise C-terminalen Endes bezeichnen, welcher außerhalb des ersten beziehungsweise letzten Strukturelements, wie z. B. eine alpha-Helix oder eine beta-Faltblattstruktur, des gefalteten, reifen Enzyms liegt. Der nicht-strukturelle Teil kann leicht anhand einer dreidimensionalen Struktur oder eines Modells des fraglichen Enzyms identifiziert werden. Üblicherweise umfasst der nicht-strukturelle Teil die ersten oder die letzten etwa 1–20 Aminosäurereste der Aminosäuresequenz, aus dem das Enzym besteht.

[0019] Der Begriff „reifes Enzym“ wird in seiner herkömmlichen Bedeutung verwendet, d. h. um die aktive Form des Enzyms nach Expression und posttranslationaler Modifizierung durch den Wirtsorganismus (Entfernung von Pro- und/oder Prä-Sequenzen) zu bezeichnen. Im Falle eines sezernierten Enzyms ist das reife Enzym üblicherweise die Enzymform nach der Sekretion. Spezifischer bedeutet das, dass die Prä- und Pro-Peptidsequenzen, sofern vorhanden, von dem zunächst translatierten, d. h. unprozessierten Enzym entfernt worden sind.

[0020] Der Begriff „Stammenzym“ soll das Enzym bezeichnen, das gemäß der vorliegenden Erfindung modifiziert werden soll. Das Stammenzym kann ein natürlich vorkommendes (oder Wildtyp-)Enzym oder eine mit geeigneten Mitteln hergestellte Variante davon sein. Beispielsweise kann das Stammenzym eine Variante eines natürlich vorkommenden Enzyms sein, welches durch Substitution, Deletion oder Verkürzung einer oder mehrerer Aminosäurereste oder durch Addition oder Insertion einer oder mehreren Aminosäurereste der Aminosäuresequenz des natürlich vorkommenden Enzyms, üblicherweise im strukturellen Teil des Enzyms, modifiziert worden ist.

[0021] In weiteren Aspekten betrifft die Erfindung eine DNA-Sequenz, die für ein modifiziertes lipolytisches Enzym, wie oben definiert, kodiert, einen rekombinanten Vektor oder Transformationsvehikel umfassend eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, eine Wirtszelle, die eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder einen erfindungsgemäßen Vektor birgt, und ein Verfahren zum Herstellen eines modifizierten lipolytischen Enzyms durch Kultivierung der Wirtszelle.

[0022] Das erfindungsgemäße, modifizierte lipolytische Enzym kann gut als Waschmittelenzym eingesetzt werden und demgemäß betrifft die Erfindung schließlich einen Waschmittelzusatz oder eine Waschmittelzusammensetzung umfassend ein erfindungsgemäßes, modifiziertes lipolytisches Enzym.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0023] [Abb. 1](#) zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der kodierenden Region des Gens der Humicola lanuginosa-Lipase, wie sie im Hefeexpressionsvektor pJSO37 vorliegt. Die Signalsequenz (Aminosäuren 1–17) ist die ursprüngliche Signalsequenz von Humicola lanuginosa. Der SPIRR-Peptidanhang befindet sich an Aminosäurerest 18 bis 22. Aminosäurerest 23 (E) ist der erste Aminosäurerest der in Aspergillus oryzae exprimierten Stammlipase.

[0024] [Abb. 2](#) zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der kodierenden Region des Gens der Humicola lanuginosa-Lipase, wie sie im E. coli-Expressionsvektor pJSO215 vorliegt. Die Signalsequenz (Aminosäuren 1 bis 20) ist die Signalsequenz der A. lyticus Protease I (WO 96/17943). Das SPIRR-Peptid wird nach Aminosäurerest 20 angehängt. Aminosäurerest 26 (E) ist der erste Aminosäurerest der in Aspergillus oryzae exprimierten Stammlipase.

[0025] [Abb. 3](#) zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der kodierenden Region des Gens der Humicola lanuginosa-Lipase, wie sie im E. coli-Expressionsvektor pSX581 vorliegt. Die Signalsequenz (Aminosäuren 1 bis 20) ist die Signalsequenz der A. lyticus Protease I (WO 96/17943). Aminosäurerest 21 (E) ist der erste Aminosäurerest der Stammlipase.

[0026] [Abb. 4](#) zeigt die Konstruktion von pSX164;

[0027] [Abb. 5](#) zeigt die Konstruktion von pSX578;

[0028] [Abb. 6](#) zeigt die Konstruktion von pSX581;

[0029] [Abb. 7](#) zeigt das Plasmid SX581;

[0030] [Abb. 8](#) zeigt das Plasmid pJSO37;

[0031] [Abb. 9](#) zeigt die Konstruktion von Aspergillus-Vektor pCaHj485

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Peptidanhang

[0032] Wie oben dargestellt, wurde überraschenderweise gefunden, dass eine signifikant verbesserte Waschleistung eines lipolytischen Enzyms erzielt werden kann, wenn ein geeigneter Peptidanhang an den nicht-strukturellen Teil eines Enzyms in seiner reifen Form oder an das C-terminale und/oder N-terminale Ende des reifen Enzyms angehängt wird.

[0033] Der Begriff „verbesserte Waschleistung“ soll bezeichnen, dass das erfindungsgemäß modifizierte Enzym im Test unter waschähnlichen Bedingungen besser in der Lage ist, Fettverschmutzungen zu entfernen, als das unmodifizierte Stammenzym. Die Verbesserung wird mit dem Begriff „Verbesserungsfaktor“ ($f_{improve}$) (weitere Bezugnahme siehe Abschnitt Material und Methoden weiter unten) bezeichnet. Abhängig vom Peptidanhang und vom reifen Enzym ist ein Verbesserungsfaktor ($f_{improve}$) im Bereich von 1–5, oder sogar bis zu 10 (wie z. B. im Bereich von 1–10) erzielt worden. Es wird vorliegend davon ausgegangen, dass gemäß der vorliegenden Erfindung noch höhere Verbesserungsfaktoren wie z. B. bis zu 20, sogar bis zu 30, oder sogar bis zu 50, wie z. B. zwischen 30 und 50, oder sogar noch höhere erzielt werden können.

[0034] Der Begriff „ein geeigneter Peptidanhang“ soll bezeichnen, dass der zu verwendende Peptidanhang in der Lage ist, eine verbesserte Waschleistung zu bewirken. Die „Eignung“ des Peptidanhangs kann anhand einer Vergleichsanalyse der Waschleistung des modifizierten Enzyms, an das ein Peptidanhang gehängt ist, beziehungsweise des entsprechenden Stammenzyms ermittelt werden. Die Waschleistung kann, z. B., mit jedem geeigneten Verfahren wie einer der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Waschleistungstests bestimmt werden.

[0035] Es wird vorliegend in Betracht gezogen, dass die durch den Peptidanhang bedingte verbesserte Waschleistung (zumindest teilweise) auf eine erhöhte Affinität des modifizierten lipolytischen Enzyms zu seinem Lipipsubstrat zurückzuführen ist (wobei dies vermutlich nicht die einzige Ursache ist).

[0036] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf das Verbessern der Waschleistung des lipolytischen Stammenzyms beschränkt. Es kommt in Betracht, dass auch andere Eigenschaften des lipolytischen Stammenzyms gemäß der vorliegenden Erfindung, d. h. indem ein geeigneter Peptidanhang an oder innerhalb eines nicht-strukturellen Teils des C- und/oder N-terminalen Endes des Stammenzys angehängt wird, verbessert werden können. Spezifischer ausgedrückt kommt es in Betracht, dass die Aktivität eines lipolytischen Stammenzys beispielweise beim Entfernen von Harzpech in der Papier- und Zellstoffindustrie, beim Entfetten von Häuten in der Lederindustrie, beim Katalysieren organischer Synthesen, usw., signifikant erhöht werden kann, indem ein geeigneter Peptidanhang an oder innerhalb des N- oder C-terminalen Endes des lipolytischen Enzyms, d. h. ein Peptidanhang, der die gewünschte Funktion ausüben kann, angehängt wird. In diesem Zusammenhang wird ebenfalls angenommen, dass eine verbesserte Aktivität zumindest teilweise auf eine verbesserte Affinität für das fragliche Substrat zurückzuführen ist.

[0037] Als Folge der verbesserten Aktivität könnte es möglich sein, die Dosierung des Enzyms für einen bestimmten Zweck verglichen mit der Dosierung der erforderlichen Dosierung des unmodifizierten Stammenzys erheblich zu reduzieren.

[0038] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung soll der Begriff „modifiziertes Enzym“ ein Derivat oder eine Variante des Stammenzys bezeichnen, wobei das Derivat oder die Variante verglichen mit dem Stammenzym einen Peptidanhang am C- und/oder N-terminalen Ende (fusioniert an den ersten und/oder letzten Aminosäurerest des Stammenzys) und/oder innerhalb des nicht-strukturellen Teils des C- und/oder N-terminalen Endes des Stammenzys umfasst. Folglich kann das modifizierte Enzym beispielweise einen Peptidanhang entweder am N-terminalen oder am C-terminalen oder sowohl an dem N- als auch dem C-terminalen Ende des lipolytischen Stammenzys umfassen.

[0039] Es wird vorliegend angenommen, dass die Fähigkeit des Peptidanhangs, die gewünschte Effekt (wie z. B. verbesserte Waschleistung, verbesserte Leistung beim Entfetten von Lederhäuten, usw.) zu erzielen, z. B. von der Identität des zu modifizierenden Stammenzys, von der Struktur (einschließlich Länge) des Peptidanhangs, vom Einfluss des Peptidanhangs auf die Struktur des ganzen lipolytischen Enzyms, von der Natur oder Funktionalität der Aminosäurereste des Peptidanhangs usw. abhängt. Voraussetzung dafür, dass der Peptidanhang die gewünschte Wirkung erzielt, ist natürlich, dass das modifizierte Enzym, das den Peptidanhang enthält, in einem geeigneten Wirtssystem exprimierbar ist. Die folgenden allgemeinen Erwägungen können für die Gestaltung eines geeigneten Peptidanhangs von Bedeutung sein.

[0040] Länge des Peptidanhangs: Es wurde gefunden, dass Peptidanhänge mit einer variierenden Anzahl von Aminosäureresten die gewünschte Wirkung erzielen können. Folglich ist es nicht möglich, die Zahl von Aminosäureresten genau zu benennen, die in dem Peptidanhang, der gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden soll, vorliegen muss. In Betracht kommt, dass die obere Grenze der Anzahl an Aminosäureresten unter anderem durch den Einfluss des Peptidanhangs auf die Expression, auf die Struktur und/oder die Aktivität des erhaltenen modifizierten Enzyms bestimmt wird. Es wird angenommen, dass der Peptidanhang eine wesentliche Anzahl von Aminosäureresten umfassen kann, wobei nicht alle Aminosäurereste zu der gewünschten Wirkung beitragen müssen (selbst wenn der Peptidanhang eine wesentliche Anzahl von Aminosäureresten enthält, muss nur eine geringe Anzahl davon die gewünschte Wirkung erzielen, wobei diese geringe Anzahl als funktioneller Teil des Peptidanhangs bezeichnet werden kann). Wesentliches Kriterium in Bezug auf die untere Grenze der Anzahl an Aminosäureresten des Peptidanhangs ist üblicherweise, dass die Anzahl zur Erzielung der gewünschten Wirkung ausreicht.

[0041] Der Peptidanhang kann daher einen einzelnen Aminosäurerest oder eine Aminosäurekette aus von 2 und 500 Aminosäuren, wie z. B. von 1 bis 200, oder von 2 bis 100, bevorzugt von 2 to 50, wie z. B. 3 bis 50, mehr bevorzugt von 7–45 und noch mehr bevorzugt zwischen 1 und 15, wie z. B. zwischen 1 und 10 oder 1 und 7, insbesondere zwischen 4 und 10, wie z. B. 4 und 7 Aminosäuren.

[0042] Stabilität: Der Peptidanhang sollte vorzugsweise so ausgewählt sein, dass ein modifiziertes lipolytisches Enzym mit einer annehmbaren Stabilität entsteht (z. B. strukturelle Stabilität und/oder Expressionsstabilität) oder so, dass die strukturelle Stabilität des Stammenzys nicht signifikant erniedrigt ist. Obwohl von vielen Peptidanhängen nicht angenommen wird, dass sie dem erhaltenen modifizierten Enzym eine wesentliche strukturelle Instabilität verleihen, kann es in einigen Fällen und mit einigen Stammenzysen wichtig sein, einen Peptidanhang zu wählen, der von sich aus dem modifizierten lipolytischen Enzym strukturelle Stabilität verleiht. Beispielsweise kann ein Peptidanhang, der von sich aus ein Strukturelement wie z. B. eine alpha-Helix oder ein beta-Faltblatt ausbildet, das erhaltene modifizierte Enzym stabilisieren und folglich im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Peptidsequenzen, die solche Strukturen ausbilden kön-

nen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Alternativ kann eine verbesserte strukturelle Stabilität durch die Einführung von Cystinbrücken in dem erfindungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzym erzielt werden. Beispielsweise kann eine Cystinbrücke zwischen dem Peptidanhang und dem reifen Teil des Enzyms ausgebildet werden, wenn mindestens ein Aminosäurerest des Peptidanhangs ein Cysteinrest ist, der so angeordnet ist, dass er eine kovalente Bindung mit einem Cysteinrest im reifen Teil des Enzyms eingehen kann. Der positive Effekt der Einführung einer Cystinbrücke ist in Beispiel 19 dargestellt. Wenn kein geeignetes Cystein in dem reifen Enzym vorhanden ist, kann ein Cystein an einer geeigneten Stelle des Stammenzyms eingefügt werden, am besten, indem man eine Aminosäure des Stammenzyms, die man für die Aktivität für unwichtig hält, ersetzt.

[0043] Außerdem kann es wünschenswert sein, dass mindestens ein Aminosäurerest des Peptidanhangs so ausgewählt ist, dass er den Peptidanhang weniger anfällig macht für die proteolytische Degradation durch proteolytische Enzyme der Wirtszelle, die zur Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms verwendet wird. Beispielsweise kann der Peptidanhang mindestens einen, bevorzugt mindestens zwei Prolinreste umfassen. Vorzugsweise umfasst der Peptidanhang 1-5, wie z. B. 1-4 oder 1-3 oder zwei oder ein Prolinreste. Der/die Prolinrest(e) ist/sind bevorzugt an der proteolytischen Spaltstelle oder in deren Nähe lokalisiert. Alternativ kann der Peptidanhang eine proteasestabile Schleife für die modifizierte Lipase ausbilden, z. B. wie beschrieben in EP 407 225 oder WO 93/11254.

[0044] Natur der Aminosäurereste des Peptidanhangs: Wie oben festgestellt und ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird vorliegend angenommen, dass die durch den Peptidanhang erzielte verbesserte Leistung zumindest teilweise auf eine erhöhte Affinität des modifizierten lipolytischen Enzyms zum Substrat zurückzuführen ist. Insbesondere in Bezug auf die Waschleistung wird angenommen, dass günstige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Lipidoberfläche und den positiv geladenen und/oder hydrophoben Aminosäureresten des modifizierten Enzyms stattfinden. Demgemäß ist es besonders bevorzugt, dass das erfindungsgemäße modifizierte Enzym einen Peptidanhang mit mindestens einer positiven Ladung, wie z. B. mindestens 2, 3, 4 oder mehrere positive Ladungen umfasst, oder anders ausgedrückt, in welchem eine wesentliche Anzahl der Aminosäurereste des Peptidanhangs positiv geladen und/oder hydrophob ist.

[0045] Um die negative Ladung in einem nicht-strukturellen Ende des Stammenzym zu reduzieren, ist es analog dazu bevorzugt, mindestens eine oder zwei negative geladene Aminosäuren vom nicht-strukturellen N- oder C-terminalen Teil des ausgewählten Stammenzyms zu entfernen, insbesondere von dem Teil des Stammenzyms, der aus den 1-5 ersten oder letzten N-terminalen oder C-terminalen Aminosäureresten besteht, wie z. B. 1-4, oder 1-3 oder 1-2. Der negativ geladene Aminosäurerest kann entweder entfernt oder durch einen neutralen, einen positiv geladenen oder einen hydrophoben Aminosäurerest ersetzt werden. Beispielsweise kann der zu entfernende negativ geladene Aminosäurerest ein E oder D sein, welcher entweder durch die positiv geladenen Aminosäurereste R, K, oder H, durch die neutralen Aminosäurereste S, T, G oder Q, oder durch die hydrophoben Aminosäurereste A, I, W, F oder L ersetzt werden kann. In ähnlicher Weise kann ein neutraler Aminosäurerest eines nicht-strukturellen N-terminalen oder C-terminalen Teils des Stammenzyms gegen einen positiv geladenen oder hydrophoben Aminosäurerest wie oben definiert ausgetauscht werden.

[0046] Demgemäß kann das erfindungsgemäße modifizierte lipolytische Enzym zusätzlich oder alternativ zu einer N-terminalen und/oder C-terminalen Verlängerung eine Mutation in dem nicht-strukturellen N-terminalen und/oder C-terminalen Ende des Stammenzyms umfassen, wobei die Mutation das Deleteieren oder Ersetzen eines negativ geladenen Aminosäurerest des nicht-strukturellen Teils mit einem positiv geladenen oder neutralen Aminosäurerest oder mit einem hydrophoben Aminosäurerest beinhaltet.

[0047] Wenn der Peptidanhang sowohl am N-terminalen als auch am C-terminalen Ende des Stammenzyms vorliegt, kann der Peptidanhang an oder innerhalb der Termini dieselbe oder eine unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweisen.

[0048] Eignungstest des Peptidanhangs: die Wirkung der Verwendung eines bestimmten Peptidanhangs, das z. B. basierend auf den obigen Grundsätzen gestaltet ist, kann getestet werden, indem man ein modifiziertes lipolytisches Enzym konstruiert, welches den Peptidanhang enthält, und die Eigenschaften des erhaltenen Enzyms hinsichtlich der gewünschten Enzymanwendung wie z. B. Waschen, Entfernung von Harzpech, Entfetten von Leder, usw. im Originalmaßstab oder einem Assay, der mit der fraglichen Enzymanwendung korreliert, getestet.

[0049] Der Peptidanhang kann folgendermaßen verallgemeinert werden.

[0050] Der erste Rest (gezählt vom äußersten Rest) wird als „a“, der zweite als „b“, der dritte als „c“ usw. bezeichnet. Folglich wird im Falle eines N-terminalen Anhangs der erste Aminosäurerest mit „a“, bezeichnet, im Falle eines C-terminalen Anhangs der letzte Aminosäurerest mit „a“ bezeichnet.

[0051] In einer wichtigen Ausführungsform der Erfindung besteht der Peptidanhang aus von 4 bis 7 Aminosäuren. Ein derartiger Peptidanhang, der sowohl an den N-terminus und/oder C-terminus des Stammenzymes gehängt werden kann, kann nachfolgend bezeichnet werden als:

- a-b-c-d (4-Aminosäuren-Peptidanhang)
- a-b-c-d-e (5-Aminosäuren-Peptidanhang)
- a-b-c-d-e-f (6-Aminosäuren-Peptidanhang)
- a-b-c-d-e-f-g (7-Aminosäuren-Peptidanhang)

[0052] Jeder Buchstabe definiert einen Aminosäurerest.

[0053] a, b, c, d, e, f und g können unabhängig voneinander jede Aminosäure einschließlich Alanin (A), Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I), Prolin (P), Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Methionin (M), Glycin (G), Serin (S), Threonin (T), Cystein (C), Tyrosin (Y), Asparagin (N), Glutamin (Q), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H) sein.

[0054] In besonderen Ausführungsformen sind a, b, c, d, e, f und g unabhängig voneinander eine der folgenden Aminosäuren:

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

[0055] In einer bevorzugten Ausführungsform ist zumindest eine, wie z. B. eine, zwei, drei oder vier von a, b, c, d, e, f oder g eine positiv geladene Aminosäure, d. h. Arg (R) oder Lys (K) oder eine hydrophobe Aminosäure, d. h. Leu, Ile, Val, Trp oder Phe.

[0056] Wie weiter oben festgestellt, sowie in Abhängigkeit von der gewählten Wirtszelle wird im Allgemeinen angenommen, dass es wichtig ist, dass der Peptidanhang mindestens einen Prolinrest umfasst, damit das modifizierte lipolytische Enzym gegen die proteolytische Degradation während der Prozessierung des Enzyms durch die gewählte Wirtszelle geschützt ist. Es kann wünschenswert sein, dass der Prolinrest Position zwei (d. h. b) und/oder Position drei (d. h. c) des Peptidanhangs einnimmt oder eine Position nahe an dem gewünschten Spaltpunkt (d. h. der Punkt, an dem man die Prozessierung durch die fragliche Wirtszelle stattzufinden glaubt). Demgemäß ist in einer Ausführungsform b und optional c des Peptidanhangs Pro.

[0057] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist a-b SP (Ser-Pro), A-P oder Q-P. Wenn der Peptidanhang mehr Aminosäurereste enthält, z. B. zwischen 4 und 7 Aminosäuren, folgt der Peptidanhang der allgemeinen Formel SPcd, SPcde, SPcdef, SPcdefg oder APcd, APcde, APcdef, APcdefg oder QPcd, QPcde, QPcdef QPcdefg. In jeder dieser Formeln kann c, d, e, f und g jede Aminosäure sein. Jedoch sind die zuvor erwähnten Gruppen von Aminosäuren bevorzugt.

[0058] In einer weiteren Ausführungsform umfasst a-b mindestens eine positive Aminosäure (d. h. Arg und Lys) oder hydrophobe Aminosäurereste (d. h. Leu, Ile, Val, Trp und Phe).

[0059] Spezifisch kann der an das lipolytische Stammenzym angehängte Peptidanhang vorteilhafterweise eines der folgenden Aminosäurereste oder Peptide sein:

Arg-Pro-Val-Ser-Gln-Asp (RPVSQD)
Ser-Pro-Ile-Arg-Met (SPIRM) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg (SPIRAR) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg (SIPRPR) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg (SPIRER) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Lys (SPIRK) oder
Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SPIKK) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro (SPIRRP) oder
Ser-Pro-Pro-Arg-Arg (SPPRR) oder
Ser-Pro-Ile-Pro-Arg (SIPPR) oder
Ser-Pro-Arg-Pro-Arg (SPRPR) oder
Ser-Pro-Ile-Arg (SPIR) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Arg (SPIRR) oder
Ser-Cys-Ile-Arg-Arg, (SCIRR) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SIPRPRP) oder
Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (SCPIRPRP) oder

Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr (SPRRPRT) oder
 Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu (SPFRPKL) oder
 Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro (SPPRRP) oder
 Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu (SPIRRE) oder
 Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro (SPPRPP) oder
 Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg (SPPRPR) oder
 Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro (SPPWWP) oder
 Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro (SPPWRP) oder
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro (SPPRWP) oder
 Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro (SPPRWP) oder
 Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp (SHWRRW) oder
 Ser-His-Trp-Arg-Lys (SHWRK) oder
 Ser-His-Trp-Arg-Arg (SHWRR) oder
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK),
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP),
 Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (GPIRPRP) oder
 Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro (LPFRQRP) oder
 Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asp-Ala (SRSRHNA) oder
 Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg (IPIRPRR) oder
 Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro (STRRPRP) oder
 Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys (TAIRPRK) oder
 Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg (WRWRWR) oder
 Glu-Pro-Ile-Arg-Arg (QPIRR) oder
 Ser-His-Trp-Glu-Glu (SHWQQ) oder
 Ser-Ala-Leu-Arg-Pro-Arg-Lys (SALRPRK)

[0060] Ebenfalls in Betracht kommen gemäß der Erfindung Anhänge umfassend mehr als 7 Aminosäuren, wie z. B. von 8 bis 15 Aminosäuren.

[0061] Solche Peptide können verallgemeinert werden als:
 a-b-c-d-e-f-g-h (8-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i (9-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j (10-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k (11-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l (12-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m (13-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n (14-Aminosäurenpeptid)
 a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l-m-n-o (15-Aminosäurenpeptid).

[0062] a bis o kann jede beliebige der zuvor erwähnten zwanzig Aminosäuren sein.

[0063] Der a-g-Bereich kann wie zuvor in Bezug auf einen Peptidanhang definiert sein, umfassend 1 bis 7 Aminosäurereste.

[0064] h, i, j, k, l, m, n, o kann wie zuvor jede Aminosäure sein, bevorzugt eine der folgenden Aminosäuren: Arg, Lys, Ala, Val, Trp, Ile, Phe, Ser oder Pro.

[0065] Spezifische Beispiele solcher Anhänge sind unten aufgelistet:

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (RPRPRPRP) oder
Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys (SSTRRASPIKK) oder
Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro (AWWPSPIRPRP) oder
Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP) oder
Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser (APPPRTRPRPRS) oder
Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro (SPKRKPRP) oder
Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys (SQRIKQRIK) oder
Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPPRPRP) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg SPIRPRPRPR oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro (SPIRKAWWP) oder
Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPKASPRQRP) oder
Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg (SPIRPRPSPIRPRP) oder
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg (SPPRWPRR) oder
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPRWPRW) oder
Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPRWPRWR) oder
Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg (SPPWRPRR) oder
Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp (SPPWWPRW) oder
Ser-Pro-Por-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg (SPPWWPWR) oder
Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp (SPPWWPWW) oder
Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (SPPWPRPRP) oder
Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser (APPPRPRLLPIS) oder
Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro (APPPTQRQSP) oder
Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro (APPPTIPRSSP).

[0066] In jeder der zuvor spezifizierten Peptidanhänge (ob umfassend 1 bis 7 oder 1 bis 15 Aminosäurereste), in denen die Position „a“ ein Ser, Ala, Arg, Lys oder Pro ist, kann das Ser durch ein Ala, Arg, Lys oder Pro, das Ala durch ein Ser, Arg, Lys oder Pro und das Arg, Lys oder Pro durch ein Ala oder Ser ersetzt werden.

[0067] Es soll betont werden, dass der obige Peptidanhang entweder am N-terminalen und/oder C-terminalen Ende sein kann. Beispiele für modifizierte lipolytische Enzyme mit sowohl N-terminalem als auch C-terminalem Peptidanhang schließen alle spezifisch zuvor erwähnten Kombinationen von Peptidanhängen ein. Zwei spezifische solche Beispiele sind der N-terminalen Anhang SPIRPRP zusammen mit dem C-terminalen Anhang RRP oder RR.

[0068] Wenn der Peptidanhang in den nicht-strukturellen Teil des Stammenzyms eingefügt ist, kann er einen oder mehrere Aminosäurereste des nicht-strukturellen Teils ersetzen. Beispielsweise kann der Peptidanhang einen oder mehrere Aminosäurereste ersetzen, welche die ersten, z. B. 1-5, Aminosäurereste des N-terminalen Endes und/oder die letzten, e. g. 1-5, Aminosäurereste des Enzyms (d. h. die 1-5 Aminosäurereste des C-terminalen Endes) besetzen. Beispielsweise kann der Peptidanhang Aminosäurerest(e) 1 und/oder 2 und/oder 3 und/oder 4 und/oder 5, usw. von jedem Ende des Stammenzyms ersetzen.

[0069] Wenn das Stammenzym eine H. lanuginosa-Lipase ist, ist es von besonderem Interesse, jede der obigen Peptidanhänge (am N-Terminus) mit einer Deletion der stamm-ersten (1E) zu kombinieren.

[0070] Gemäß der Erfindung kommt es außerdem in Betracht, an das modifizierte Enzym eine oder mehrere geladene Aminosäuren anzuhängen, welche eine effiziente Reinigung des Enzyms erlauben. Verfahren dafür sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt.

[0071] Verfahren zum Anhängen eines Peptidanhangs an ein lipolytisches Stammenzym Obwohl ein erfindungsgemäßes modifiziertes Enzym durch Anfügen (fusionieren oder einfügen) eines synthetisch hergestellten Peptidanhangs an das fragliche lipolytische Stammenzym erhalten werden kann, ist es vorliegend bevorzugt, dass das erfindungsgemäße modifizierte Enzym hergestellt wird durch i) Modifizieren der Nukleotid-vor-zugsweise DNA-Sequenz, die für das Stammenzym kodiert, so dass sie für den gewünschten Peptidanhang an dem/den N-terminalen und/oder C-terminalen Ende(n) des Stammenzys kodiert (z. B. durch Insertion einer Nukleinsäure-, (bevorzugt DNA-) Sequenz, die für den Peptidanhang kodiert, in eine zweckmäßige Stelle innerhalb der Nukleinsäure- (bevorzugt DNA-) Sequenz, ii) Exprimieren der erhaltenen modifizierten Nukleinsäure- (bevorzugt DNA-) Sequenz in einem geeigneten Expressionssystem, und iii) Gewinnen des erhaltenen modifizierten Enzyms.

[0072] Im vorliegenden Zusammenhang soll der Begriff „angehängt an“ bezeichnen, dass der Anhang an das N-terminale und/oder C-terminale Ende (z. B. an den ersten oder letzten Aminosäurerest) des reifen Enzyms fusioniert oder in einen nicht-strukturellen Teil des N-terminalen und/oder C-terminalen Endes des reifen Enzyms eingefügt ist.

[0073] Viele Enzyme werden als Prä-Pro-Enzyme exprimiert, d. h. als Enzyme, die aus dem reifen Enzym, einem sekretorischen Signalpeptid (d. h. Präpeptid) und einem Pro-Peptid bestehen. Das Prä-Pro-Enzym wird intrazellulär prozessiert und in das Fermentierungsmedium sezerniert, aus dem das reife Enzym isoliert und/oder gereinigt werden kann. Das Anhängen des Peptidanhangs an das Stammenzym kann erfolgen, indem die für die gewünschten Peptidanhänge kodierenden Nukleinsäuresequenzen stromaufwärts (für N-terminale Peptidanhänge) und/oder stromabwärts (für C-terminale Peptidanhänge) an die für das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz angehängt werden.

[0074] Die Insertion sollte so erfolgen, dass das gewünschte modifizierte Enzym (d. h. mit den/dem gewünschten Peptidanhang/-anhängen) von der Wirtszelle exprimiert und nach Transkription, Translation und Prozessierung des Enzyms sezerniert wird. Der Begriff „Prozessierung“ bedeutet in diesem Zusammenhang die Entfernung von Prä- und Pro-Peptiden (außer natürlich wenn das Propeptid mit dem gewünschten Peptidanhang identisch ist. Darauf wird weiter unten näher eingegangen).

[0075] Stromabwärts liegende Sequenzen (die für einen C-terminalen Anhang kodieren) können zwischen die für das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz und das Stopp-Kodon eingefügt werden. Wenn jedoch die unprozessierte DNA-Sequenz eine für ein Pro-Peptid kodierende DNA-Sequenz am C-Terminus umfasst, kann die Einfügung/Anfügung der für den Peptidanhang kodierenden DNA-Sequenz auch zwischen den für das Pro-Peptid beziehungsweise für das reife Enzym kodierenden DNA-Sequenzen erfolgen.

[0076] In den meisten Fällen ist es möglich, das Stammenzym stromaufwärts zu verlängern, indem eine für einen Peptidanhang kodierende DNA-Sequenz zwischen die DNA-Sequenz, die für das Pro-Peptid oder das Präpeptid (wenn keine Prosequenz vorhanden ist) kodiert, und die DNA-Sequenz, die für das reife Enzym kodiert, eingefügt wird.

[0077] Die Einfügung/Anfügung der für den Peptidanhang kodierenden DNA-Sequenz kann nach Standardverfahren, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt sind, durchgeführt werden, vgl., z. B. Sambrook et al., 1989). Diese schließen, z. B., die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels spezifischer Primer ein, beispielsweise beschrieben in dem US-Patent 4,683,202 oder R. K. Saiki et al., (1988), Science, 239, 487–491. Wie man die Expression und Sekretion der benachbarten DNA-Sequenzen) bewirkt, wird weiter unten beschrieben werden.

[0078] In Verbindung mit der vorliegenden Erfindung wurde gefunden, dass einige Wirtszellen für die Herstellung eines gewünschten modifizierten Enzyms weniger geeignet sind, da der/die Peptidanhang/-anhänge teilweise oder vollständig während der von der Wirtszelle vorgenommenen posttranslationalen oder anderer Prozessierung abgeschnitten werden. Demgemäß soll der Begriff „geeignetes Expressionssystem“ ein Expressionssystem (Wirtszelle oder optional Expressionsvektor) bezeichnen, welches die Herstellung zumindest eines Teils eines intakten gewünschten modifizierten Enzyms erlaubt, d. h. ein Expressionssystem, welches den Peptidanhang, z. B. als Teil einer durch die ausgewählte Wirtszelle vorgenommene posttranslationale oder andere Prozessierung, nicht teilweise oder vollständig entfernt (und damit ein Enzym ohne den gewünschten Peptidanhang erzeugt). Üblicherweise ist das verwendete Wirtssystem frei von einer oder mehreren proteolytischen Aktivitäten, welche die ungewünschte posttranslationale Prozessierung ausüben. Die Auswahl des Expressionssystems und folglich der Wirtszelle wird von dem herzustellenden lipolytischen Enzym abhängen, wie im Detail weiter unten erörtert wird.

[0079] Während bei der Auswahl eines geeigneten Expressionssystems zur Herstellung eines fraglichen modifizierten Enzyms (insbesondere wenn eine modifizierte DNA-Sequenz zur Herstellung verwendet wird) Um-sicht geboten ist, wurde gefunden, dass ein erfindungsgemäßes modifiziertes lipolytisches Enzym (mit einer verbesserten Waschleistung) erhalten werden kann, indem eine für das fragliche lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz in einem Expressionssystem exprimiert wird, welches translatierte Polypeptide nicht auf normale Weise prozessieren kann, und somit ein Enzym entsteht, welches das Propeptid oder ein ähnliches Peptid, das mit dem reifen Protein vor der Prozessierung assoziiert ist, ganz oder teilweise umfasst. In diesem Fall stellt das Propeptid oder das ähnliche Peptid den Peptidanhang dar. Das Pro-Peptid oder das ähnliche Peptid kann heterolog oder homolog zum Stammenzym und kann sowohl am N-terminalen als auch am C-terminalen Ende des Stammenzyms vorhanden sein. Die Herstellung eines erfindungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzym unter Verwendung des letzteren Verfahrens ist weiter unten beschrieben.

[0080] Demgemäß kann, wenn ein geeigneter Bereich von Aminosäuren bereits in der Prä-Pro-Form des Stammenzyms kodiert wird und dieser Bereich von Aminosäuren bei der Prozessierung des Enzyms in einem bestimmten Expressionssystem abgeschnitten wird, der Peptidanhang durch Wechsel des Expressionssystems auf ein Wirtssystem, in welchem die Prozessierung des Bereiches von Aminosäuren nicht stattfinden, angehängt werden. In einem solchen Fall wird das sekretorische Signalpräpeptid während oder nach der Sekretion abgeschnitten, wodurch ein modifiziertes Enzym entsteht, das aus dem Stammenzym umfassend ein durch die entsprechende DNA-Sequenz kodiertes Propeptid oder ein Teil davon oder eine ähnliche Peptidsequenz besteht, d. h. ein lipolytisches Enzym, das entweder an seinem N-terminalen oder C-terminalen Ende verlängert ist.

[0081] Mit anderen Worten betrifft die Erfindung in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zum Steigern der Waschleistung oder anderen Aktivität eines Stammenzyms, umfassend die Schritte:

- Einbringen einer für das lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor,
- Einbringen der DNA-Sequenz oder des Expressionsektors in eine Wirtszelle, die nicht oder schlecht das exprimierte Pro-Enzym in das reife Enzym prozessiert,
- Kultivieren der Wirtszelle unter Bedingungen, die für die Herstellung des Enzyms umfassend einen Teil der ganzen Pro-(Prä)-Sequenz geeignet sind, und
- Gewinnen und optional Reinigen des erhaltenen modifizierten Enzyms.

[0082] Es wurde gefunden, dass Hefezellen zum Anhängen von Peptidanhängen (in Form des Propeptids oder eines Teils davon) an lipolytische Stammenzyme aus Pilzen von besonderem Nutzen sind, insbesondere das *H. lanuginosa*-Lipaseenzym.

[0083] In einer alternativen und äußerst bevorzugten Ausführungsform ist der Peptidanhang mittels Zufalls-mutagenese gemäß den folgenden Grundlagen gestaltet und angehängt:

- Unterziehen einer für ein lipolytisches Stammenzym mit Peptidanhang kodierenden DNA-Sequenz der lokalisierten Zufallsmutagenese in dem Peptidanhang oder in einem nicht-strukturellen Teil des N-terminalen oder C-terminalen Endes des Stammenzyms,
- Exprimieren der mutierten, in Schritt a) erhaltenen DNA-Sequenz in einer Wirtszelle, und
- Durchmustern nach Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym mit einer im Vergleich zum lipolytischen Stammenzym verbesserten Waschleistung exprimieren.

[0084] Anhand dieser Vorgehensweise sind zahlreiche äußerst vorteilhafte Peptidanhänge erzeugt worden.

[0085] Die lokalisierte Zufallsmutagenese kann wie in WO 95/22615 im Wesentlichen beschrieben durchgeführt werden. Genauer ausgedrückt wird die Mutagenese unter Bedingungen durchgeführt, bei denen nur eine oder mehrere der obigen Bereiche der Mutagenese unterzogen werden. Insbesondere zum Mutagenisieren großer Peptidanhänge kann es zweckmäßig sein, PCR-erzeugte Mutagenese anzuwenden (z. B. wie von Deshler 1992 oder Leung et al., 1989 beschrieben), wobei eine oder mehrere geeignete Oligonukleotidsonden verwendet werden, die den zu mutagenisierenden Bereich flankieren. Für die Mutagenese von kürzeren Peptidanhängen ist es mehr bevorzugt, die lokalisierte Zufallsmutagenese mittels „doped“ oder „spiked“ Oligonukleotide durchzuführen. Das Doping oder Spiking wird verwendet, um z. B. Kodons für ungewünschte Aminosäuren zu vermeiden oder um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein besonderer Typ von Aminosäurerest, wie z. B. ein positiv geladener oder hydrophober Aminosäurerest, in die gewünschte Stelle eingebracht wird.

[0086] Im Anschluss an die Mutagenese wird die mutierte DNA durch Kultivieren einer geeigneten Wirtszelle, welche die DNA-Sequenz trägt, unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, exprimiert. Die für diesen

Zweck verwendete Wirtszelle kann eine sein, die mit der mutierten DNA-Sequenz, optional in einem Vektor vorliegend, transformiert worden ist, oder eine, die für das Stammenzym kodierende DNA-Sequenz während der Mutagenesebehandlung trug. Beispiele geeigneter Wirtszellen sind unten aufgeführt, und sie ist vorzugsweise eine Wirtszelle, die das mutierte Enzym sezernieren kann (und somit ein einfaches Durchmustern ermöglicht). Hefezellen, wie z. B. Zellen von *S. cerevisiae*, haben sich als geeignete Wirtszellen herausgestellt.

[0087] Die Kriterien für das Durchmustern in Schritt c) müssen in Abhängigkeit von den gewünschten Eigenschaften des modifizierten lipolytischen Enzyms gewählt werden. Wenn die Konstruktion eines modifizierten lipolytischen Enzyms mit einer verbesserten Waschleistung gewünscht ist, ist es günstig, nach einer verminderten Kalziumabhängigkeit und/oder nach einer höheren Toleranz gegenüber einem Waschmittel oder eines Waschmittelbestandteils durchzumustern. Das Waschmittel oder der Waschmittelbestandteil kann jeder der spezifischen Bestandteile sein, die weiter unten im Abschnitt über Waschmittelbestandteile erwähnt sind. Ein bevorzugter Waschmittelbestandteil ist ein nicht-ionisches oder ein anionisches Tensid, wie z. B. ein Alkoholethoxylat oder LAS, ein bevorzugtes Waschmittel ist das in Material und Methoden unten beschriebene PCS. Nicht-ionische Tenside sind zum Durchmustern des *H. lanuginosa*-Lipasentyps (z. B. Lipasen aus Pilzen) von besonderem Interesse, wohingegen anionische Tenside für das Durchmustern des *Pseudomonas*-Lipasentyps von Interesse sind.

[0088] Das Durchmustern von Schritt c) wird günstigerweise mittels eines Filterassays basierend auf den folgenden Grundlagen durchgeführt:

[0089] Ein Mikroorganismus, der das interessierende modifizierte lipolytische Enzym exprimieren kann, wird auf einem für die Sekretion des Enzyms geeigneten Medium und geeigneten Bedingungen inkubiert, wobei das Medium mit einem Doppelfilter umfassend einen ersten Proteinbindefilter und/oder darüber einen zweiten Filter mit geringer Proteinbindefähigkeit versehen wird. Der Mikroorganismus befindet sich auf dem zweiten Filter. Im Anschluss an die Inkubation wird der erste Filter umfassend die vom Mikroorganismus sezernierten Enzyme von dem zweiten Filter umfassend den Mikroorganismus getrennt. Der erste Filter wird dem Durchmustern nach der gewünschten Enzymaktivität unterzogen und die entsprechenden mikrobiellen Kolonien auf dem zweiten Filter werden identifiziert.

[0090] Der für die Bindung der enzymatischen Aktivität verwendete Filter kann jeder Proteinbindefilter, z. B. Nylon oder Nitrozellulose, sein. Der obere Filter mit den Kolonien des Expressionsorganismus kann jeder Filter mit keiner oder einer geringen Affinität zum Binden von Proteinen sein, z. B. Zelluloseacetat oder Durapore™. Der Filter kann mit allen zum Durchmustern gängigen Bedingungen vorbehandelt werden oder kann während des Nachweises der enzymatischen Aktivität behandelt werden.

[0091] Die enzymatische Aktivität kann mittels eines Farbstoffs, Fluoreszenz, Präzipitation, pH-Indikator, IR-Absorption oder mit jedem anderen Verfahren zum Nachweis enzymatischer Aktivität nachgewiesen werden.

[0092] Die nachweisende Substanz kann mit jedem Immobilisierungsmittel, z. B. Agarose, Agar, Gelatine, Polyacrylamid, Stärke, Filterpapier, Stoffgewebe, oder mit jeder Kombination von Immobilisierungsmitteln immobilisiert werden.

[0093] Die Lipaseaktivität kann mittels Brilliant-Green, Rhodamin B oder Sudan-Schwarz in Kombination mit einem Lipid z. B. Olivenöl oder Schweinefett, nachgewiesen werden. Durchmusterungskriterien zum Identifizieren modifizierter lipolytischer Enzyme mit verbesserter Waschleistung können zum Beispiel EGTA, EDTA, nicht-ionische oder anionische Tenside, alkalischer pH, oder jede Waschmittelzusammensetzung in Kombination mit einem der oben genannten Mittel zum Nachweis der enzymatischen Aktivität sein.

[0094] Es versteht sich, dass die in dem erfindungsgemäßen Filterassay angewendeten Durchmusterungskriterien so ausgewählt sein können, dass sie den gewünschten Eigenschaften oder Verwendungen der durchzumusternden Enzyme Genüge leisten. Beispielsweise kann es beim Durchmustern nach lipolytischen Enzymen zur besonderen Verwendung in der, Papier- und Zellstoffindustrie zweckmäßig sein, nach einem sauren Enzym mit erhöhter Temperaturstabilität durchzumustern. Dies kann unter Verwendung eines Puffers mit saurem pH (z. B. pH 4) und/oder Inkubation bei höherer Temperatur vor oder während des Assays geschehen. Das Durchmustern von Waschmittelenzymen erfolgt üblicherweise bei alkalischem pH.

[0095] Alternativ kann das Durchmustern erfolgen, indem man das mutierte lipolytische, aus Schritt b) erhaltenen Enzym isoliert und seine Waschleistung (oder jede andere zweckmäßige Eigenschaft) testet. Als letzteres

genannter „*in vivo*“-Test kann auch zusätzlich zu dem Durchmusterungsassay verwendet werden, um aus den im Durchmusterungsassay ausgewählten Enzymen die besten zu identifizieren. Schließlich kann zur Bestätigung der Aminosäuresequenz des Peptidanhangs die Aminosäuresequenz des erhaltenen Enzyms sequenziert werden.

Verfahren zum Verbessern von Eigenschaften

[0096] Es ist ebenfalls Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Eigenschaften, insbesondere die Waschleistung der zuvor erwähnten lipolytischen Stammenzyme, zu verbessern. Es wird davon ausgegangen, dass die anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens erzielten, verbesserten Eigenschaften Ergebnis einer erhöhten Affinität zu dem Lipidsubstrat sind.

[0097] Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst das Anhängen eines Peptidanhangs an den N-Terminus oder C-Terminus des Stammenzyms in seiner reifen Form. In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform geschieht dies, indem ein Peptidanhang durch Kultivieren einer Wirtszelle umfassend eine DNA-Sequenz, die für die Prä-, Pro- oder Präpro-Form des lipolytischen Stammenzyms kodiert, und das Stammenzym angehängt wird. Optional liegt die DNA-Sequenz in einem Vektor vor. Das Gewinnen des erhaltenen modifizierten lipolytischen Enzyms, die Wirtszelle, die Kultivierungsbedingungen und/oder Gewinnungsbedingungen sind so gewählt, dass höchstens eine teilweise Prozessierung der Prä-, Pro- oder Präpro-Form des Stammenzyms stattfindet, wodurch mindestens 5%, wie z. B. mindestens 10%, wie z. B. mindestens 15%, wie z. B. mindestens 20%, wie z. B. mindestens 25%, wie z. B. mindestens 50%, wie z. B. mindestens 75% der hergestellten modifizierten Enzymmoleküle den gewünschten Peptidanhang, z. B. die ganze Pro-Sequenz oder einen wesentlichen Teil davon, umfassen.

[0098] Die Wirtszelle kann unterschiedlicher Herkunft sein als das Stammenzym, z. B. von einer anderen Gattung als die, von der das Stammenzym stammt, oder kann einen anderen posttranslationalen Prozessierungsapparat als der Ursprung des Stammenzyms aufweisen.

[0099] Das lipolytische Stammenzym stammt vorzugsweise von einem filamentösen Pilz, wie z. B. einem Stamm von *Humicola* sp., insbesondere *H. lanuginosa*, oder einem Bakterium, wie z. B. ein Stamm von *Pseudomonas* sp., und die Wirtszelle ist eine Hefezelle, wie z. B. ein Stamm von *Saccharomyces* sp., insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*, oder ein Stamm von *Hansenula* sp.

[0100] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die inhärente Fähigkeit zum Herstellen proteolytischer Enzyme in der Wirtszelle, die zum Anhängen eines Peptidanhangs an das lipolytische Stammenzym verwendet wird, vermindert, z. B. indem die Herstellung von einem oder mehreren proteolytischen Enzymen in der Wirtszelle unterbunden wird.

[0101] Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die Schritte:

- a) Unterziehen einer für ein lipolytisches Stammenzym mit Peptidanhang kodierenden DNA-Sequenz, wie z. B. eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, der lokalierten Zufallsmutagenese in dem Teil der DNA-Sequenz, der für den Peptidanhang oder einen nicht-strukturellen Teil des N-terminalen oder C-terminalen Endes des Stammenzyms kodiert,
- b) Exprimieren der mutierten, in Schritt a) erhaltenen DNA-Sequenz in einer Wirtszelle, und
- c) Durchmustern nach Wirtszellen, die ein mutiertes lipolytisches Enzym mit einer im Vergleich zum lipolytischen Stammenzym verbesserten Waschleistung exprimieren.

[0102] In einer Ausführungsform ist die DNA-Sequenz das Gen oder die cDNA-Sequenz, die für das Stammenzym in seiner Pro- oder Präpro-Form kodiert.

[0103] Gemäß der Erfindung kommt es außerdem in Betracht, eine Mutation in den nicht-strukturellen Teil des C-Terminus oder N-Terminus des Stammenzyms in seiner reifen Form einzuführen, z. B. durch Deletieren oder Ersetzen eines negativ geladenen Aminosäurerests des nicht-strukturellen Teils mit einem neutralen oder positiv geladenen Aminosäurerest oder mit einem hydrophoben Aminosäurerest, oder durch Ersetzen eines neutralen Aminosäurerests mit einem positiv geladenen Aminosäurerest.

Lipolytisches Stammenzym

[0104] Die erfindungsgemäßen lipolytischen Enzyme können von jedem lipolytischen Stammenzym mikrobieller Herkunft konstruiert werden, vorzugsweise bakterieller Herkunft oder aus Pilzen (d. h. filamentöse Pilze

oder Hefe).

[0105] Gemäß der Erfindung kann das erfindungsgemäße Enzym jedes lipolytische Enzym einschließlich Lipasen, Phospholipasen, Esterasen und Cutinasen (gemäß der herkömmlichen Terminologie) sein.

[0106] Es versteht sich, dass lipolytische Enzyme, die Pro- und/oder Prä-Peptide in unprozessiertem Stadium üblicherweise umfassen sowie nicht umfassen, als Stammenzym für die erfindungsgemäße Modifizierung in Betracht kommen.

[0107] Beispiele zweckmäßiger lipolytischer Stammenzyme schließen von den folgenden Mikroorganismen stammende Enzyme ein:

Humicola, z. B. *H. brevispora*, *H. lanuginosa*, *H. brevis* var. *thermoida* und *H. insolens* (US 4,810,414) oder WO 96/13580;

Pseudomonas, z. B. *Ps. fragi*, *Ps. stutzeri*, *Ps. cepacia* und *Ps. fluorescens* (WO 89/04361) oder *Ps. plantarum* oder *Ps. gladioli* (US-Patent-Nr. 4,950,417 (Solvay-Enzyme)) oder *Ps. alcaligenes* und *Ps. pseudoalcaligenes* (EP 218 272 oder WO 94/25578) oder *Ps. mendocina* (WO 88/09367, US 5,389,536);

Fusarium, z. B. *F. oxysporum* (EP 130,064) oder *F. solani pisi* (WO 90/09446); Mucor (auch bezeichnet Rhizomucor), z. B. *M. miehei* (EP 238 023);

Absidia sp. (WO 96/13578);

Chromobacterium (insbesondere *C. viscosum*);

Aspergillus (insbesondere *A. niger*);

Candida, z. B. *C. cylindracea* (auch bezeichnet *C. rugosa*) oder *C. antarctica* (WO 88/02775) oder

C. antarctica lipase A oder B (WO 94/01541 und WO 89/02916);

Geotricum, z. B. *G. candidum* (Schimada et al., (1989), J: Biochem., 106, 383–388);

Penicillium, z. B. *P. camembertii* (Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61–67);

Rhizopus, z. B. *R. delemar* (Hass et al., (1991), Gene 109, 107–113) oder *R. niveus* (Kugimiya et al., (1992)

Biosci. Biotech. Biochem 56, 716–719) oder *R. oryzae*; und

Bacillus, z. B. *B. subtilis* (Dartois et al., (1993) Biochemica et Biophysica acta 1131, 253–260) oder *B. stearothermophilus* (JP 64/7744992) oder *B. pumilus* (WO 91/16422).

[0108] Der Gattungsname Thermomyces lanuginosus wurde 1899 von Tsiklinsky für eine Spezies, Thermomyces lanuginosus, eingeführt. Die Spezies ist morphologisch und physiologisch sehr charakteristisch, und es besteht wenig Zweifel, dass Tsiklinsky's Thermomyces lanuginosus die gleiche ist, wie die von nachfolgenden Wissenschaftlern (wie beispielsweise Bunce (1961) und Cooney & Emerson (1964)) als Humicola lanuginosa isolierte und beschriebene.

[0109] Gemäß des Internationalen Codes der Botanischen Nomenklatur ist der am frühesten legitimierte der richtige Name. Folglich sollte Thermomyces lanuginosus der richtige Name sein. Jedoch wurde diese Legitimation aufgrund Tsiklinsky's unvollständiger Beschreibung der Spezies von vielen Mykologen in Frage gestellt. Folglich liegt die Hauptursache für die taxonomische Verwirrung in unterschiedlichen Ansichten darüber, ob Tsiklinsky's Beschreibung die Erfordernisse für eine stichhaltige Veröffentlichung erfüllt.

[0110] Jedoch sieht man den Namen Humicola lanuginosa nach wie vor in der Literatur, vermutlich aufgrund der Popularität des Buches von Cooney & Emerson (1964) „The thermophilic fungi“, in dem die Verwendung des Namens Humicola lanuginosa vorgeschlagen wird.

[0111] Man hat die DNA, die für einen Teil des 18S-Ribosomgens von Thermomyces lanuginosa kodiert, sequenziert. Die 18S-Sequenzen wurden mit anderen 18S-Sequenzen in der GenBank-Datenbank verglichen sowie einer phylogenetischen Analyse mittels Parsimonie (PAUP, Version 3.1.1, Smithsonian Institut, 1993) unterzogen. Damit ist Thermomyces lanuginosa eindeutig der Klasse der Plectomycetes zuzuordnen, vermutlich der Ordnung der Eurotiales. Gemäß des Entrez-Browsers am NCBI (National Center for Biotechnology Information) ist Thermomyces lanuginosa damit verwandt mit Familien wie z. B. Eremascaceae, Monoascaceae, Pseudoeurotiaceae und Trichocomaceae, letztere enthaltend Gattungen wie z. B. Emericella, Aspergillus, Penicillium, Eupenicillium, Paecilomyces, Talaromyces, Thermoascus und Scleroleista.

[0112] In Verbindung mit der vorliegenden Erfindung wird der Name Humicola lanuginosa verwendet.

[0113] In Verbindung mit den Pseudomonas sp.-Lipasen wurde gefunden, dass Lipasen folgender Organismen einen hohen Grad an Homologie aufweisen und folglich als zur selben Lipasefamilie gehörend erachtet werden.

[0114] Ps. ATCC21808, Ps. aeruginosa EF2, Ps. aeruginosa PAC1R, Ps. aeruginosa PAO1, Ps. aeruginosa TE3285, Ps. sp. 109, Ps. pseudoalcaligenes M1, Ps., glumae, Ps. cepacia DSM3959, Ps. cepacia M-12-33, Ps. sp. KWI-56, Ps. putida IFO3458, Ps. putid'a IFO12049 (Gilbert, E. J., (1993), Pseudomonas lipases: Biochemical properties and molecular cloning. Enzyme Microb. Technol., 15, 634–645).

[0115] Spezifische Beispiele von direkt kommerziell erhältlichen Lipasen, die gemäß der Erfindung modifiziert werden können, schließen Lipolase® und Lipolase® Ultra (erhältlich bei Novo Nordisk A/S) ein.

[0116] Beispiele anderer lipolytischer Enzyme, die gemäß der Erfindung spezifisch in Betracht kommen, sind Lumafast® (eine Ps. mendocina-Lipase von Genencor Int. Inc), Lipomax® (eine Ps. pseudocaligenes-Lipase von Genencor Int. Inc); eine Fusarium solani-Lipase (Culinase) von Unilever; eine Bacillus sp.-Lipase von Solvay Enzymes; und Liposam® (eine Ps. mendocina-Lipase von Showa Denko) und weiterhin die Pseudomonas sp.-Lipase beschrieben in WO 95/06720, die sequenziert worden ist und, wie man gefunden hat, eine in SEQ ID NO. 93 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.

[0117] Es muss betont werden, dass das lipolytische Stammenzym, aus dem das erfindungsgemäß modifizierte Enzym konstruiert werden kann, die zuvor erwähnten lipolytischen Enzyme und jede Variante, Modifizierung und Verkürzung davon einschließt.

[0118] Beispiele solcher Stammenzyme, welche spezifisch in Betracht kommen, schließen Enzyme ein, die in WO 92105249, WO 94101541, WO 94114951, WO 94/25577, WO 95/22615 beschrieben sind, sowie protein-gestaltete Lipasevarianten wie in EP 407 225 beschrieben; eine protein-gestaltete Ps. mendocina-Lipase wie in der US 5,352,594 beschrieben, eine Culinase-Variante wie in der WO 94114964 beschrieben; eine Variante eines lipolytischen Enzyms aus Aspergillus wie in dem EP-Patent 167,309 beschrieben, und eine Pseudomonas sp.-Lipase wie in WO 95/06720 beschrieben.

[0119] In der am meisten bevorzugten Ausführungsform stammt das Stammenzym von einem Stamm von Humicola sp. oder von einem Stamm von Pseudomonas sp oder einer Gattung, die man zur Pseudomonas-Familie gehörend erachtet.

[0120] In einer spezifischen erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die DNA-Sequenz, die für das Stammenzym mit lipolytischer Aktivität (das in ein erfindungsgemäßes modifiziertes Enzym prozessiert werden soll) kodiert, die für das Enzym mit lipolytischer Aktivität kodierende DNA-Sequenz, die von dem filamentösen Pilz Humicola lanuginosa wie in EP 305 216 beschrieben, abstammt. Die Aminosäuresequenz des Stammenzyms ist in diesem Fall die des sezernierten reifen Enzyms.

[0121] Es kommt vorliegend in Betracht, dass die Waschleistung und/oder Thermostabilität des modifizierten erfindungsgemäßen Enzyms weiter verbessert werden kann, wenn das Enzym glykosyliert wird. Demgemäß kann in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform das modifizierte Enzym glykosyliert sein. Die Aminosäuresequenz kann jeden Glykosylierungsgrad aufweisen.

Erfindungsgemäße DNA-Sequenz

[0122] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine für das erfindungsgemäß modifizierte Enzym mit lipolytischer Aktivität kodierende DNA-Sequenz.

[0123] Die das erfindungsgemäß modifizierte Enzym mit lipolytischer Aktivität kodierende DNA-Sequenz wird üblicherweise hergestellt, indem die das fragliche lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz mittels jeder geeigneten aus dem Stand der Technik bekannten Methode modifiziert wird (z. B. unter Verwendung von PCR wie zuvor erwähnt), kann aber auch mittels etablierter Standardverfahren synthetisch hergestellt werden, z. B. das Phosphoamidit-Verfahren, von Beaucage und Caruthers beschrieben (1981), Tetrahedron Letters 22, 1859–1869, oder das von Matthes et al., beschriebene Verfahren (1984), EMBO Journal 3, 801–805. Nach dem Phosphoamidit-Verfahren werden Oligonukleotide synthetisiert, z. B. in einem automatischen DNA-Synthesegerät, gereinigt, durch langsames Abkühlen zusammengefügt (annealed), ligiert und in geeignete Vektoren kloniert.

[0124] Eine das ausgewählte, lipolytische Stammenzym kodierende DNA-Sequenz kann mit herkömmlichen Verfahren erhalten werden. Beispielsweise kann die DNA-Sequenz aus einer genomischen oder DNA-Bank, die aus einem zweckmäßigen Organismus angefertigt wurde, isoliert werden, durch Expressionsklonierung erhalten werden, z. B. wie in WO 93/11249 beschrieben, oder synthetisch hergestellt werden.

[0125] In einer vorliegend bevorzugten Ausführungsform wird die das erfindungsgemäße modifizierte Enzym mit lipolytischer Aktivität kodierende DNA-Sequenz aus einer DNA-Sequenz angefertigt, die für ein aus *Humicola lanuginosa* stammendes lipolytisches Enzym kodiert und in EP 305 216 beschrieben ist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt die DNA-Sequenz von einem Stamm von *Pseudomonas* sp, insbesondere einem Stamm von *Ps. alcaligenes* oder *Ps. pseudoalcaligenes*.

[0126] Eine ein erfindungsgemäßes modifiziertes lipolytisches Enzym kodierende isolierte Nukleinsäuresequenz kann auf vielfache Weise manipuliert werden, um die Expression des Enzyms sicherzustellen. Eine Manipulierung der ein modifiziertes lipolytisches Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz vor ihrer Einfügung in einen Vektor kann in Abhängigkeit vom Expressionsvektor gewünscht oder erforderlich sein. Die Verfahren zum Modifizieren von Nukleinsäuresequenzen mittels Klonierungsverfahren sind aus dem Stand der Technik gut bekannt.

[0127] Der Begriff „Kontrollsequenzen“ ist hier dahingehend definiert, dass er alle Bestandteile, die zur Expression der kodierenden Sequenz der Nukleinsäuresequenz erforderlich oder vorteilhaft sind, einschließt. Jede Kontrollsequenz kann nativ aus der das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz stammen oder fremder Herkunft sein. Solche Kontrollsequenzen schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, einen Leader, eine Polyadenylierungssequenz, eine Propeptidsequenz, einen Promotor, eine Signalsequenz und einen Transkriptionsterminator ein. Die Kontrollsequenzen enthalten mindestens einen Promotor und transkriptionale und translationale Stopp-Signale. Die Kontrollsequenzen können zum Zweck der Einführung spezifischer Restriktionsschnittstellen, die eine Ligation der Kontrollsequenzen mit der kodierenden Region der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz erleichtern, mit Linkern versehen sein.

[0128] Die Kontrollsequenz kann eine geeignete Promotorsequenz, eine Nukleinsäuresequenz, die von der Wirtszelle zur Expression der Nukleinsäuresequenz erkannt wird, sein. Die Promotorsequenz enthält Transkriptions- und Translations-Kontrollsequenzen, die die Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms vermitteln. Der Promotor kann jede Nukleinsäuresequenz, die in der ausgewählten Wirtszelle transkriptionelle Aktivität aufweist sein und kann aus Genen, die für extrazelluläre oder intrazelluläre Polypeptide, die zur Wirtszelle entweder homolog oder heterolog sind, erhalten werden. Beispiele. geeigneter Promotoren zur Steuerung der Expression von erfindungsgemäßigen Nukleinsäurekonstrukten, insbesondere in einer bakteriellen Wirtszelle, sind Promotoren, die aus dem *E. coli* dac-Operon, dem Agarasegen (*dagA*) aus *Streptomyces coelicolor*, dem Levansucrasegen (*sacB*) oder dem Alkalische-Phosphatase-Gen aus *B. subtilis*, dem Alpha-Amylasegen (*amyL*) aus *B. licheniformis*, dem maltogenischen Amylasegen (*amyM*) aus *B. stearothermophilus*, dem Alpha-Amylasegen (*amyQ*) aus *B. amyloliquefaciens*, dem Penicillasegen (*PenP*) aus *B. licheniformis*, den *XylA*- und *XylB*-Genen aus *B. subtilis*, dem Xylosidasegen aus *B. pumilus* und dem prokaryotischen beta-Laktamase- oder Tryptophangen (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727–3731), sowie dem tac-Gen (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21–25) erhalten werden. Weitere Promotoren sind beschrieben in „Useful proteins from recombinant bacteria“ in Scientific American, 1980, 242: 74–94; und in Sambrook et al., 1989, supra. Beispiele geeigneter Promotoren zur Steuerung der Transkription von erfindungsgemäßigen Nukleinsäurekonstrukten in einer filamentösen Pilzwirtszelle sind Promotoren, die aus den Genen erhalten werden, die für die TAKA-Amylase aus *A. oryzae*, für die Triosephosphatisomerase aus *A. oryzae*, für die Aspartat-Protease aus *Rhizomucor miehei*, für die neutrale Alpha-Amylase aus *A. niger*, für die säure-stabile alpha-Amylase aus *A. niger*, für die Glucoamylase (*glaA*) aus *A. niger* oder *A. awamori*, für die Lipase aus *Rhizomucor miehei*, für die alkalische Protease aus *A. oryzae*, für die Triosephosphatisomerase aus *A. oryzae*, für die Acetamidase aus *A. nidulans*, für die trypsinähnliche Protease aus *Fusarium oxysporum* (beschrieben im US Patent No. 4,288,627, welche hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist) kodieren oder der ADH-3-Promotor (McNight et al., (1985), The EMBO J., 4, 2093–3099) und Hybride davon. Besonders bevorzugte Promotoren zur Verwendung in filamentösen Pilzwirtszellen sind die TAKA-Amylase- und *glaA*-Promotoren. In einem Hefewirt sind die Promotoren aus den glycolytischen Genen der Hefe (Hitzeman et al., (1989). J. Biol. Chem. 255, 12073–12080; Alber und Kawasaki (1982), J. Mol. Appl. Gen 1, 419–434) oder Alkoholdehydrogenasegene (Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al., Hrsg.), Plenum Press, New York, 1982), oder die TPI1-(US 4,599,311) oder ADH2-4c-Promotoren (Russell et al., (1983), Nature 304, 652–654). Verwendbare Promotoren werden erhalten aus dem Enolasegen aus *S. cerevisiae* (ENO-1), dem Galaktokinasegen aus *S. cerevisiae* (GAL1), den Alkoholdehydrogenase-/Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Genen (ADH2/GAP) aus *S. cerevisiae*, und dem 3-Phosphoglyceratkinalegen aus *S. cerevisiae*. Weitere verwendbare Promotoren für Hefewirtszellen sind von Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423–488 beschrieben.

[0129] Die Kontrollsequenz kann auch eine geeignete Transkriptionsterminatorsequenz sein, eine Sequenz,

die von einer Wirtszelle zum Terminieren der Transkription erkannt wird. Die Terminatorsequenz ist operabel mit dem 3'-Terminus der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz verbunden. Die Terminatorsequenz kann aus der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz stammen oder aus fremder Quelle erhalten werden. Jeder in einer ausgewählten Wirtszelle funktionelle Terminator kann für die vorliegende Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Terminatoren für filamentöse Pilzwirtzellen, werden aus den Genen erhalten, die für die TAKA-Amylase aus *A. oryzae*, für die Glucoamylase aus *A. niger*, für die Anthranilatsynthase aus *A. nidulans*, für die Alpha-Glucosidase aus *A. niger* und für die trypsinähnliche Protease aus *Fusarium oxysporum* kodieren. Bevorzugte Terminatoren für Hefewirtszellen werden erhalten aus Genen, die für die Enolase aus *S. cerevisiae*, dem Cytochrom C aus *S. cerevisiae* (CYC1) oder den Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAP) aus *S. cerevisiae* kodieren. Weitere verwendbare Terminatoren für Hefewirtszellen sind von Romanos et al., 1992, beschrieben.

[0130] Die Kontrollsequenz kann auch eine geeignete Leadersequenz sein, eine nichttranslatierte Region auf der mRNA, die für die Translation in der Wirtszelle wichtig ist. Die Leadersequenz ist operabel mit dem 5'-Terminus der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz verbunden. Die Leadersequenz kann aus der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz stammen oder aus fremder Quelle erhalten werden. Jede in einer ausgewählten Wirtszelle funktionelle Leadersequenz kann für die vorliegende Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Leadersequenzen für filamentöse Pilzwirtszellen werden erhalten aus den Genen, die für die TAKA-Amylase aus *A. oryzae* und für die Triosephosphat isomerase aus *A. oryzae* kodieren. Geeignete Leadersequenzen für Hefewirtszellen werden erhalten aus dem Enolasegen aus *S. cerevisiae* (ENO-1), dem 3-Phosphoglyceratkineasen aus *S. cerevisiae*, dem alpha-Faktor aus *S. cerevisiae* und den Alkoholdehydrogenase-/Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Genen (ADH2/GAP) aus *S. cerevisiae*.

[0131] Die Kontrollsequenz kann auch eine Polyadenylierungssequenz sein, eine Sequenz, die operabel mit dem 3'-Terminus der Nukleinsäuresequenz verbunden ist und die, wenn transkribiert, von der Wirtszelle als Signal zum Anhängen von Polyadenosinresten erkannt an die transkribierte mRNA erkannt wird. Die Polyadenylierungssequenz kann aus der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz stammen oder aus fremder Quelle erhalten werden. Jede in einer ausgewählten Wirtszelle funktionelle Polyadenylierungssequenz kann für die vorliegende Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Polyadenylierungssequenzen für filamentöse Wirtszellen werden erhalten von Genen, die für die TAKA-Amylase aus *A. oryzae*, für die Glucoamylase aus *A. niger*, für die Anthranilatsynthase aus *A. nidulans*, und für die Alpha-Glucosidase aus *A. niger* kodieren. Verwendbare Polyadenylierungssequenzen für Hefewirtszellen sind von Guo und Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983–5990, beschrieben. Polyadenylierungssequenzen für Säugewirtszellen sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0132] Die Kontrollsequenz kann auch eine für ein Signalpeptid kodierende Region sein, die für eine Aminosäuresequenz, welche mit dem Aminoterminus des modifizierten lipolytischen Enzyms verbunden ist und welche das exprimierte modifizierte lipolytische Enzym in den Sekretionsweg der Zelle steuert. Die für das Signalpeptid kodierende Region kann aus der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz stammen oder aus fremder Quelle erhalten werden. Das 5'-Ende der kodierenden Sequenz der Nukleinsäuresequenz kann inhärent eine für ein Signalpeptid kodierende Region enthalten, welche natürlicherweise im Translationsleseraster mit einem Abschnitt der kodierenden Region verbunden ist, die für das sezernierte modifizierte lipolytische Enzym kodiert. Alternativ kann das 5'-Ende der kodierenden Sequenz eine für ein Signalpeptid kodierende Region enthalten, die zu dem Anteil der kodierenden Region, die für das sezernierte modifizierte lipolytische Enzym kodiert, fremd ist. Die fremde, das Signalpeptid kodierende Region kann erforderlich sein, wenn die kodierende Sequenz normalerweise keine für ein Signalpeptid kodierende Region enthält. Alternativ kann die fremde, für das Signalpeptid kodierende Region einfach die natürliche für das Signalpeptid kodierende Region ersetzen, um eine verstärkte Sekretion des Enzyms im Verhältnis zur natürlichen das Signalpeptid kodierenden Region, die normalerweise mit der kodierenden Sequenz verbunden ist, zu erzielen. Die das Signalpeptid kodierende Region kann von einem Glucoamylasegen oder einem Amylasegen aus einer *Aspergillus*-Spezies, aus einem Lipase- oder Proteinasegen aus einer *Rhizomucor*-Spezies, von dem Gen für den alpha-Faktor von *Saccharomyces cerevisiae* oder aus dem Präprochymosingen des Kalbs erhalten werden. Eine wirksame für ein Signalpeptid kodierende Region für bakterielle Wirtszellen ist ein für ein Signalpeptid kodierende Region, die erhalten wird aus dem maltogenischen Amylasegen aus *Bacillus NCIB 11837*, aus dem alpha-Amylasegen aus *B. stearothermophilus*, aus dem Subtilisingen aus *B. licheniformis*, aus dem beta-Lactamasegen aus *B. licheniformis*, aus den neutralen Proteasegenen aus *B. stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*, und aus dem *PrsA*-Gen aus *B. subtilis*. Weitere Signalsequenzen sind von Simonen und Palva beschrieben, 1993, Microbiological Reviews 57: 109–137. Eine wirksame für ein Signalpeptid kodierende Region für filamentöse Pilzwirtszellen ist eine für ein Signalpeptid kodierende Region, die aus dem

TAKA-Amylasegen aus *A. oryzae*, dem neutralen Amylasegen aus *A. niger*, dem Aspartat-Proteasegen aus Rhizomucor miehei, dem Cellulasegen aus *H. lanuginosa* oder dem Lipasegen aus Rhizomucor miehei erhalten wird. Verwendbare Signalsequenzen für Hefewirtszellen werden aus Genen für den alpha-Faktor von *S. cerevisiae* und für Intertase aus *S. cerevisiae* erhalten. Weitere verwendbare für ein Signalpeptid kodierende Regionen sind beschrieben von Romanos et al., 1992, supra. Jedoch kann für die vorliegende Erfindung jede für ein Signalpeptid kodierende Region, die in der Lage ist, das exprimierte Enzym in den Sekretionsweg einer ausgewählten Wirtszelle zu steuern, verwendet werden.

[0133] Die Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung können auch eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen umfassen, die für einen oder mehrere Faktoren kodieren, die für die Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms vorteilhaft sind, z. B. einen Aktivator (z. B. einen trans-aktiven Faktor), ein Chaperon und eine prozessierende Protease. Die Nukleinsäuren, die einen oder mehrere dieser Faktoren kodieren, sind nicht notwendigerweise in Tandem mit der das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz. Ein Aktivator ist ein Protein, das die Transkription einer das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz aktiviert (Kudla et al., 1990, EMBO Journal 9: 1355–1364; Jarai und Buxton, 1994, Current Genetics 26: 2238–244; Verdier, 1990, Yeast 6: 271–297). Die den Aktivator kodierende Nukleinsäuresequenz kann aus Genen, die für NprA (*nprA*) aus *B. stearothermophilus*, das Hämataktivatorprotein 1 (*hap1*) aus *S. cerevisiae*, für das Galactose-metabolisierende Protein 4 (*gal4*) aus *S. cerevisiae*, und das Ammonium-regulierende Protein (*areA*) aus *A. nidulans* kodieren, erhalten werden. Für weitere Beispiele siehe Verdier, 1990, supra und MacKenzie et al., 1993, Journal of General Microbiology 139: 2295–2307. Ein Chaperon ist ein Protein, das die korrekte Faltung eines anderen Proteins fördert. (Hartl et al., 1994, TIBS 19: 20–25; Bergeron et al., 1994, TIBS 19: 124–128; Demolder et al., 1994, Journal of Biotechnology 32: 179–189, Craig, 1993, Science 260: 1902–1903; Gething and Sambrook, 1992, Nature 355: 33–45; Puig and Gilbert, 1994, Journal of Biological Chemistry 269: 7764–7771; Wang and Tsou, 1993, The FASEB Journal 7: 1515–11157; Robinson et al., 1994, Bio/Technology 1: 381: 384. Die für ein Chaperon kodierende Nukleinsäuresequenz kann aus Genen, die für GroE-Proteine aus *B. subtilis*, die die Proteindisulfidisomerase aus *A. oryzae*, für Calnexin aus *S. cerevisiae*, für BiP/GRP78 aus *S. cerevisiae* und für Hsp70 aus *S. cerevisiae*, kodieren, erhalten werden. Für weitere Beispiele siehe Gething und Sambrook, 1992, supra, und Hartl et al., 1994, supra. Jeder in der ausgewählten Wirtszelle funktionelle Faktor kann für die vorliegende Erfindung verwendet werden.

[0134] Es kann auch gewünscht sein, regulatorische Sequenzen anzufügen, welche die Regulation der Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms im Verhältnis zum Wachstum der Wirtszelle erlauben. Beispiele regulatorischer Sequenzen sind solche, die das An- und Abschalten der Genexpression als Antwort auf einen chemischen oder physikalischen Reiz bewirken, wobei die Anwesenheit einer regulatorischen Substanz eingeschlossen ist. Regulatorische Systeme in prokaryotischen Systemen würden die lac-, tac-, und trp-Operatorsysteme einschließen. In Hefe kann das ADH2-System oder das GAL1-System verwendet werden. In filamentösen Pilzen kann der TAKA-alpha-Amylase-Promotor, der Glucoamylase-Promotor aus *A. niger*, und der Glucoamylase-Promotor aus *A. oryzae* als regulatorische Sequenzen verwendet werden. Weitere Beispiele regulatorischer Sequenzen sind solche, die die Genamplifikation erlauben. In eukaryontischen Systemen schließen diese das Dihydrofolat-Reduktasegen, welches in Anwesenheit von Methotrexat amplifiziert wird, und die Methallothioningene, welche durch Schwermetalle amplifiziert werden, ein. In diesen Fällen wird die das modifizierte lipolytische Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz in Tandem zu der regulatorischen Sequenz platziert.

Expressionsvektoren

[0135] Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Expressionsvektoren umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, einen Promotor und transkriptionelle und translationale Stopp-Signale. Die verschiedenen Nukleinsäure- und Kontrollsequenzen wie oben beschrieben können miteinander verbunden sein, damit ein rekombinanter Expressionsvektor hergestellt wird, der eine oder mehrere günstige Restriktionsschnittstellen aufweist, welche die Insertion oder Substitution der für das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz an solchen Stellen erlauben. Alternativ kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz exprimiert werden, indem die Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt umfassend die Sequenz in eine für die Expression geeigneten Vektor eingefügt werden. Bei der Erzeugung des Expressionsvektors wird die kodierende Sequenz so im Vektor platziert, dass die kodierende Sequenz operabel mit für die Expression, und möglicherweise Sekretion, geeigneten Kontrollsequenzen verbunden ist.

[0136] Der rekombinante Expressionsvektor kann jeder Vektor sein, der günstigerweise rekombinanten DNA-Verfahren unterzogen werden und die Expression der Nukleinsäuresequenz bewirken kann. Die Auswahl des Vektors hängt üblicherweise von der Kompatibilität des Vektors mit der Wirtszelle, in welche der Vektor

eingebracht werden soll, ab. Die Vektoren können linear oder geschlossene zirkuläre Plasmide sein. Der Vektor kann ein autonom replizierender Vektor sein, d. h. ein Vektor, der als extrachromosomal Einheit, deren Replikation nicht von der chromosomalen Replikation abhängt, vorliegt, z. B. ein Plasmid, ein extrachromosomal Element, ein Minichromosom, oder ein artifizielles Chromosom. Der Vektor kann alle Elemente zur Sicherstellung der Selbstreplikation enthalten. Alternativ kann der Vektor ein Vektor sein, der nach Einbringen in die Wirtszelle in das Genom integriert wird und zusammen mit dem/den Chromosom(en), in das/die er integriert worden ist, repliziert wird. Das Vektorsystem kann ein einzelner Vektor oder Plasmid oder zwei oder mehrere Vektoren oder Plasmide sein, welche gemeinsam die gesamte, in das Genom der Wirtszelle einzubringende DNA oder ein Transposon enthalten.

[0137] Die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten vorzugsweise einen oder mehrere Selektionsmarker, welche die einfache Selektion transformierter Zellen erlauben. Ein Selektionsmarker ist ein Gen, dessen Genprodukt Resistenz gegenüber Bioziden, Viren oder Schwermetallen oder Prototrophie für auxotrophe Substanzen, und ähnliches, verleiht. Beispiele bakterieller Selektionsmarker sind die dal-Gene aus *B. licheniformis* oder *B. subtilis*, oder Marker welche Antibiotikaresistenz verleihen, wie z. B. Ampicillin-, Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyclinresistenz. Ein häufig verwendeter Säugerzellmarker ist das Dihydrofolatreduktasegen. Geeignete Marker für Hefewirtszellen sind ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, und URA3. Ein Selektionsmarker zur Verwendung in einer filamentösen Pilzwirtszelle kann ausgewählt sein aus der Gruppe einschließlich, aber nicht beschränkt auf, amdS- (Acetamidase), argB- (Ornithincarbamoyltransferase), bar- (Phosphonitrizinacetyltransferase), hygB- (Hygromycinphosphotransferase), niaD- (Nitratreduktase), pyrG- (Orotidin-5'-Phosphatdecarboxylase), sC- (Sulfatadenyltransferase), trpC- (Anthranilatsynthase) und Glufosinat-Resistenzmarker, sowie Äquivalente anderer Spezies. Bevorzugt zur Verwendung in einer *Aspergillus*-Zelle sind die amdS- und pyrG-Marker aus *A. nidulans* oder *A. oryzae* und der bar-Marker aus *Streptomyces hygroscopicus*. Weiterhin kann die Selektion durch Co-Transformation vollzogen werden, z. B. wie in der WO 91/17243 beschrieben, wobei sich der Selektionsmarker auf einem separaten Vektor befindet.

[0138] Die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten vorzugsweise ein Element(e), die eine stabile Integration des Vektors in das Wirtszellgenom oder die autonome Replikation des Vektors in der Zelle unabhängig vom Zellgenom erlauben.

[0139] Die erfindungsgemäßen Vektoren können nach Einbringen in die Wirtszelle in das Wirtszellegenom integriert werden. Zur Integration kann der Vektor auf die das modifizierte lipolytische Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz oder auf jedes andere Element zur stabilen Integration des Vektors in das Genom durch homologe oder nicht-homologe Rekombination beruhen. Alternativ kann der Vektor zusätzliche Nukleinsäuresequenzen enthalten, die die Integration in das Genom der Wirtszelle durch homologe Rekombination steuern. Die zusätzlichen Nukleinsäuresequenzen ermöglichen, dass der Vektor an (eine) genaue(n) Stelle(n) innerhalb des/der Chromosoms(en) in das Wirtszellgenom integriert wird. Um die Wahrscheinlichkeit für die Integration an einer genauen Stelle zu erhöhen, sollten die Integrationselemente vorzugsweise eine ausreichende Anzahl von Nukleinsäuren, wie z. B. 100 bis 1500 Basenpaare, bevorzugt 400 bis 1500 Basenpaare und am meisten bevorzugt 800 bis 1500 Basenpaare enthalten, die hoch homolog zu der korrespondierenden Zielsequenz sind, um die Wahrscheinlichkeit für homologe Rekombination zu erhöhen. Die Integrationselemente können jede Sequenz sein, die zu der Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homolog ist. Weiterhin können die Integrationselemente nicht-kodierende oder kodierende Nukleinsäuresequenzen sein. Andererseits kann der Vektor in das Wirtszellgenom durch nicht-homologe Rekombination integriert werden. Diese Nukleinsäuresequenzen können jede Sequenz sein, die zu der Zielsequenz im Genom der Wirtszelle homolog ist, und können weiterhin nicht-kodierende oder kodierende Sequenzen sein.

[0140] Für die autonome Replikation kann der Vektor weiterhin einen Replikationsursprung umfassen, der ermöglicht, dass der Vektor autonom in der fraglichen Wirtszelle repliziert wird. Beispiele bakterieller Replikationsursprünge sind die Replikationsursprünge der Plasmide pBR322, pUC19, pACYC177, pACYC184, pUB110, pE194, pTA1060 und pAM β 1. Beispiele für Replikationsursprünge in Hefewirtszellen sind der 2-Micron-Replikationsursprung, die Kombination von CEN6 und ARS4 und die Kombination von CEN3 und ARS1. Der Replikationsursprung kann einer mit einer Mutation sein, die seine Funktionalität in der Wirtszelle temperatursensitiv macht (siehe, z. B. Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

[0141] Um die Expression der Nukleinsäuresequenz zu verstärken, kann mehr als eine Kopie der ein erfindungsgemäßes modifiziertes lipolytisches Enzym kodierenden Nukleinsäuresequenz in die Wirtszelle eingelegt werden. Eine stabile Amplifikation der Nukleinsäuresequenz kann erhalten werden, wenn mindestens eine zusätzliche Kopie der

[0142] Sequenz mittels aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren in das Wirtszellgenom integriert und auf Transformanden selektiert wird.

[0143] Die zur Ligation der Elemente verwendeten Verfahren, die oben beschrieben sind, um erfindungsgemäße rekombinante Expressionsvektoren zu konstruieren, sind dem Fachmann bekannt (siehe, z. B. Sambrook et al., 1989, supra).

Wirtszellen

[0144] Die vorliegende Erfindung betrifft auch rekombinante Wirtszellen, umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, die günstigerweise für die rekombinante Herstellung des modifizierten lipolytischen Enzyms verwendet wird. Die Zelle wird bevorzugt mit einem Vektor umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz transformiert, gefolgt von der Integration des Vektors in das Wirtschromosom. „Transformation“ bedeutet Einbringen eines Vektors umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in eine Wirtszelle, so dass der Vektor als chromosomal Integration oder als selbst-replizierender extra-chromosomaler Vektor propagiert wird. Integration wird im Allgemeinen als vorteilhaft angesehen, da die Nukleinsäuresequenz mit höherer Wahrscheinlichkeit stabil in der Zelle propagiert wird. Integration des Vektors in das Wirtschromosom kann wie oben beschrieben durch homologe oder nicht-homologe Rekombination erfolgen.

[0145] Die Auswahl der Wirtszelle wird in hohem Maß von dem das modifizierte lipolytische Enzym kodierenden Gen und dessen Herkunft abhängen. Zusätzlich wird die Auswahl der Wirtszelle häufig von dem proteolytischen Enzymsystem der Wirtszelle und dessen Auswirkung auf die Herstellung des erfindungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzyms abhängen. Dementsprechend kann es gewünscht sein, eine Wirtszelle zu verwenden, die hinsichtlich einer oder mehrerer proteolytischer Enzyme oder weiterer enzymprozessierender Maßnahmen defizient ist. Protease-defiziente Wirtszellen bei Bakterien sowie bei Pilzzellen (filamentöse Pilze und Hefe) sind aus dem Stand der Technik gut bekannt.

[0146] Die Wirtszelle kann ein einzelliger oder ein nicht-einzelliger Organismus sein. Verwendbare einzellige Zellen sind Bakterienzellen wie z. B. gram-positive Bakterien einschließlich, aber nicht beschränkt auf, eine *Bacillus*-Zelle, z. B. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. latus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. laetus*, *B. megaterium*, und *B. thuringiensis*, oder eine *Streptomyces*-Zelle, z. B., *S. lividans* oder *S. murinus*, oder gram negative Bakterien, wie z. B. *E. coli* und *Pseudomonas* sp. (insbesondere wenn ein bakterielles lipolytisches Enzym, wie z. B. ein *Pseudomonas* sp.-Enzym hergestellt werden soll). Die Transformation der bakteriellen Wirtszelle kann, beispielsweise, mittels Protoplastentransformation (siehe z. B Chang und Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111–115), mittels kompetenter Zellen (siehe z. B. Young und Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823–829, oder Dubnar und Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209–221), mittels Elektroporation (siehe z. B. Shigekawa und Dower, 1988, Biotechniques 6: 742–751), oder mittels Konjugation (siehe z. B. Koehler und Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771–5278) bewirkt werden.

[0147] Die Wirtszelle kann ein Eukaryot sein, vorzugsweise ein Pilz, d. h. eine Hefezelle oder eine filamentöse Pilzzelle, insbesondere für die Herstellung eines modifizierten lipolytischen Enzyms eukaryotischen Ursprungs.

[0148] „Hefe“, wie vorliegend verwendet, schließt ascosporenogene Hefen (*Endomycetales*), basidiosporogene Hefen und Hefen, die zu den Fungi Imperfecti (*Blastomycetes*) gehören, ein. Die ascosporenogenen Hefen sind in die Familien *Spermophthoraceae* und *Saccharomycetaceae* eingeteilt. Letztere beinhalten vier Subfamilien, *Schizosaccharomycoideae* (z. B. die Gattung *Schizosaccharomyces*), *Nadsonoideae*, *Lipomycoideae*, und *Saccharomycoideae* (z. B. die Gattungen *Pichia*, *Kluyveromyces* und *Saccharomyces*). Die basidiosporogenen Hefen schließen die Gattungen *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, und *Filobasidiella* ein. Hefen, die zu den Fungi Imperfecti gehören, sind in die zwei Familien *Sporobolomycetaceae* (z. B. die Gattungen *Sporobolomyces* und *Bullera*) und *Cryptococcaceae* (z. B. Gattung *Candida*). Da sich die Klassifizierung der Hefe künftig wohl ändern wird, soll für die Zwecke der vorliegenden Erfindung Hefe definiert werden wie in *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F. A., passmore, S. M. und Davenport, R. R., Hrsg., Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980) beschrieben. Die Biologie der Hefe und die Manipulierung der Hefegenetik sind aus dem Stand der Technik bekannt (siehe z. B. *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Bacil, M., Horecker, B. J. und Stopani, A. O. M., Hrsg, 2. Auflage, 1987; *The Yeasts*, Rose, A. H., und Harrison, J. S., Hrsg., 2. Auflage, 1987; und *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Strathern et al., Hrsg, 1981). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Hefezellen, die üblicherweise ein anderes proteolytisches, enzymprozessierendes System aufweisen als z. B. Bakterien und

filamentöse Pilze, von besonderem Nutzen für die Herstellung modifizierter lipolytischer Enzyme, welche, als den Peptidanhang, die natürlichen Prosequenzen des fraglichen, lipolytischen Stammenzyms teilweise oder ganz umfassen. Wenn die Pilzwirtszelle eine Hefezelle ist (z. B. zum Anhängen eines Peptidanhangs in Form eines Teils oder der vollständigen Prosequenz des Stammenzyms); kann die Hefewirtszelle jede Zelle von einer Spezies von *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* oder *Yarrowia*, sein, wie z. B. eine *S. cerevisiae*-Zelle, eine *S. carlsbergensis*-Zelle, eine *S. diastaticus*-Zelle, eine *S. douglasii*-Zelle, eine *S. kluyverii*-Zelle, eine *S. norbensis*-Zelle oder eine *S. oviformis*-Zelle.

[0149] „Pilze“, wie vorliegend verwendet, schließt die Stämme Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota und Zygomycota (wie von Hawksworth et al. definiert in „Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi“, 8. Auflage, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) sowie die Oomycota (wie zitiert in Hawksworth et al., 1995, supra, Seite 171) und alle mitosporischen Pilze (Hawksworth et al., 1995, supra) ein. Typische Gruppen von Ascomycota schließen, z. B., *Neurospora*, *Eupenicillium*, (=*Penicillium*), *Emericella* (=*Aspergillus*), *Eurotium* (=*Aspergillus*), und die zuvor aufgelisteten echten Hefen ein. Beispiele von Basidiomycota schließen Champignons, Rostpilze und Brand ein. Typische Gruppen von Chytridiomycota schließen, z. B. *Alloomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomyces* und aquatische Pilze ein. Typische Gruppen der Oomycota schließen z. B. Saprolegniomycetöse aquatische Pilze (Wasserschimmel) wie z. B. *Achlya* ein. Beispiele mitosporischer Pilze schließen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* und *Alternaria* ein. Typische Gruppen von Zygomycota schließen, z. B., *Rhizopus* und *Mucor* ein.

[0150] „Filamentöse Pilze“ schließen alle filamentösen Formen der Unterabteilungen Eumycota und Oomycota ein (wie definiert von Hawksworth et al., 1995, supra). Die filamentösen Pilze sind durch ein vegetatives Myzel bestehend aus Chitin, Cellulose, Glucan, Chitosan, Mannan, und andere komplexe Polysaccharide gekennzeichnet. Das vegetative Wachstum erfolgt durch Hyphenverlängerung und der Kohlenstoffmetabolismus ist obligat aerob. Im Gegensatz dazu erfolgt das vegetative Wachstum von Hefen wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* durch Knospung eines einzelligen Thallus und der Kohlenstoffmetabolismus kann fermentativ sein.

[0151] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Pilzwirtszelle eine filamentöse Pilzwirtszelle. In einer mehr bevorzugten Ausführungsform ist die filamentöse Pilzwirtszelle, ohne darauf beschränkt zu sein, eine Zelle der Gattungen *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Neuropsora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* und *Trichoderma*. In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform ist die filamentöse Wirtszelle eine *Aspergillus*-Zelle. In einer weiteren noch mehr bevorzugten Ausführungsform ist die filamentöse Pilzwirtszelle eine *Fusarium*-Zelle. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform ist die filamentöse Pilzwirtszelle eine *A. oryza*-Zelle, eine *A. niger*-Zelle, eine *A. foetidus*-Zelle oder eine *A. japonicus*-Zelle. In einer weiteren am meisten bevorzugten Ausführungsform ist die filamentöse Pilzwirtszelle eine *Fusarium oxysporum*-Zelle oder eine *F. graminearum*-Zelle.

[0152] Pilzzellen können mittels eines Verfahrens einschließlich Erzeugung und Transformation von Protoplasten und Regeneration der Zellwand in an sich bekannter Weise transformiert werden. Geeignete Transformationsverfahren für *Aspergillus*-Wirtszellen sind in EP 238 023 und Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470–1474 beschrieben. Ein geeignetes Verfahren zum Transformieren von *Fusarium*-Spezies ist von Malardier et al., 1989, Gene 78: 147–156 oder in der WO 96/00787 beschrieben. Hefe kann mittels der Verfahren, die von Becker und Guarente, In Abelson, J. N. und Simon, M. I., Hrsg, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, Seiten 182–187, Academic Press Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; und Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 75: 1920 beschrieben sind, transformiert werden. Säugерzellen können durch direkte Aufnahme mittels der Kalziumphosphatpräzipiationsmethode von Graham und Van der Eb (1978, Virology 52: 546) transformiert werden.

[0153] Erfindungsgemäß verwendete Wirtszellen können vorteilhafterweise protease-defiziente oder protease-minus-Stämme (oder ähnliche) sein, wie z. B. Stämme, die hinsichtlich Proteasen, insbesondere Exoproteasen, die in der Lage sind, das modifizierte lipolytische Enzym an einer Stelle nahe des Peptidanhangs (in bestimmten Fällen das Propeptid) zu spalten, defizient sind. Besonders passende Wirtszellen sind Wirtszellen, die hinsichtlich der Tripeptidylaminopeptidasen (TPAP) (siehe z. B. WO 96/14404 von Novo Nordisk A/S), oder hinsichtlich Depeptidylaminopeptidasen (DPAP) defizient sind, oder Wirtszellen, die hinsichtlich einer Kex2-Protease oder einer Kex2-ähnlichen Protease defizient und daher nicht in der Lage sind, an einer di-basischen Stelle wie Arg-Arg (RR) zu spalten.

[0154] Weitere Beispiele an Wirtszellen schließen die Aspartatprotease-defizienten Wirtszellen, die in der EP 429 490 (Von Genecor Inc.) schrieben sind, die hinsichtlich proteolytischer Enzyme defizienten Wirtszellen wie

z. B. die Wirtszellen, die in der WO 93/00925 (Amgen), WO 92/17595 (Salk Inst Biotech), EP 341 215, EP 574 347 und PCT/DK96/00111 (Novo Nordisk A/S) beschrieben sind, ein.

[0155] In den Beispielen unten ist eine Aspergillus oryzae-Wirtszelle mit einem deletierten Gen für die Alkalische Protease verwendet worden.

Herstellungsverfahren

[0156] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzyms umfassend (a) Kultivieren einer Wirtszelle, die mit einer für das Enzym kodierenden DNA-Sequenz transformiert ist, unter Bedingungen, die für die Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms förderlich sind und (b) Gewinnen des modifizierten lipolytischen Enzyms.

[0157] Die Wirtszellen können in einem Nährmedium, das zur Herstellung eines modifizierten lipolytischen Enzyms geeignet ist, mittels aus dem Stand der Technik bekannter Methoden kultiviert werden. Beispielsweise kann die Zelle durch Schüttelflaschenkultivierung, Kleinmaßstab- oder Großmaßstabfermentation (einschließlich kontinuierlicher, Chargen-, Zufuhr-Chargen- oder Festphasen-Fermentationen) in Labor- oder Industrievermentern, durchgeführt in einem geeigneten Medium und unter Bedingungen, die die Expression und/oder Isolation des modifizierten lipolytischen Enzyms erlauben, kultiviert werden. Die Kultivierung findet in einem geeigneten Nährmedium, umfassend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anorganische Salze, mittels aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren statt (siehe z. B. Literaturverweise für Bakterien und Hefe; Bennett, J. W. und LaSure, L., Hrsg., *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Geeignete Medien sind bei kommerziellen Anbietern erhältlich oder können anhand veröffentlichter Zusammensetzungen (z. B. in Katalogen der American Type Culture Collection) zubereitet werden. Wenn das modifizierte lipolytische Enzym ins Nährmedium sezerniert wird, kann das modifizierte lipolytische Enzym direkt aus dem Medium gewonnen werden. Wenn das modifizierte lipolytische Enzym nicht sezerniert wird, wird es aus Zelllysaten gewonnen.

[0158] Das erhaltene modifizierte lipolytische Enzym kann mittels aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren gewonnen werden. Beispielsweise kann das modifizierte lipolytische Enzym aus dem Nährmedium mittels herkömmlicher Methoden einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Zentrifugation, Filtration, Extraktion, Sprühetrocknung, Verdampfung oder Präzipitation gewonnen werden. Das gewonnene modifizierte lipolytische Enzym kann dann mittels einer Vielfalt von Chromatografieverfahren weiter gereinigt werden, z. B. Ionenaustausch-Chromatografie, Gelfiltrations-Chromatographie, Affinitäts-Chromatographie, oder dergleichen.

[0159] Das erfindungsgemäße modifizierte lipolytische Enzym kann mittels einer Vielfalt von aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren einschließlich, aber nicht beschränkt auf, Chromatographie (z. B. Ionenaustausch, Affinität, hydrophober, chromatofokussierender und Größenausschluss), elektrophoretischer Verfahren (z. B.) préparative isoelektrische Fokussierung (IEF), differentielles Löslichkeitsverhalten (z. B. Ammoniumsulfatfällung) oder Extraktion (siehe z. B. *Protein Purification*, J.-C. Jansen und Lars Ryden, Hrsg., VCH Publishers, New York, 1998).

[0160] In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird der Peptidanhang an das Stammenzym angehängt, indem man eine Wirtszelle umfassend eine DNA-Sequenz, die für die Prä-, Pro- oder Präpro-Form des lipolytischen Stammenzymes kodiert, wobei die DNA-Sequenz optional in einem Vektor vorliegt, kultiviert und das erhaltene modifizierte lipolytische Enzym gewinnt. Die Wirtszelle, Kultivierungsbedingung und/oder Gewinnungsbedingungen sind so ausgewählt, dass höchstens eine partielle Prozessierung der Prä-, Pro- oder Präpro-Form des Stammenzymes stattgefunden hat, woraus resultiert, dass mindestens 5%, wie z. B. mindestens 10%, wie z. B. mindestens 15%, wie z. B. mindestens 20%, wie z. B. mindestens 25%, wie z. B. mindestens 50% oder mindestens 75% der hergestellten modifizierten Enzymmoleküle die gewünschte, z. B. die gesamte Präsequenz oder einen wesentlichen Teil davon, umfassen.

Erfindungsgemäße Enzymzusammensetzung

[0161] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine Enzymzusammensetzung umfassend ein erfindungsgemäßes Enzym mit lipolytischer Aktivität.

[0162] Wie hier definiert, ist ein „im Wesentlichen reines“ Enzym ein Enzym, das im Wesentlichen frei von weiteren homologen Fremdstoffen (die aus der selben Quelle wie das modifizierte lipolytische Enzym stammen), z. B. mindestens etwa 20% rein, bevorzugt mindestens etwa 40% rein, mehr bevorzugt mindestens etwa 60% rein, noch mehr bevorzugt mindestens etwa 80% rein, am meisten bevorzugt mindestens etwa 90% rein und

am allermeisten bevorzugt mindestens etwa 95% rein, bestimmt anhand von SDS-PAGE.

[0163] In bestimmten Fällen prozessiert die Wirtszelle nicht alle modifizierten lipolytischen Enzymmoleküle, die von diesem Wirt exprimiert werden, an derselben Spaltstelle, wodurch ein modifizierte Enzymprodukt entsteht, das aus einem Anteil mit einem vollständigen Peptidanhang und einem oder mehreren anderen Anteilen mit nur einem Teil des Peptidanhangs besteht. Die Erfinder fanden, dass dies die Waschleistung nicht signifikant beeinflusst. Folglich ist, selbst wenn nicht alles vom lipolytischen Enzym der erfundungsgemäßen Enzymzusammensetzung den vollständigen Peptidanhang beibehalten hat, die Enzymzusammensetzung nach wie vor in der Lage, die gewünschte Wirkung auszuüben, wie z. B eine verbesserte Waschleistung. Man hat sogar gefunden, dass, so lange mindestens 5% der Gesamtmenge an erfundungsgemäßem modifiziertem lipolytischem Enzym, das für einen gegebenen Zweck verwendet werden soll, den intakten Peptidanhang aufweisen wie zuvor offenbart, dies ausreichend sein kann, die gewünschte Wirkung zu erzielen. Der übrige Teil der modifizierten lipolytischen Enzymmoleküle kann dann einen Peptidanhang haben, der kürzer ist als der vorgesehene (z. B. als Folge davon, dass eine oder mehrere Aminosäurereste während der Prozessierung durch den Wirtsorganismus abgeschnitten worden sind, oder der Peptidanhang überhaupt). Daher muss die erfundungsgemäße Enzymzusammensetzung nur mindestens etwa 5%, vorzugsweise mindestens etwa 10%, wie z. B. mindestens etwa 25%, besser mindestens etwa 50%, insbesondere mindestens etwa 75% des modifizierten lipolytischen Enzyms mit seinem vollständigen Anhang umfassen.

[0164] Die Enzymzusammensetzung kann weiterhin ein Enzym umfassen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteasen, Cellulasen, Peroxidasen, Cutinasen, Amylasen und/oder Lipasen, und, wenn zum Waschen vorgesehen, auch Inhaltsstoffe, die üblicherweise in Waschmittelzusammensetzungen verwendet werden.

[0165] Erfundungsgemäße modifizierte lipolytische Enzyme haben sich erwiesen, als Bestandteile in Waschmittelzusammensetzungen wie Waschpulver oder Geschirrspülzusammensetzungen von besonderem Interesse zu sein, was detailliert im folgenden Abschnitt beschrieben wird. Zusätzlich kommen die erfundungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzyme aufgrund ihrer verbesserten Eigenschaften dafür in Betracht, beispielsweise, in der Backindustrie, als Katalysator bei organischen Synthesen (z. B. Veresterungs-, Umestrukturungs- oder Esterhydrolysereaktionen), in der Papierherstellungsindustrie (z. B. zum Entfernen von Harzpech), und in der Leder-, Woll- und verwandten Industrien (z. B. zum Entfetten von Tierhäuten, Schafhaut oder Wolle), und für weitere Anwendungen, die ein Entschmieren/Entfetten mit sich bringen, verwendet zu werden.

WASCHMITTELOFFENBARUNG

Tensidsystem

[0166] Die erfundungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen umfassen ein Tensidsystem, wobei das Tensid ausgewählt sein kann aus nichtionischen und/oder anionischen und/oder kationischen und/oder ampholytischen und/oder zwitterionischen und/oder semi-polaren Tensiden.

[0167] Das Tensid ist üblicherweise in einer Menge von 0,1 Gew.-% bis 60 Gew.-% vorhanden.

[0168] Das Tensid liegt meist vorzugsweise so vor, dass es mit den Enzymbestandteilen, die in der Zusammensetzung vorhanden sind, kompatibel ist. In flüssigen oder gelartigen Zusammensetzungen liegt das Tensid vorzugsweise so vor, dass es die Stabilität jedes Enzyms in diesen Zusammensetzungen fördert, oder zumindest diese nicht abbaut.

[0169] Bevorzugte Tensidsysteme, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen als ein Tensid ein oder mehrere nichtionische und/oder anionische Tenside, wie hier beschrieben.

[0170] Nichtionische Waschmitteltenside bestehen normalerweise aus einer wasserlöslich machenden Polyalkoxylen- oder einer Mono- oder Dialkanolamid-Gruppe in chemischer Kombination mit einer organischen hydrophoben Gruppe, die beispielsweise abstammt von Alkylphenolen, bei denen die Alkylgruppe von etwa 6 bis etwa 12 Kohlenstoffatome enthält, Dialkylphenolen, bei denen jede Alkylgruppe von 6 bis 12 Kohlenstoffatome enthält, primären, sekundären oder tertiären aliphatischen Alkoholen (oder Alkylgekappten Derivaten davon), vorzugsweise von 8 bis 20 Kohlenstoffatome aufweisend, Monocarbonsäuren mit von 10 bis etwa 24 Kohlenstoffatomen in der Alkylgruppe und Polyproxylenen. Ebenfalls gebräuchlich sind Fettsäuremono- und -dialkanolamide, bei denen die Alkylgruppe des Fettsäurerests von 10 bis etwa 20 Kohlenstoffatome enthält und die Alkyloylgruppe von 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält. Optional kann in jedem der Mono- und Dialkanolamid-

rivate ein Polyoxyalkylenanteil, der letztere Gruppen und den hydrophoben Teil des Moleküls miteinander verbindet, vorhanden sein. In allen Polyalkoxylen-enthaltenden Tensiden besteht der Polyalkoxylenanteil vorzugsweise aus von 2 bis 20 Gruppen aus Ethylenoxid oder aus Ethylenoxid- und Propylenoxidgruppen.

[0171] Polyethylen-, Polypropylen- und Polybutylenoxidkondensate von Alkylphenolen sind zur Verwendung als das nichtionische Tensid der erfindungsgemäßen Tensidsysteme geeignet, wobei die Polyethylenoxidkondensate bevorzugt sind. Diese Verbindungen schließen die Kondensationsprodukte aus Alkylphenolen mit einer Alkylgruppe enthaltend von etwa 6 bis etwa 14 Kohlenstoffatome ein, vorzugsweise von etwa 8 bis etwa 14 Kohlenstoffatome, entweder in einer geradkettigen oder verzweigtkettigen Konfiguration mit dem Alkylenoxid. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Ethylenoxid in einer Menge entsprechend von etwa 2 bis etwa 25 Mol, mehr bevorzugt von etwa 3 bis etwa 15 Mol, Ethylenoxid pro Mol Alkylphenol vorhanden. Kommerziell erhältliche nichtionische Tenside dieses Typs schließen IgepalTM CO-630, vertrieben durch die GAF Corporation; und TritonTM X-45, X-114, X-100 und X-102, alle vertrieben durch die Rohm & Haas Company, ein. Diese Tenside werden allgemein als Alkylphenolalkoxylate bezeichnet (z. B. Alkylphenolethoxylate).

[0172] Die Kondensationsprodukte primärer und sekundärer aliphatischer Alkohole mit von etwa 1 bis etwa 25 Mol Ethylenoxid sind zur Verwendung als nichtionisches Tensid der erfindungsgemäßen nichtionischen Tensidsysteme geeignet. Die Alkylkette des aliphatischen Alkohols kann entweder gerade oder verzweigt, primär oder sekundär sein und enthält im Allgemeinen von etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatome. Bevorzugt sind die Kondensationsprodukte von Alkoholen mit einer Alkylgruppe enthaltend von etwa 8 bis etwa 20 Kohlenstoffatome, mehr bevorzugt von etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatome, mit von etwa 2 bis etwa 10 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol. Etwa 2 bis etwa 7 Mol Ethylenoxid und am meisten bevorzugt von 2 bis 5 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol sind in den Kondensationsprodukten vorhanden. Beispiele kommerziell erhältlicher nichtionischer Tenside dieses Typs schließen TergitolTM 15-S-9 (das Kondensationsprodukt von linearem C₁₁-C₁₅-Alkohol mit 9 Mol Ethylenoxid), TergitolTM 24-L-6 NMW (das Kondensationsprodukt von primärem C₁₂-C₁₄-Alkohol mit 6 Mol Ethylenoxid mit einer engen Molekulargewichtsverteilung), beide vertrieben durch Union Carbide Corporation; NeodolTM 45-9 (das Kondensationsprodukt von linearem C₁₄-C₁₅-Alkohol mit 9 Mol an Ethylenoxid), NeodolTM 23-3 (das Kondensationsprodukt von linearem C₁₂-C₁₃-Alkohol mit 3,0 Mol an Ethylenoxid), NeodolTM 45-7 (das Kondensationsprodukt von linearem C₁₄-C₁₅-Alkohol mit 7 Mol an Ethylenoxid), NeodolTM 45-5 (das Kondensationsprodukt von linearem C₁₄-C₁₅-Alkohol mit 5 Mol an Ethylenoxid), vertrieben durch Shell Chemical Company, KyroTM EOB (das Kondensationsprodukt von C₁₃-C₁₅-Alkohol mit 9 Mol Ethylenoxid), vertrieben durch Procter & Gamble Company, und Genapol LA 050 (das Kondensationsprodukt von C₁₂-C₁₄-Alkohol mit 5 Mol an Ethylenoxid), vertrieben durch Hoechst. Der bevorzugte Bereich von HLB in diesen Produkten liegt bei 8-11 und am meisten bevorzugt bei 8-10.

[0173] Die erfindungsgemäße Waschmittelzusammensetzung kann nichtionisches Material umfassen, wobei es sich um alkoxylierte aliphatische Alkohole handelt, die mindestens 25 Alkylenoxidgruppen, vorzugsweise mindestens 50 Alkylenoxidgruppen, und mehr bevorzugt mindestens 80 Alkylenoxidgruppen enthalten. Als nichtionisches Tensid der erfindungsgemäßen Tensidsysteme sind auch Alkylpolysaccharide verwendbar, offenbart in US 4,565,647, die eine hydrophobe Gruppe, enthaltend von etwa 6 bis etwa 30 Kohlenstoffatome, vorzugsweise von etwa 10 bis etwa 16 Kohlenstoffatome und ein Polysaccharid, z. B. ein Polyglycosid, eine hydrophile Gruppe enthaltend von etwa 1,3 bis etwa 10, vorzugsweise von etwa 1,3 bis etwa 3, am meisten bevorzugt von etwa 1,3 bis etwa 2,7 Saccharideinheiten, aufweisen. Jedes reduzierende Saccharid enthaltend 5 oder 6 Kohlenstoffatome kann verwendet werden, z. B. können Glucose-, Galactose- und Galactosylanteile gegen Glucosylanteile ersetzt werden (optional ist die hydrophobe Gruppe an die 2-, 3-, 4-, usw. -Positionen angeheftet, wodurch eine Glucose oder Galactose im Gegensatz zu einem Glucosid oder Galactosid entsteht). Die Intersaccharidbindungen können, z. B., zwischen Position eins der zusätzlichen Saccharideinheiten und den 2-, 3-, 4- und/oder 6-Positionen der vorangehenden Saccharideinheiten liegen.

[0174] Ein weiteres geeignetes nichtionisches Tensid ist ein Glycosid einer Uronsäure, eines Uronsäuresalzes oder eines Uronsäurelactons oder einer Polyuronsäure mit einer geradkettigen oder verzweigten gesättigten oder ungesättigten aliphatischen Kette mit von 6 bis 24 Kohlenstoffatomen, optional enthaltend einen aromatischen, cycloaliphatischen, gemischten aromatisch-aliphatischen oder einen Polyalkyloxyalkyl-Rest, wie in der WO 95/10524 beschrieben.

[0175] Die bevorzugten Alkylpolyglycoside haben die Formel



wobei R² ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Alkyl, Alkylphenyl, Hydroxyalkyl, Hydroxyalkylphenyl,

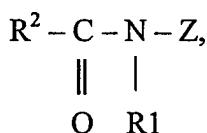
und Mischungen davon, wobei die Alkylgruppen von etwa 10 bis etwa 18, vorzugsweise von etwa 20 bis etwa 14 Kohlenstoffatome enthalten; n ist 2 oder 3, vorzugsweise 2; t ist von 0 bis etwa 10, vorzugsweise 0; und x ist von etwa 1,3 bis etwa 10, vorzugsweise von etwa 1,3 bis etwa 3, am meisten bevorzugt von etwa 1,3 bis etwa 2,7. Das Glycosyl stammt bevorzugt von Glucose ab. Um diese Verbindungen herzustellen, wird zuerst der Alkohol oder der Alkylpolyethoxyalkohol gebildet und dann mit Glucose, oder einer Glucosequelle, zur Bildung des Glucosids reagiert (Anheftung an der 1-Position). Die zusätzlichen Glycosyleinheiten können dann zwischen ihrer 1-Position und den 2-, 3-, 4- und/oder 6-Positionen der vorangehenden Glycosyleinheiten, vorzugsweise überwiegend an der 2-Position, angeheftet werden.

[0176] Die Kondensationsprodukte aus Ethylenoxid mit einer hydrophoben Base, die durch die Kondensation von Propylenoxid mit Propylenglycol gebildet werden, sind zur Verwendung als zusätzliche erfindungsgemäße nichtionische Tensidsysteme auch geeignet. Der hydrophobe Anteil dieser Verbindungen hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von etwa 1500 bis etwa 1800 und weist Wasserunlöslichkeit auf. Das Anhängen von Polyoxyethylenanteilen an diesen hydrophoben Teil soll die Wasserlöslichkeit des Moleküls als Ganzes erhöhen, und der flüssige Charakter des Produkts wird bis zu dem Punkt aufrecht erhalten, an dem der Polyoxyethylengehalt etwa 50% des Gesamtgewichts des Kondensationsprodukts ausmacht, was einer Kondensation mit bis zu etwa 40 Mol Ethylenoxid entspricht. Beispiele von Verbindungen dieses Typs schließen bestimmte kommerziell erhältliche Pluronic™-Tenside, die durch die BASF vertrieben werden, ein.

[0177] Ebenfalls geeignet zur Verwendung als nichtionisches Tensid des erfindungsgemäßen nichtionischen Tensidsystems sind Kondensationsprodukte von Ethylenoxid mit dem Produkt, das bei der Reaktion von Propylenoxid mit Ethylendiamin entsteht. Der hydrophobe Anteil dieser Produkte besteht aus einem Reaktionsprodukt von Ethylendiamin und überschüssigem Propylenoxid, und weist im Allgemeinen ein Molekulargewicht von etwa 2500 bis etwa 3000 auf. Dieser hydrophobe Anteil ist mit Ethylenoxid bis zu dem Maß kondensiert, dass das Kondensationsprodukt von etwa 40 Gew.-% bis etwa 80 Gew.-% an Polyoxyethylen enthält und ein Molekulargewicht von etwa 5000 bis etwa 11000 aufweist.

[0178] Beispiele dieses Typs von nichtionischem Tensid schließen bestimmte kommerziell erhältliche Ternon™-Verbindungen, die durch BASF vertrieben werden, ein.

[0179] Zur Verwendung als nichtionisches Tensid der erfindungsgemäßen Tensidsysteme bevorzugt sind Polyyethylenoxidkondensate von Alkylphenolen, Kondensationsprodukte von primären und sekundären aliphatischen Alkoholen mit von etwa 1 bis etwa 25 Mol an Ethylenoxid, Alkylpolysaccharide, und Mischungen davon. Am meisten bevorzugt sind C₈-C₁₄-Alkylphenoletethoxylate mit von 3 bis 15 Ethoxygruppen und C₈-C₁₈-Alkoholethoxylate (vorzugsweise durchschnittl. C₁₀) mit von 2 bis 10 Ethoxygruppen, und Mischungen davon. Äußerst bevorzugte nichtionische Tenside sind Polyhydroxyfettsäureamid-Tenside der Formel



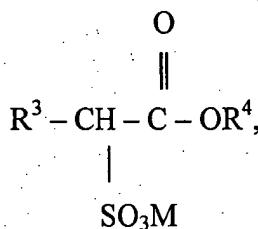
wobei R¹ H ist, oder R¹ C₁₋₄-Kohlenwasserstoff, 2-Hydroxyethyl, 2-Hydroxypropyl oder eine Mischung davon, ist, R² C₅₋₃₁-Kohlenwasserstoff ist, und Z ein Polyhydroxykohlenwasserstoff ist mit einer linearen Kohlenwasserstoffkette mit mindestens 3 Hydroxylen, die direkt mit der Kette verbunden sind, oder ein alkoxyliertes Derivat davon. Vorzugsweise ist R¹ Methyl, ist R² eine geradkettige C₁₁₋₁₅-Alkyl- oder eine C₁₆₋₁₈-Alkyl- oder Alkenylkette, wie Kokosnussalkyl oder Mischungen davon, und Z stammt von einem reduzierenden Zucker, wie Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, aus einer reduktiven Aminierungsreaktion.

[0180] Ein nichtionisches Tensidsystem umfassend ein alkoxyliertes nichtionisches Tensid mit einem durchschnittlichen Grad an Alkoxylierung von mindestens 6 und ein Aldobionamid der Struktur ANR₁R₂, wobei A ein Zuckeranteil ist, der eine Aldobionsäure ist, außer dass sie nicht die OH-Gruppe enthält, die normalerweise von der Carboxygruppe der Aldonsäure herausragt. NR₁R₂ ist dort angeheftet, wo sich normalerweise die Hydroxylgruppe an der Aldobionsäure befindet. R₁R₂, können gleich oder unterschiedlich sein, ist ein Wasserstoffatom, ein aliphatischer Kohlenwasserstoffrest, ein aromatischer Rest, ein cycloaliphatisches Rest, ein Aminosäureester oder ein Ätheramin. R₁ und R₂ können nicht beide Wasserstoffatome sein, wie in der WO 95/2770 beschrieben.

[0181] Weitere so genannte nichtionische Waschmittelverbindungenschließen langkettige tertiäre Aminoxide, langkettige tertiäre Phosphinoxide und Dialkylsulphoxide ein.

[0182] Äußerst bevorzugte anionische Tenside schließen Alkyl-alkoxylierte Sulfat-Tenside ein, die wasserlösliche Salze oder Säuren der Formel $\text{RO(A)}_m\text{SO}_3\text{M}$ sind, wobei R eine unsubstituierte $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$ -Alkyl- oder Hydroxyalkylgruppe mit einer $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$ -Alkylkomponente ist, vorzugsweise ein $\text{C}_{12}\text{-C}_{20}$ -Alkyl oder Hydroxyalkyl, mehr bevorzugt $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Alkyl oder Hydroxyalkyl, A eine Ethoxy- oder Propoxyeinheit ist, m größer als Null ist, üblicherweise zwischen etwa 0,5 und etwa 6, mehr bevorzugt zwischen etwa 0,5 und etwa 3, und M H oder ein Kation ist, das, beispielsweise, ein Metallkation sein kann (z. B. Natrium, Kalium, Lithium, Calcium, Magnesium, usw.), ein Ammonium- oder substituiertes Ammoniumkation. Alkylethoxylierte Sulfate sowie alkylpropoxylierte Sulfate kommen ebenfalls in Betracht. Spezifische Beispiele substituierter Ammoniumkationen schließen Methyl-, Dimethyl-, Trimethyl-Ammoniumkationen und quarternäre Ammoniumkationen, wie Tetramethylammonium und Dimethylpiperidinium-Kationen und solche, die von Alkylaminen, wie Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Mischungen davon, und dgl., abstammen, ein. Beispielhafte Tenside sind $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Alkylpolyethoxylat(1.0)-sulfat ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}\text{E}(1.0)\text{M}$), $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Alkylpolyethoxylat(2.25)-sulfat ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}(2.25)\text{M}$), und $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Alkylpolyethoxylat(3.0)-sulfat ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}\text{E}(3.0)\text{M}$), und $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Alkylpolyethoxylat(4.0)-sulfat ($\text{C}_{12}\text{-C}_{18}\text{E}(4.0)\text{M}$), wobei M günstigerweise aus Natrium und Kalium ausgewählt ist. Geeignete anionische Tenside, die verwendet werden können, sind Alkylestersulfonat-Tenside einschließlich lineare Ester von $\text{C}_8\text{-C}_{20}$ -Carbonsäuren (d. h. Fettsäuren), die mit gasförmigem SO_3 gemäß „The Journal of the American Oil Chemists Society“, 52, (1975), SS. 323–329, sulfoniert sind. Geeignete Ausgangsmaterialien schließen natürliche fettige Verbindungen, wie sie von Talg, Palmöl usw. abstammen, ein.

[0183] Das bevorzugte Alkylestersulfonat-Tensid, insbesondere für Wäschereianwendungen, umfasst Alkylestersulfonat-Tenside der Strukturformel:



wobei R^3 ein $\text{C}_8\text{-C}_{20}$ -Kohlenwasserstoff, vorzugsweise ein Alkyl oder eine Kombination davon ist, R^4 ein $\text{C}_1\text{-C}_6$ -Kohlenwasserstoff, vorzugsweise ein Alkyl oder eine Kombination davon ist, und M ein Kation ist, das ein wasserlösliches Salz mit dem Alkylestersulfonat bildet. Geeignete salzbildende Kationen schließen Metalle wie Natrium, Kalium und Lithium sowie substituierte oder nicht substituierte Ammoniumkationen, wie Monoethanolamin, Diethanolamin und Triethanolamin, ein. Vorzugsweise ist R^3 ein $\text{C}_{10}\text{-C}_{16}$ -Alkyl und R^4 ist ein Methyl, Ethyl oder Isopropyl: Besonders bevorzugt sind die Methylestersulfonate, wobei R^3 ein $\text{C}_{10}\text{-C}_{16}$ -Alkyl ist.

[0184] Weitere geeignete anionische Tenside schließen solche Alkylsulfat-Tenside ein, die wasserlösliche Salze oder Säuren der Formel ROSO_3M sind, wobei R bevorzugt ein $\text{C}_{10}\text{-C}_{24}$ -Kohlenwasserstoff ist, bevorzugt ein Alkyl oder Hydroxyalkyl mit einer $\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$ -Alkylkomponente, mehr bevorzugt ein $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Alkyl oder Hydroxyalkyl, und M H oder ein Kation ist, z. B. ein Alkalimetallkation (z. B. Natrium, Kalium, Lithium), oder ein Ammonium oder substituiertes Ammonium (z. B. Methyl-, Dimethyl- und Trimethyl-Ammoniumkationen und quarternäre Ammoniumkationen, wie Tetramethylammonium- und Dimethylpiperidinium-Kationen und quarternäre Ammoniumkationen, die von Alkylaminen wie Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin und Mischungen davon, und dgl. abstammen). Üblicherweise sind Alkylketten von $\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$ bevorzugt bei niedrigeren Waschtemperaturen (z. B. unter etwa 50°C) und $\text{C}_{16}\text{-C}_{18}$ -Alkylketten sind bevorzugt bei höheren Waschtemperaturen (z. B. über etwa 50°C).

[0185] Weitere anionische, für Waschzwecke geeignete Tenside können ebenfalls in die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen eingeschlossen sein. Diese schließen Salze ein (einschließlich, beispielsweise, Natrium-, Kalium-, Ammonium- und substituierte Ammoniumsalze, wie Mono-, Di- und Triethanolaminsalze) von Seifen, primäre oder sekundäre $\text{C}_8\text{-C}_{22}$ -Alkansulfonate, $\text{C}_8\text{-C}_{24}$ -Olefinsulfonate, sulfonierte Polycarbonsäuren, hergestellt durch Sulfonierung des pyrolysierten Produktes von Erdalkalimetallzitraten, z. B. wie beschrieben in GB 1,082,179, $\text{C}_8\text{-C}_{24}$ -Alkylpolyglycolethersulfate (enthaltend bis zu 10 Mol Ethylenoxid); Alkylglycerolsulfonate, Fettsäureglycerolsulfonate, Ölsäureglycerolsulfate, Alkylphenolethylenoxidethersulfate, Parraffinsulfonate, Alkylphosphate, Isethionate wie die Acylisethionate, Isothionateester von Alkoxy carbonsäuren (wie in der WO 95/14661 beschrieben), N-Acyltaurate, Alkylsuccinamate und Sulfosuccinate, Monoester von Sulfosuccinaten (insbesondere gesättigte und ungesättigte $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ -Monoester) und Diester von Sulfosuccinaten (insbesondere gesättigte und ungesättigte $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ -Diester), Acylsarcosinate, Oleoylsarcosinate, Sulfate von

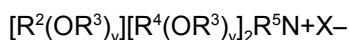
Alkylpolysacchariden, wie die Sulfate von Alkylpolyglucosid (die nichtionischen nichtsulfatierten Verbindungen sind unten beschrieben), verzweigte primäre Alkylsulfate und Alkylpolyethoxycarboxylate, wie jene der Formel $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_k\text{-CH}_2\text{COO-M}^+$, wobei R ein $C_8\text{-}C_{22}$ -Alkyl ist, k eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und M ein lösliches salzbildendes Kation ist. Harzsäuren und hydrierte Harzsäuren sind ebenfalls geeignet, wie Rosin, hydrogeniertes Rosin und Harzsäuren und hydrogenierte Harzsäuren, die im Tallöl vorkommen oder davon abstammen. Alkylbenzolsulfonat ist am meisten bevorzugt, insbesondere lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS), bei dem Alkylgruppe vorzugsweise von 10 bis 18 Kohlenstoffatome enthält.

[0186] Weitere Beispiele sind beschrieben in „Surface Active Agents and Detergents“ (Bd. I und II von Schwartz, Perry und Berch). Eine Vielfalt solcher Tenside ist ebenfalls allgemein offenbart in US 3,929,678 (Spalte 23, Zeile 58 bis Spalte 29, Zeile 23).

[0187] Wenn hierin eingeschlossen, umfassen die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen üblicherweise von etwa 1 Gew.-% bis etwa 40 Gew.-%, vorzugsweise von etwa 3 Gew.-% bis etwa 20 Gew.-% solcher anionischen Tenside.

[0188] Die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen können ebenfalls kationische, ampholytische, zwitterionische und semi-polare Tenside enthalten, sowie andere als die bereits hierin beschriebenen nichtionischen und/oder anionischen Tenside.

[0189] Kationische, waschaktive Tenside, die für die Verwendung in den erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen geeignet sind, sind solche mit einer langkettigen Kohlenwasserstoffgruppe. Beispiele solcher kationischen Tenside schließen die Ammoniumtenside wie Alkyltrimethylammoniumhalogenide und solche Tenside mit der Formel:



ein, wobei R^2 eine Alkyl- oder Alkylbenzylgruppe ist mit von etwa 8 bis etwa 18 Kohlenstoffatome in der Alkylkette, jedes R^3 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ und Mischungen davon; jedes R^4 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $C_1\text{-}C_4$ -Alkyl, $C_1\text{-}C_4$ -Hydroxyalkyl, Benzolringstrukturen, gebildet durch Verbinden der zwei R^4 -Gruppen, $-\text{CH}_2\text{CHOHCHOHCOR}^6\text{CHOHCH}_2\text{OH}$, wobei R^6 jede Hexose oder jedes Hexosepolymer ist mit einem Molekulargewicht von weniger als etwa 1000, und Wasserstoff, wenn y nicht 0 ist; R^5 dasselbe wie R^4 oder eine Alkylkette ist, wobei die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen oder R^2 plus R^5 nicht mehr als etwa 18 beträgt; jedes y von 0 bis etwa 10 ist und die Summe der y-Werte von 0 bis etwa 15 ist; und X jedes kompatible Anion ist.

[0190] Äußerst bevorzugte kationische Tenside sind wasserlösliche quarternäre Ammoniumverbindungen, die in der vorliegenden Zusammensetzung verwendbar sind, mit der Formel:



wobei R_1 ein $C_8\text{-}C_{16}$ -Alkyl ist, jedes von R_2 , R_3 und R_4 unabhängig $C_1\text{-}C_4$ -Alkyl; $C_1\text{-}C_4$ -Hydroxyalkyl, Benzyl und $-(\text{C}_2\text{H}_{40})_x\text{H}$ ist, wobei x einen Wert von 2 bis 5 aufweist, und X ein Anion ist. Nicht mehr als einer aus R_2 , R_3 oder R_4 sollte Benzyl sein.

[0191] Die bevorzugte Alkylkettenlänge für R_1 ist $C_{12}\text{-}C_{15}$, insbesondere, wenn die Alkylgruppe eine Mischung von Kettenlängen ist, die von Kokosnuss- oder Palmkernfett abstammt, oder synthetisch abstammt durch Oleofinaufbau oder OXO-Alkoholsynthese.

[0192] Bevorzugte Gruppen für R_2 , R_3 und R_4 sind Methyl- und Hydroxyethylgruppen und das Anion X kann ausgewählt sein aus Halogenid-, Methosulfat-, Acetat- und Phosphationen. Beispiele von geeigneten quarternären Ammoniumverbindungender Formel (i) zur Verwendung hierin sind:

Kokosnuss-Trimethylammoniumchlorid oder -bromid;

Kokosnuss-Methyldihydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;

Decyltriethylammoniumchlorid;

Decyldimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;

$C_{12\text{-}15}$ -Dimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;

Kokosnuss-Dimethylhydroxyethylammoniumchlorid oder -bromid;

Myristyltrimethylammoniummethylsulfat;

Lauryldimethylbenzylammoniumchlorid oder -bromid;

Lauryldimethyl(ethenoxy)₄-ammoniumchlorid oder -bromid
Cholinester (Verbindungen der Formel (i), wobei R₁

CH₂-CH₂-O-C-C₁₂₋₁₄-Alkyl



und R₂R₃R₄ Methyl sind).

Dialkylimidazoline [Verbindungender Formel (i)]

[0193] Weitere kationische Tenside, die hierin verwendbar sind, sind auch beschrieben in US 4,228,044 und in EP 000 224.

[0194] Wenn hierin eingeschlossen, umfassen die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen üblicherweise von 0,2 Gew.-% bis etwa 25 Gew.-%, vorzugsweise etwa 1 Gew.% bis etwa 8 Gew.-% solcher kationischer Tenside.

[0195] Ampholytische Tenside sind ebenfalls geeignet zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen. Diese Tenside können allgemein beschrieben werden als aliphatische Derivate sekundärer oder tertiärer Amine, oder aliphatische Derivate heterocyclischer sekundärer und tertiärer Amine, bei denen der aliphatische Rest gerad- oder verzweigtkettig sein kann. Einer der aliphatischen Substituenten enthält mindestens etwa 8 Kohlenstoffatome, üblicherweise von etwa 8 bis etwa 18 Kohlenstoffatome, und mindestens einer enthält eine anionische wasserlöslich machende Gruppe, z. B. Carboxy, Sulfonat, Sulfat. Siehe US 3,929,678 (Spalte 19, Zeilen 18–35) für Beispiele von ampholytischen Tensiden.

[0196] Wenn hierin eingeschlossen, umfassen die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen üblicherweise von 0,2 Gew.-% bis etwa 15 Gew.-%, vorzugsweise von etwa 1 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-% solcher ampholytischer Tenside.

[0197] Zwitterionische Tenside sind ebenfalls geeignet zur Verwendung in Waschmittelzusammensetzungen. Diese Tenside können allgemein beschrieben werden als Derivate sekundärer und tertiärer Amine, Derivate heterocyclischer sekundärer und tertiärer Amine, oder Derivate von quaternärem Ammonium-, quaternärem Phosphonium- oder tertiären Sulfoniumverbindungen. Siehe US 3,929,678 (Spalte 19, Zeile 38 bis Spalte 22, Zeile 48) für Beispiele von zwitterionischen Tensiden.

[0198] Wenn hierin eingeschlossen, umfassen die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen üblicherweise von 0,2 Gew.-% bis etwa 15 Gew.-%, vorzugsweise von etwa 1 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-% solcher zwitterionischer Tenside.

[0199] Semi-polare nichtionische Tenside sind eine besondere Kategorie nichtionischer Tenside, welche wasserlösliche Aminoxide einschließen, enthaltend einen Alkylanteil von etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen und 2 Anteilen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkylgruppen und Hydroxyalkylgruppen, enthaltend von etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome; wasserlösliche Phosphinoxide enthaltend einen Alkylanteil von etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen und zwei Anteile ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkylgruppen und Hydroxyalkylgruppen enthaltend von etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome; und wasserlösliche Sulfoxide enthaltend einen Alkylanteil von etwa 10 bis etwa 18 Kohlenstoffatomen und einen Anteil ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkyl- und Hydroxyalkylanteilen von etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatomen.

[0200] Semi-polare nichtionische Waschmitteltenside schließen Aminoxid-Tenside mit der Formel:



R³(OR⁴)xN(R⁵)₂

ein, wobei R³ eine Alkyl-, Hydroxyalkyl- oder Alkylphenylgruppe oder Mischungen davon ist, enthaltend von etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatome; R⁴ eine Alkylen- oder Hydroxyalkylengruppe enthaltend von etwa 2 bis etwa 3 Kohlenstoffatome oder Mischungen davon ist; x von 0 bis etwa 3 ist; und jedes R⁵ eine Alkyl- oder Hydroxyalkylgruppe enthaltend von etwa 1 bis etwa 3 Kohlenstoffatome oder eine Polyethylenoxidgruppe enthal-

tend von etwa 1 bis etwa 3 Ethylenoxidgruppen ist. Die R⁵-Gruppen können aneinander gelagert sein, z. B. über ein Sauerstoff- oder ein Stickstoffatom, um eine Ringstruktur auszubilden.

[0201] Diese Aminoxid-Tenside schließen insbesondere C₁₀-C₁₈-Alkyldimethylaminoxide und C₈-C₁₂-Alkoxyethyldihydroxyethylaminoxide ein.

[0202] Wenn hierin eingeschlossen, umfassen die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen üblicherweise von 0,2 Gew.-% bis etwa 15 Gew.-%, vorzugsweise von etwa 1 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-% solcher semi-polarer nichtionischer Tenside.

Wasserenthärter/Gerüststoffe

[0203] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können weiterhin ein Wasserenthärtungssystem enthalten. Jedes herkömmliche Wasserenthärtungssystem ist geeignet zur Verwendung hierin, einschließlich Aluminosilikat-Materialier, Silikate, Polycarboxylate und Fettsäuren, Materialien wie Ethylendiamin-Tetraacetat, Komplexierungsmittel für Metallionen wie Aminopolyphosphonate, insbesondere Ethylendiamin-Tetramethylenphosphonsäure und Diethylentriamin-Pentamethylenphosphonsäure. Phosphat enthaltende Wasserenthärter/Gerüststoffe können ebenfalls verwendet werden, z. B. Pyrophosphate, Orthophosphate oder Polyphosphate.

[0204] Zu den geeigneten Wasserenthärttern zählen ein anorganisches Ionenaustauschmaterial, üblicherweise ein anorganisches hydratisiertes Aluminosilikat-Material, mehr bevorzugt ein hydratisierter synthetischer Zeolith, wie hydratisierter Zeolith A, X, B, HS oder MAP. Ein weiteres geeignetes anorganisches Wasserenthärtungsmaterial ist Schichtsilikat, z. B. SKS-6 (Hoechst). SKS-6 ist ein kristallines Schichtsilikat, das aus Natriumsilikat (Na₂Si₂O₅) besteht.

[0205] Geeignete Polycarboxylate, die eine Carboxygruppe enthalten, schließen Milchsäure, Glycolsäure und Ätherderivate davon ein, wie offenbart in BE 831,368, BE 821,369 und BE 821,370. Polycarboxylate, die zwei Carboxygruppen enthalten, schließen die wasserlöslichen Salze von Bernsteinsäure, Malonsäure, (Ethylendioxy)-Di-Essigsäure, Maleinsäure, Diglycolsäure, Weinsäure, Tartronsäure und Fumarsäure sowie die Äthercarboxylate, beschrieben in DE 24 46 686, DE 24 46 487, US 3,935,257, und die Sulfinylcarboxylate, beschrieben in BE 840,623, ein. Polycarboxylate, die drei Carboxygruppen enthalten, schließen insbesondere wasserlösliche Zitate, Aconitate und Citraconate sowie Succinat-Derivate, wie Carboxymethyloxysuccinate, beschrieben in GB 1,379,241, Lactoxysuccinate, beschrieben in der NL-Anmeldung 7205873, und Oxypolycarboxylat-Materialien, wie 2-Oxa-1,1,3-propan-Tricarboxylate, beschrieben in GB 1,387,447, ein.

[0206] Polycarboxylate, die vier Carboxygruppen enthalten, schließen Oxydisuccinate, offenbart in GB 1,261,829, ein, 1,1,2,2-Ethantetracarboxylate, 1,1,3,3-Propantetracarboxylate, die Sulfosubstituenten enthalten, schließen die Sulfosuccinat-Derivate, offenbart in GB 1,398,421 und GB 1,398,422 und in US 3,936,448, und die sulfonierten pyrolysierten Citrate, beschrieben in GB 1,082,179, ein während Polycarboxylate, die Phosphonsubstituenten enthalten, in GB 1,439,000 offenbart sind.

[0207] Alicyclische und heterocyclische Polycarboxylate schließen Cyclopentan-cis,cis-cis-Tetracarboxylate, Cyclopentadienid-Pentacarboxylate, 2,3,4,5-Tetrahydrofuran-cis,cis,cis-Tetracarboxylate, 2,5-Tetrahydro-furan-cis-Discarboxylate, 2,2,5,5-Tetrahydrofuran-Tetracarboxylate, 1,2,3,4,5,6-Hexan-Hexacarboxylate und Carboxymethyl-Derivate polyhydratischer Alkohole wie Sorbitol, Mannitol und Xylitol ein. Aromatische Polycarboxylate schließen Mellitinsäure, Pyromellitinsäure und Phthalsäure-Derivate, wie offenbart in GB 1,425,343, ein. Von den zuvor genannten, sind die bevorzugten Polycarboxylate Hydroxycarboxylate enthaltend bis zu drei Carboxygruppen pro Molekül, insbesondere Citrate.

[0208] Bevorzugte Wasserenthärtersysteme zur Verwendung in den vorliegenden Zusammensetzungen schließen eine Mischung eines wasserunlöslichen Aluminosilikat-Wasserenthärters wie Zeolith A oder eines Schichtsilikats (SKS-6), und einen wasserlöslichen Carboxylat-chelatisierenden Wirkstoff wie Zitronensäure ein.

[0209] Ein geeignetes Komplexierungsmittel zum Einbeziehen in die Waschmittelzusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung ist Ethylendiamin-N,N'-disukzinsäure (EDDS) oder das Alkalimetall, Erdalkalimetall, Ammonium- oder substituierte Ammoniumsalze davon, oder Mischungen davon. Bevorzugte EDDS-Verbindungen sind die freie Säureform und das Natrium- oder Magnesiumsalz davon. Beispiele solcher bevorzugten Natriumsalze von EDDS schließen Na₂EDDS und Na₄EDDS ein. Beispiele solcher bevorzugten

Magnesiumsalze von EDDS schließen MgEDDS und Mg₂EDDS ein. Die Magnesiumsalze sind zum Einbeziehen in die Zusammensetzungen gemäß der Erfindung am meisten bevorzugt.

[0210] Bevorzugte Wasserenthärtersysteme schließen eine Mischung aus einem wasserunlöslichen Aluminosilicat-Wasserenthärter wie Zeolith A, und einem wasserlöslichen, Carboxylat-komplexierenden Wirkstoff wie Zitronensäure ein.

[0211] Weitere Wasserenthärtermaterialien, die einen Teil des Wasserenthärtersystems zur Verwendung in granulären Zusammensetzungen bilden können, schließen anorganische Materialien wie Alkalimetallcarbonate, Bicarbonate, Silicate und organische Materialien wie die organischen Phosphonate, Aminopolyalkenylphosphonate und Aminopolycarboxylate ein.

[0212] Weitere geeignete wasserlösliche organische Salze sind die homo- oder co-polymeren Säuren oder ihre Salze, bei denen die Polycarbonsäure mindestens zwei Carboxyreste, die voneinander durch nicht mehr als zwei Kohlenstoffatome getrennt sind, umfasst.

[0213] Polymere dieses Typs sind in GB-A-1,596,756 offenbart. Beispiele solcher Salze sind Polyacrylate mit einem Molekulargewicht von 2000–5000 und ihre Copolymere mit Maleinsäureanhydrid, wie Copolymere mit einem Molekulargewicht von 20000 bis 70000, insbesondere etwa 40000.

[0214] Reinigungskräftige Wasserenthärtersalze sind üblicherweise in Mengen von 5 Gew.-% bis 80 Gew.-% der Zusammensetzung enthalten. Bevorzugte Wasserenthärtermengen für flüssige Waschmittel liegen bei von 5% bis 30%.

Enzyme

[0215] Bevorzugte Waschmittelzusammensetzungen, zusätzlich zu dem erfindungsgemäßen Enzym, umfassen andere Enzym(e), welches) für die Waschleistung und/oder Gewebepflege von Vorteil ist/sind. Solche Enzyme schließen Proteasen, Lipasen, Cutinasen, Amylasen, Cellulasen, Peroxidasen, Oxidasen (z. B. Laccasen) ein.

[0216] Proteasen: Jede Protease, die zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignet ist, kann verwendet werden. Geeignete Proteasen schließen solche von tierischer, pflanzlicher oder mikrobieller Herkunft ein. Mikrobielle Herkunft ist bevorzugt. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Die Protease kann eine Serinprotease, vorzugsweise eine alkalische mikrobielle Protease oder eine Trypsin-ähnliche Protease sein. Beispiele alkalischer Proteasen sind Subtilisine, insbesondere solche, die von Bacillus abstammen, z. B. Subtilisin Novo, Subtilisin Carlsberg, Subtilisin-309, Subtilisin-147 und Subtilisin-168 (beschrieben in der WO 89/06279). Beispiele Trypsin-ähnlicher Proteasen sind Trypsin (z. B. aus dem Schwein oder Rind) und die Fusarium-Protease beschrieben in der WO 89/06270. Bevorzugte kommerziell erhältliche Proteaseenzyme schließen solche ein, die unter den Handelsnamen Alcalase, Savinase, Primase, Durazym und Esperase von Novo Nordisk A/S (Dänemark) verkauft werden, solche, die unter dem Handelsnamen Maxatase, Maxacal, Maxapern und Properase von Gist-Brocades/Genencor verkauft werden, solche, die unter dem Handelsnamen Purafect und Purafect OXP von Genencor International verkauft werden, und solche, die unter dem Handelsnamen Opticlean und Optimase von Solvay Enzymes verkauft werden. Die Proteaseenzyme können gemäß der vorliegenden Erfindung in einer Menge von 0,0001 Gew.-% bis 2 Gew.-% der Zusammensetzung an Enzymprotein in die Zusammensetzungen aufgenommen werden, insbesondere in einer Menge von 0,001 Gew.-% bis 0,1 Gew.-% der Zusammensetzung an Enzymprotein.

[0217] Lipasen: Jede Lipase, die zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignet ist, kann verwendet werden. Geeignete Lipasen schließen solche ein, die aus Bakterien oder Pilzen stammen, und chemisch oder genetisch modifizierte Lipasemutanten.

[0218] Beispiele nützlicher Lipasen schließen eine Humicola lanuginosa-Lipase, z. B. wie beschrieben in EP 258 068 und EP 305 216, und Mutanten davon, wie beschrieben in WO 92/05249, WO 94/25577 und WO 95/22615 eine Rhizomucor miehei-Lipase, z. B. wie beschrieben in EP 238 023, eine Candida-Lipase, wie z. B. eine C. antarctica-Lipase, z. B. die C. antarctica-Lipase A oder B, beschrieben in EP 214 762, eine Pseudomonas-Lipase, wie z. B. P. alcaligenes und P. pseudoalcaligenes-Lipase, z. B. wie beschrieben in EP 218 272 oder jede Mutante der Pseudomonas-Lipase, eine P. cepacia-Lipase, z. B. wie beschrieben in EP 331 376, eine P. stutzeri-Lipase, wie z. B. in BP 1,372,034 offenbart, eine P. fluorescens-Lipase, eine Bacillus-Lipase, z. B. eine B. subtilis-Lipase (Dartois et al., (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131, 253–260), eine B. ste-

rothermophilus-Lipase (JP 64/744992) und eine *B. pumilus*-Lipase (WO 91/16422) ein. Außerdem kann eine Reihe klonierter Lipasen nützlich sein, eingeschlossen die *Penicillium camembertii*-Lipase, beschrieben von Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61–67), die *Geotrichum candidum*-Lipase (Schimada, Y. et al., (1989), J. Biochem., 106, 383–388), und verschiedene *Rhizopus*-Lipasen, wie z. B. eine *R. delemar*-Lipase (Hass, M. J. et al., (1991), Gene 109, 117–113), eine *R. niveus*-Lipase (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 716–719) und eine *R. oryzae*-Lipase.

[0219] Weitere Arten lipolytischer Enzyme, wie Cutinasen, können ebenfalls nützlich sein, z. B. eine Cutinase aus *Pseudomonas mendocina*, wie beschrieben in WO 88/09367, oder eine Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (wie z. B. beschrieben in WO 90/09446). Besonders geeignete Lipasen sind Lipasen wie z. B. M1 LipaseTM, Luma fastTM und LipomaxTM (Gist-Brocades/Genencor), LipolaseTM und Lipolase UltraTM (Novo Nordisk A/S) und Lipase P „Amano“ (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

[0220] Die Lipasen werden üblicherweise in einer Menge von 0,0001 Gew.-% bis 2 Gew.-% der Waschmittelzusammensetzung an Enzymprotein aufgenommen, insbesondere in einer Menge von 0,001 Gew.-% bis 0,1 Gew.-% der Zusammensetzung an Enzymprotein.

[0221] Amylasen: Jede Amylase (a und/oder b), die zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignet ist, kann verwendet werden. Geeignete Amylasen schließen solche ein, die aus Bakterien oder Pilzen stammen. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Amylasen schließen beispielsweise a-Amylasen, erhalten aus einem speziellen Stamm von *B. licheniformis*, detaillierter beschrieben in GB 1,296,839, ein. Kommerziell erhältliche Amylasen sind DuramylTM, TermamylTM, FungamylTM und BANTM (erhältlich von Novo Nordisk A/S) und RapidaseTM und Maxamyl PTM (erhältlich von Gist-Brocades/Genencor).

[0222] Die Amylasen werden üblicherweise in einer Menge von 0,0001 Gew.-% bis 2 Gew.-% der Waschmittelzusammensetzung an Enzymprotein in die Waschmittelzusammensetzung aufgenommen, insbesondere in einer Menge von 0,001 Gew.-% bis 0,1 Gew.-% der Zusammensetzung an Enzymprotein.

[0223] Cellulasen: Jede Cellulase, die zur Verwendung in alkalischen Lösungen geeignet ist, kann verwendet werden. Geeignete Cellulasen schließen solche ein, die von Bakterien oder Pilzen stammen. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen. Geeignete Cellulasen sind in US 4,435,307 offenbart, welche Pilz-Cellulasen offenbart, die von *Humicola insolens* produziert werden. Besonders geeignete Cellulasen sind Cellulasen, die für die Farbpflege von Vorteil sind. Beispiele solcher Cellulasen sind Cellulasen, die in der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung Nr. 0495257 beschrieben sind. Kommerziell erhältliche Cellulasen sind CelluzymeTM, das von einem Stamm von *Humicola insolens* produziert wird (Novo Nordisk A/S), und KAC-500(B)TM (Kao Corporation).

[0224] Die Cellulasen sind üblicherweise in einer Menge von 0,0001 Gew.-% bis 2 Gew.-% der Waschmittelzusammensetzung an Enzymprotein in die Waschmittelzusammensetzung aufgenommen, insbesondere in einer Menge von 0,001 Gew.-% bis 0,1 Gew.-% der Zusammensetzung an Enzymprotein.

[0225] Peroxidasen/Oxidasen: Peroxidase- und/oder Oxidase-Enzyme werden in Kombination mit Wasserstoffperoxid oder Sauerstoffquellen, z. B. Percarbonat, Perborat, Persulfat, Wasserstoffperoxid, Sauerstoff usw., verwendet. Sie werden zum „Lösungsbleichen“ verwendet, d. h. um eine Übertragung eines Textilfarbstoffs von einem gefärbten Stoff auf einen anderen Stoff zu verhindern, wenn die Stoffe zusammen in einer Waschflüssigkeit gewaschen werden, vorzugsweise zusammen mit einem verstärkenden Wirkstoff, wie z. B. beschrieben in WO 94/12621 und WO 95/01426. Geeignete Peroxidasen/Oxidasen schließen solche ein, die aus Pflanzen, Bakterien oder Pilzen stammen. Chemisch oder genetisch modifizierte Mutanten sind eingeschlossen.

[0226] Die Peroxidase- und/oder Oxidase-Enzyme werden üblicherweise in einer Menge von 0,0001 Gew.-% bis 2 Gew.-% der Waschmittelzusammensetzung an Enzymprotein in die Waschmittelzusammensetzung aufgenommen, insbesondere in einer Menge von 0,001 Gew.-% bis 0,1 Gew.-% der Zusammensetzung an Enzymprotein.

[0227] Mischungen der zuvor erwähnten Enzyme kommen hierbei in Betracht, insbesondere eine Mischung einer Protease, einer Amylase, einer Lipase und/oder einer Cellulase.

Optionale Waschmittelinhaltsstoffe

[0228] Bleichmittel: Zusätzliche optionale Waschmittel-Inhaltsstoffe, die in die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen aufgenommen werden können, schließen Bleichmittel wie PB1, PB4 und Percarbonat mit einer Partikelgröße von 400–800 µm ein. Diese Bleichmittelbestandteile können ein oder mehrere Sauerstoffbleichmittel und, abhängig von dem ausgewählten Bleichmittel, einen oder mehrere Bleichaktivatoren einschließen. Sofern vorhanden, liegen Sauerstoffbleichverbindungen üblicherweise in einer Menge von etwa 1% bis etwa 25% vor.

[0229] Der Bleichmittelbestandteil zur Verwendung hierin kann jeder der Bleichwirkstoffe, die für Waschmittelzusammensetzungen verwendbar sind, sein, einschließlich Sauerstoffbleichen sowie andere aus dem Stand der Technik bekannte. Das für die vorliegende Erfindung geeignete Bleichmittel kann ein aktiviertes oder ein nicht-aktiviertes Bleichmittel sein.

[0230] Eine Kategorie von Sauerstoffbleichmitteln, die verwendet werden kann, umfasst Percarbonsäurebleichmittel und Salze davon. Geeignete Beispiele dieser Klasse von Wirkstoffen schließen Magnesium-Mono-peroxyphthalathexahydrat, das Magnesiumsalz von Metachlorperbenzoësäure, 4-Nonylarnino-4-oxoperoxybuttersäure und Diperoxydodecandi-Säure ein. Solche Bleichmittel sind offenbart in US 4,483,781, US 740,446, EP 0 133 354 und US 4,412,934. Äußerst bevorzugte Bleichmittel schließen auch 6-Nonylarno-6-oxoperoxycapronsäure, wie in US 4,634,551 beschrieben, ein.

[0231] Eine weitere Kategorie von Bleichmitteln, die verwendet werden kann, umfasst Halogenbleichmittel. Beispiele von Hypohalit-Bleichmitteln, beispielsweise, schließt Trichlor-Isocyanurinsäure und die Natrium- und Kaliumdichlorisocyanurate und N-Chlor- und N-Bromalkansulfonamide ein. Solche Materialien werden normalerweise zu 0,5–10 Gew.-% des fertigen Produkts zugefügt, vorzugsweise 1–5 Gew.-%.

[0232] Die Wasserstoffperoxid-freisetzenden Wirkstoffe können in Kombination mit Bleichaktivatoren verwendet werden, wie Tetraacetylenthylendiamin (TAED), Nonanoyloxybenzensulfonat (NOBS, beschrieben in US 4,412,934), 3,5-Trimethylhexanoloxybenzensulfonat (ISONOBS, beschrieben in EP 120 591) oder Pentaacetylglucose (PAG), welche zur Bildung einer Persäure als aktive Bleichspezies perhydrolysiert werden, was zu einer verbesserten Bleichwirkung führt. Zusätzlich sind die Bleichaktivatoren C8(6-Octanamido-caproyl)oxybenzensulfonat, C9(6-Nonanamidocaproyl)oxybenzensulfonat und C10(6-Decanamidocaproyl)oxybenzensulfonat oder Mischungen davon sehr geeignet. Ebenfalls geeignete Aktivatoren sind acylierte Citratester, wie sie in der europäischen Patentanmeldung Nr. 918702077 offenbart sind.

[0233] Verwendbare Bleichmittel, einschließlich Peroxsäuren und Bleichsysteme, umfassend Bleichaktivatoren und Peroxygen-Bleichverbindungen zur Verwendung in Waschzusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung sind in der Anmeldung USSN 08/136,626 beschrieben.

[0234] Quarternäre Iminsalze können als Bleichkatalysatoren zusammen mit einer Peroxygenverbindung, wie in der WO 95/13352 beschrieben, verwendet werden.

[0235] Das Wasserstoffperoxid kann auch vorliegen, indem ein enzymatisches System (d. h. ein Enzym oder ein Substrat dafür), welches in der Lage ist, Wasserstoffperoxid bei Beginn oder während des Wasch- und/oder Spülvorgangs zu erzeugen, hinzugefügt wird. Solche enzymatischen Systeme sind in der veröffentlichten EP-Patentanmeldung Nr. 0537381 offenbart.

[0236] Die Freisetzung von Persäure von einer Peroxygen-Bleichquelle kann durch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Lipase aktiviert werden. Die notwendigen Bestandteile des enzymatischen Hydrolysesystems sind die Persäuresubstratvorstufen: ein Diacylperoxid R₁-CO-O-O-CO-R, wobei R und R₁ ein gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl, eine Arylgruppe oder ein Alkaryl sein kann. Die Lipase reagiert mit dem Substrat und setzt Persäure während des Waschens frei.

[0237] Eine nicht-wässrige flüssige Waschmittelzusammensetzung kann ein Peroxsäurematerial umfassen, z. B. Peroxsäure bestehend aus N,N'-Di(4-Percarboxybenzoyl)ethylendiamin (PCBED), N,N'-Terephthaloyl-di(6-aminopercarboxycapronsäure) (TPCAP), N,N'-Di(4-percarboxybenzoyl)piperazin (PCBPIP), N,N'-Di(4-Percarboxybenzoyl)-1,4-diaminocyclohexan(PCBHEX), N,N'-Di(4-Percarboxybenzoyl)-1,4-butandiamin(PCBBD), N,N'-Di(4-Percarboxyanilin)-terephthalat(DPCAT), N,N,N',N'-1,2,4,5-Tetra-carboxybenzoyl-di(6-aminopercarboxycapronsäure)(DIPAP), N,N'-Di(percarboxyadipoyl)phenylendiamin (DPAPD), N,N'-Sucinoyl-di(4-percarboxy)anilin(SDPCA), C₃-Analog von N,N'-Terephaloyl-di-(8-amino-Peroxyoctansäu-

re(TPOCT), wie beschrieben in WO 95/06104.

[0238] Andere Bleichmittel als Sauerstoffbleichmittel sind ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannt und können hier verwendet werden. Eine Art von Nicht-Sauerstoff-Bleichmitteln von besonderem Interesse schließt photoaktivierte Bleichmittel, wie sulfonierte Zink- und/oder Aluminium-Phthalocyanine ein. Diese Materialien können während des Waschvorgangs auf das Substrat gegeben werden. Nach Bestrahlung mit Licht, in Anwesenheit von Sauerstoff wie z. B. durch Aufhängen der Kleidung zum Trocknen ins Tageslicht, wird das sulfonierte Zinkphthalocyanin aktiviert und infolgedessen das Substrat gebleicht. Bevorzugtes Zinkphthalocyanin und ein photoaktivierter Bleichvorgang sind beschrieben in US 4,033,718. Üblicherweise enthält die Waschmittelzusammensetzung etwa 0,025 Gew.-% bis etwa 1,25 Gew.-% an sulfonierte Zinkphthalocyanin.

[0239] Bleichmittel können ebenfalls einen Mangankatalysator enthalten. Der Mangankatalysator kann, z. B., eine der Verbindungesein, die in „Efficient manganese catalysts for lowtemperature bleaching“, Nature 369, 1994, SS. 637–639, beschrieben sind.

[0240] Schauminhibitoren: Ein weiterer optionaler Inhaltsstoff ist ein Schauminhibitor, beispielhaft vorgestellt durch Silicone und Silica-Silicon-Mischungen. Silicone können im Allgemeinen vertreten werden durch alkylierte Polysiloxan-Materialien, während Silica üblicherweise in fein pulverisierten Formen verwendet wird, beispielhaft vorgestellt durch Silica-Aero-Gele und Xero-Gele und hydrophobe Silicas verschiedener Arten. Diese Materialien können als Partikel aufgenommen werden, in denen der Schauminhibitor vorteilhafterweise freisetzbar in einem wasserlöslichen oder wasserdispergierbaren, im Wesentlichen nicht oberflächenaktiven Detergens-impermeablen Träger inkorporiert ist. Alternativ kann der Schauminhibitor in einem flüssigen Träger gelöst oder verteilt werden und durch Sprühen auf einen oder mehrere der anderen Bestandteile aufgebracht werden.

[0241] Ein bevorzugter schaumkontrollierender Siliconwirkstoff ist in US 3,933,672 offenbart. Weitere besonders verwendbare Schauminhibitoren sind die selbstemulgierenden Silicon-Schauminhibitoren, beschrieben in DE 26 46 126. Ein Beispiel einer solchen Verbindung ist DC-544, kommerziell erhältlich von Dow Corning, welches ein Siloxan-Glycol-Copolymer ist. Besonders bevorzugte schaumkontrollierende Wirkstoffe ist das Schauminhibitorsystem umfassend eine Mischung aus Siliconölen und 2-Alkylalkanolen. Geeignete 2-Alkylalkane sind 2-Butyloctanole, die kommerziell erhältlich sind unter dem Handelsnamen Isofol 12 R.

[0242] Ein solches Schauminhibitorsystem ist in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung Nr. 0593841 beschrieben.

[0243] Besonders bevorzugte schaumkontrollierende Silicanwirkstoffe sind in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung Nr. 0573699 beschrieben. Die Zusammensetzungen können eine Silicon/Silica-Mischung in Kombination mit geräuchertem, nichtporösem Silica wie Aerosil® umfassen.

[0244] Die zuvor beschriebenen Schauminhibitoren werden üblicherweise in Mengen von 0,001 Gew.-% bis 2 Gew.-% der Zusammensetzung verwendet, vorzugsweise von 0,01 Gew.-% bis 1 Gew.-%.

[0245] Weitere Bestandteile: Weitere Bestandteile, die in Waschmittelzusammensetzungen verwendet werden, können herangezogen werden, wie z. B. Schmutz verhindernde Wirkstoffe, Schmutz freisetzende Wirkstoffe, optische Aufheller, Schleifmittel, Bakterizide, Grauschutzmittel, färbende Wirkstoffe und/oder eingekapselte oder nicht eingekapselte Duftstoffe.

[0246] Besonders geeignete einkapselnde Materialien sind wasserlösliche Kapseln, die aus einer Matrix aus Polysaccharid- und Polyhydroxyverbindungen bestehen, wie beschrieben in GB 1,464,616.

[0247] Weitere geeignete wasserlösliche einkapselnde Materialien umfassen Dextrine, die von nicht gelatinisierten Stärkesäureestern substituierter Dicarbonsäuren abstammen, wie beschrieben in US 3,455,838. Die Säureesterdextrine werden vorzugsweise hergestellt von solchen Stärken wie wachshaltige Maisstärke, wachshaltige Hirsestärke, Sagostärke, Maniokstärke und Kartoffelstärke. Geeignete Beispiele dieser Verkapselungsmaterialien schließen N-Lok, hergestellt durch National Starch, ein. Das N-Lok-Verkapselungsmaterial besteht aus einer modifizierten Maisstärke und Glucose. Die Stärke wird durch Anheften monofunktioneller substituierter Gruppen wie Octenylbernsteinsäureanhydrid modifiziert.

[0248] Geeignete ablagerungsverhindernde und Schmutz abweisende Wirkstoffe schließen Cellulosederivate wie Methylcellulose, Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose sowie homo- oder copolymeren Po-

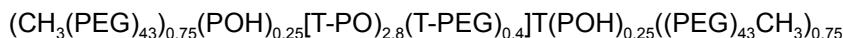
lycarbonsäure oder deren Salze ein. Polymere dieses Typs schließen die Polyacrylate und Maleinsäureanhydrid-Acrylsäure-Copolymere ein, z. B. Sokalan CPS, zuvor als Wasserenthärter erwähnt, sowie Copolymer aus Maleinsäureanhydrid mit Ethylen, Methylvinyläther oder Methacrylsäure, wobei das Maleinsäureanhydrid mindestens 20 Mol-% des Copolymers ausmacht. Diese Materialien werden üblicherweise in Mengen von 0,5 Gew.-% bis 10 Gew.-%, mehr bevorzugt von 0,75 Gew.-% bis 8 Gew.-%, am meisten bevorzugt von 1 Gew.-% bis 6 Gew.-% der Zusammensetzung verwendet.

[0249] Bevorzugte optische Aufheller sind anionisch, Beispiele hierfür sind Dinatrium-4,4'-bis-(2-diethanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino)silben-2:2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(2-morpholino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino-stilben-2:2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ylamino)stilben-2:2'-disulfonat, Mononatrium-4',4"-bis-(2,4-dianilino-s-tri-azin-6 ylamino)stilben-2-sulphonat, Dinatrium 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-methyl-N-2-hydroxyethylamino)-s-triazin-6-ylamino)stilben-2,2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(4-phenyl-2,1,3-triazol-2-yl)-stilben-2,2'-disulfonat, Dinatrium-4,4'-bis-(2-anilino-4-(1-methyl-2-hydroxyethylamino)-s-triazin-6-ylami-no)stilben-2,2'-disulfonat, Natrium-2(stilbyl-4"-(naphtho-1',2':4,5)-1,2,3,-triazol-2"-sulfonat und 4,4'-bis-(2-sulfostyryl)biphenyl.

[0250] Weitere verwendbare polymere Materialien sind die Polyethylenglycole, insbesondere jene mit einem Molekulargewicht von 1000–10000, mehr bevorzugt 2000 bis 8000 und am meisten bevorzugt etwa 4000. Diese werden in Mengen von 0,20 Gew.-% bis 5 Gew.-%, mehr bevorzugt von 0,25 Gew.-% bis 2,5 Gew.-% verwendet. Diese Polymere und die zuvor erwähnten homo- oder copolymeren Polycarboxylatsalze sind wichtig für die Verbesserung des Weißerhalts, Rückstandsablagerung aus dem Stoff sowie für die Waschleistung gegenüber Lehm, eiweißhaltigen und oxidierbaren Schmutzablagerungen in Anwesenheit von Übergangsmetall-Verunreinigungen.

[0251] Ein Ppropfpolymer wie beschrieben in der WO 95/22593 kann ebenfalls verwendet werden.

[0252] Schmutz lösende Wirkstoffe, die in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verwendbar sind, sind im Allgemeinen Copolymer oder Terpolymer aus Terephthalsäure mit Ethylenglycol- und/oder Propylenglycoleinheiten in verschiedenen Zusammensetzungen. Beispiele solcher Polymere sind in US 4,116,885, US 4,711,730 und EP 0 272 033 offenbart. Ein besonders bevorzugtes Polymer gemäß EP 0 272 033 hat die Formel:



wobei PEG -(OC₂H₄)O-, PO(OC₃H₆O) ist und T (pcOC₆H₄CO) ist.

[0253] Ebenfalls gut verwendbar sind modifizierte Polyester als Zufallscopolymere von Dimethylterephthalat, Dimethylsulfoisophthalat, Ethylenglycol und 1-2-Propandiol, wobei die Endgruppen primär aus Sulfonylbenzoat und sekundär aus Monoestern von Ethylenglycol und/oder Propandiol bestehen. Das Ziel besteht darin, ein Polymer zu erhalten, das an beiden Enden durch Sulfonylbenzoatgruppen mit einer Kappe versehen ist, „primär“ werden im vorliegenden Zusammenhang die meisten der Copolymeren an den Enden durch Sulfonylbenzoatgruppen mit einer Kappe versehen. Jedoch werden einige Copolymeren weniger als vollständig mit einer Kappe versehen sein, und deswegen können ihre Endgruppen aus Monoester von Ethylenglycol und/oder Propan-1-2-diol bestehen, bestehen daher „sekundär“ aus solchen Spezies.

[0254] Die hierin ausgewählten Polyester enthalten etwa 46 Gew.-% an Dimethylterephthalsäure, etwa 16 Gew.-% an Propan-1,2-diol, etwa 10 Gew.-% an Ethylenglycol, etwa 13 Gew.-% an Dimethylsulfonylbenzoatesäure und etwa 15 Gew.-% an Sulfoisophthalsäure, und weisen ein Molekulargewicht von etwa 3000 auf. Die Polyester und ihre Herstellungsverfahren sind im Detail in EP 311 342 beschrieben.

[0255] Weichmacher: Stoffweichmacher können gemäß der vorliegenden Erfindung ebenfalls in die Waschmittelzusammensetzungen aufgenommen werden. Diese Wirkstoffe können anorganischer oder organischer Art sein. Anorganische Weichmacher werden beispielhaft anhand der in GB-A-1 400898 und in US 5,019,292 offenbarten Bleicherde erläutert. Organische Stoffweichmacher schließen wasserunlösliche, tertiäre Amine, wie in GB-A1 514 276 und in EP 0 011 340 offenbart, ein sowie ihre Kombination mit quarternären Mono-C₁₂-C₁₄-Ammoniumsalzen, wie in EP 026 528 offenbart, und langkettige Di-Amide, wie in EP 0 242 919 offenbart. Weitere verwendbare organische Inhaltsstoffe an Stoffweichmachersystemen schließen hochmolekulare Polyethylenoxidmaterialien, wie in EP 0 299 575 und 0313 146 offenbart.

[0256] Die Mengen an Bleicherde liegen üblicherweise in einem Bereich von 5 Gew.-% bis 15 Gew.-%, mehr

bevorzugt von 8 Gew.-% bis 12 Gew.-%, wobei das Material als trockener Mischbestandteil zu dem Rest der Formulierung zugefügt. Organische Stoffweichmacher wie die wasserunlöslichen tertiären Amine oder langkettigen Di-Amidmaterialien werden in Mengen von 0,5 Gew.-% bis 5 Gew.-%, üblicherweise von 1 Gew.-% bis 3 Gew.-% aufgenommen, wohingegen die hochmolekularen Polyethylenoxidmaterialien und die wasserlöslichen, kationischen Materialien in Mengen von 0,1 Gew.-% bis 2 Gew.-%, üblicherweise von 0,15 Gew.-% bis 1,5 Gew.-% zugefügt werden. Diese Materialien werden üblicherweise zu dem sprühgetrockneten Anteil der Zusammensetzung hinzugefügt, obwohl es in einigen Fällen günstiger sein kann, diese als getrocknete gemischte Partikel hinzuzufügen oder diese als geschmolzene Flüssigkeit auf weitere feste Bestandteile der Zusammensetzung aufzusprühen.

[0257] Polymere Farbtransfer-hemmende Wirkstoffe: Die erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen können ebenfalls von 0,001 Gew.-% bis 10 Gew.-%, vorzugsweise von 0,01 Gew.-% bis 2 Gew.-%, mehr bevorzugt von 0,05 Gew.-% bis 1 Gew.-% an polymeren Farbtransfer-hemmenden Wirkstoffen umfasst. Diese polymeren Farbtransferhemmenden Wirkstoffe werden üblicherweise in die Waschmittelzusammensetzungen aufgenommen, um den Farbtransfer farbiger Stoffe auf Stoffe, die zusammen damit gewaschen werden, zu verhindern. Diese Polymere haben die Fähigkeit, diffundierende Farbstoffe, die aus gefärbten Stoffen ausgewaschen worden sind, zu komplexieren oder zu absorbieren, bevor die Farbstoffe die Gelegenheit haben, sich während des Waschvorgangs an andere Kleidungsstücke anzulagern.

[0258] Besonders geeignete polymere Farbtransfer-hemmende Wirkstoffe sind Polyamin-N-Oxidpolymere, Copolymeren aus N-Vinylpyrrolidon und N-Vinylimidazol, Polyvinylpyrrolidonpolymere, Polyvinyloxazolidone und Polyvinylimidazole oder Mischungen davon. Der Zusatz solcher Polymere verstärkt auch die Leistung der erfindungsgemäßen Enzyme.

[0259] Die erfindungsgemäße Waschmittelzusammensetzung kann flüssig, pastenartig, gelartig, riegelförmig oder granulär vorliegen. Nicht-stäubende Granulate können hergestellt werden, z. B. wie in US 4,106,991 und 4,661,452 (beide Novo Industri A/S) offenbart und können optional mittels aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren beschichtet werden. Beispiele von wachsartigen Beschichtungsmaterialien sind Poly(ethylenoxid)-Produkte (Polyethylenglycol, PEG) mit mittleren Molekulargewichten von 1000 bis 20000; ethoxylierte Nonylphenole mit von 16 bis 50 Ethylenoxideinheiten; ethoxylierte Fettalkohole, bei denen der Alkohol von 12 bis 20 Kohlensstoffatome enthält und bei denen 15 bis 80 Ethylenoxideinheiten vorliegen; Fettalkohole; Fettsäuren; und Mono- und Di- und Triglyceride von Fettsäuren. Beispiele Film bildender Beschichtungsmaterialien, die zur Anwendung in Fließbettverfahren geeignet sind, werden in GB 1483591 gegeben.

[0260] Granuläre erfindungsgemäße Zusammensetzungen können auch in „komakter Form“ vorliegen, d. h., sie können eine vergleichsweise höhere Dichte als herkömmliche granuläre Waschmittel aufweisen, d. h. 550 bis 950 g/l bilden; in diesem Fall enthalten die granulären erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen eine niedrigere Menge an „Anorganischem Füllsalz“, verglichen mit herkömmlichen granulären Waschmitteln; typische Füllsalze sind Erdalkalimetallsalze von Sulfaten und Chloriden, üblicherweise Natriumsulfat; „komakte“ Waschmittel umfassen üblicherweise nicht mehr als 10% Füllsalz. Die flüssigen erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können auch in „konzentrierter Form“ vorliegen, in diesem Fall enthalten die flüssigen erfindungsgemäßen Waschmittelzusammensetzungen eine niedrigere Menge an Wasser, verglichen mit herkömmlichen flüssigen Waschmitteln. Üblicherweise beträgt der Wassergehalt des konzentrierten flüssigen Waschmittels weniger als 30 Gew.-%, mehr bevorzugt weniger als 20 Gew.-%, am meisten bevorzugt weniger als 10 Gew.-% der Waschmittelzusammensetzungen.

[0261] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können beispielsweise als Hand- und Maschinenwaschmittelzusammensetzungen formuliert sein, einschließlich Zusammensetzungen von Waschmittelzusätzen und Zusammensetzungen, die zur Verwendung in der Vorbehandlung gefärbter Stoffe geeignet sind, beim Spülen zugefügte Stoffweichmacherzusammensetzungen und Zusammensetzungen zur Verwendung für den allgemeinen Haushaltsgebrauch zur Reinigung fester Oberflächen und zum Geschirrspülen.

[0262] Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Waschen oder Reinigen unterschiedlicher Gegenstände mittels einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung. Durch die Verwendung der Zusammensetzung ist es möglich, Fettablagerungen von besagten Gegenständen, z. B. Kleidung, Textilien oder Geschirr, wirksamer zu entfernen.

[0263] Es ist auch möglich, die Menge an lipolytischen Enzymen zu reduzieren, die in der Waschmittelzusammensetzung vorhanden sein müssen, um dieselbe Waschleistung wie Waschmittelzusammensetzungen, die das lipolytische Stammenzym umfassen, zu erhalten.

[0264] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform umfasst das Verfahren die folgenden Schritte:

- a) Tränken des Gegenstandes in flüssigem Medium,
- b) Inkontaktrbringen des Gegenstandes für einen Zeitraum mit einer Waschmittelzusammensetzung umfassend das erfindungsgemäße modifizierte Enzym mit lipolytischer Aktivität, das vor, während oder nach Schritt a) in dem wässrigen Medium gelöst wird,
- c) Spülen des Gegenstandes,
- d) Entfernen des Spülwassers von dem Gegenstand.

MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

Plasmide

pYES 2.0 (Invitrogen Corp., UK)

p960 A. oryzae-Expressionsplasmid (beschrieben in EP 305 216 von Novo Nordisk A/S)

pSX581 (E. coli-Expressionsplasmid (siehe [Abb. 7](#))

pJSO37 (S. cerevisiae-Expressionsplasmid) (Okkels J. S., Annals of the New York Academy of Sciences (in press 1995) (siehe auch [Abb. 8](#))

pSX167 (siehe [Abb. 4](#))

pSX92 (WO 89/06279)

pUC19 (Yanish-Perron et al. (1985) Gene 33, 103–119)

pHD414 (Aspergillus-Expressionsvektor, ein Derivat des Plasmids p775 beschrieben in EP 238 023). Die Konstruktion von pHD414 wird weiterhin beschrieben in WO 93/11249).

pJVI245 (siehe [Abb. 9](#))

pCaHj383 (siehe [Abb. 9](#))

pCaHj385 (siehe [Abb. 9](#))

pAHE2: Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aamand, J. L., Jørgensen, S. T., Diderichsen, B., und McConnell, D. J. (1993). Activation of a bacterial lipase by its chaperone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, S. 5682–5686).

Mikroorganismen

[0265] Saccharomyces cerevisiae YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4–539 Aspergillus oryzae IFO 4177

[0266] A. oryzae JaL 125: Aspergillus oryzae IFO 4177 erhältlich vom Institut für Fermentation, Osaka; 17–25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-ku, Osaka, Japan, bei dem das Gen für die Alkalische Protease namens "alp" (beschrieben von Muratami K. et al., (1991), Agric. Biol. Chem. 55, Seite 2807–2811) deletiert ist, mittels Ein-Schritt-Generationsverfahren (beschrieben von G. May in "Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi" (1992), S. 1–25, Hrsg. J. R. Kinghorn und G. Turner; Blackie Academic and Professional), unter Verwendung des A. oryzae pyrG-Gens als Marker.

[0267] E.coli W3110 lacI^q (E.coli W3110 ist ein frühes Isolat, das als Vorläufer-Stamm für den K-12-Stamm verwendet wurde (Bachman, 1972), Bacteriol. Rev. 36). Der W3110-Stamm wurde lacI^q gemacht, um den lac-Repressor überzuproduzieren, so dass die Expression vom plac vollständiger abgeschaltet wird.

[0268] E. coli SJ6: Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C., (1990), Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol., 172, S. 4315–4312.

[0269] Stamm SJ1503 ist E. coli JA221 enthaltend das Plasmid pAHE2:

Hobson, A. H., Buckley, C. M., Aaman, J. L., Jørgensen, S. T., Diderichsen, B., and McConnell, D. J. (1993). Activation of a bacterial lipase by its chaperone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, S. 5682–5686.

Donororganismen

Humicola lanuginosa DSM 4109 (EP 305,216)

Humicola insolens DSM 1800 (WO 96/13580)

Pseudomonas cepacia SB10, DSM 3959, beschrieben in WO 89/01032.

Enzyme

Rindertrypsin (Boehringer Mannheim)

[0270] Die folgenden Lipasen sind Varianten der *Humicola lanuginosa* DSM 4109 Lipase (EP 305 216), welche entweder als Stammenzyme im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden oder welche erfindungsgemäße modifizierte Enzyme darstellen:

Tabelle M1

Lipasevarianten	Peptidanhang	Mutationen
HLv1s	SPIRR	D57G, N94K, D96L, L97M
HLv1	-	D57G, N94K, D96L, L97M
HLv2s	SPIRR	D137G, D167G, E210V, W221L
HLv2	-	D137G, D167G, E210V, W221L
HLv3s	SPIRR	N94K, F95L, D96H, N101S, F181L, D234Y,

		I252L, P256T, G263A, L264Q
HLv3	-	N94K, F95L, D96H, N101S, F181L, D234Y, I252L, P256T, G263A, L264Q
HLv4s	SPIRR	I90F, D96L, E99K, V187A
HLv4	-	I90F, D96L, E99K, V187A
HLv5s	SPIRR	N94K, D96A, Q249R
HLv5	-	N94K, D96A, Q249R
HLv7s	SPIRR	D57G, G59V, N94K, D96L, L97M, S116P, S170P, Q249R
HLv7	-	D57G, G59V, N94K, D96L, L97M, S116P, S170P, Q249R
HLv8s	SPIRR	A49P, D167G, E210V
HLv8	-	A49P, D167G, E210V
HLv9s	SPIRPRP	D57G N94K, D96L, Q249R
HLv9	-	D57G N94K, D96L, Q249R
HLv10s1	GPIRPRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s2	SHSRHNA	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s3	TAIRPRK	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s4	SALRRRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s5	STRRPRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s6	SPRRPRT	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s7	SPIPPGP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s8	LPFRQRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s9	SPFRPKL	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s10	SALRRP	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s11	SPIRK	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10s12	SPIR	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv10	-	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
HLv11s	SPIRP	E1P, D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R

[0271] Die folgenden Lipasen sind Varianten der *B. cepacia* (früher *Pseudomonas cepacia*) Lipase, and die ein N-terminaler Anhang gemäß der vorliegenden Erfindung angehängt worden ist.

Tabelle M2

Lipasevarianten	Peptidanhang
SJ3708	SPIRR
SJ3717	SPIRPRP
SJ3718	SPIRPRP
SJ3719	TAIRPRK
SJ3720	STRRPRP
SJ3720	STRRPRP
SJ3721	GPIRPRP

[0272] Die folgenden Lipasen sind Varianten des lipolytischen Enzyms aus *Humicola insolens* DSM 1800.

Tabelle M3

Lipasevarianten	Peptidanhang
HILvls	SPPRRP
HILv2s	SPPRP
HILv3s	SPIRK
HILv4s	PPPRRPR

Enzyminhibitor

Sojabohnentrypsininhibitor (Boehringer Mannheim)

Medien

YPD: 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, H₂O auf 810 ml. Autoklaviert, 90 ml 20% Glucose (sterilfiltriert) hinzufügt.

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

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

Litex Agarose HSB 2000 (Kat. Nr. F90472)

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

Substrat 1

10 ml Olivenöl (Sigma Kat. Nr O-1500)

20 ml 2% Polyvinylalkohol (PVA)

[0273] Das Substrat wird für 15–20 Minuten homogenisiert.

PCS-Waschmittel

10 g/l:

SDS	0,52 g
Dobanol 25-3	0,60 g
Dobanol 25-7	0,58 g
NaBO ₃ H ₂ O	1,50 g

[0274] Auf 1 Liter 0,1 M Tris-Puffer (pH 9), und weiter verdünnen mit Tris-Puffer bis zur doppelten Konzentration der gewünschten Konzentration auf den PCS-Platten.

PCS-Platten
Lösung zum Herstellen von PCS-Platten

Brillant Green (BG-Reagenz)	10 ml
Substrat 1	24 ml
PCS-Waschmittel	500 ml
2% Agarose (in TRIS-Puffer (pH 9))	500 ml

Lipasesubstrat (Sigma-Katalog Nr. 800-1)
Brillant Green (Merck, art. No. 1.01310)

Stoffproben

3,5 × 3,5 cm und 9 × 9 cm Baumwollstoffproben (Style #400 von TestFabrics, Inc. (New Jersey) befleckt mit Schweinefett/Sudan-Rot
Schweinefett: Schweinefett gefärbt mit 0,75 mg Sudan-Rot/Gramm Schweinefett.

Waschmittel I

1,17 g/l LAS (Nansa 1169/P, 30% a. m.)
0,15 g/l AEO (Dobanol 25-7)
1,25 g/l Natriumtriphasphat
1,00 g/l Natriumsulphat
0,45 g/l Natriumcarbonat
0,15 g/l Natriumsilicat
pH-Wert auf 10 eingestellt

[0275] Inaktiviertes Ariel Futur (Procter&Gamble) (kommerziell erhältlich Chargen-Nr 4279 B 23 : 35): Die Enzyme im Waschmittel wurden durch Hitze inaktiviert (4 Minuten bei 85°C im Microofen)

Wasser: 3,2 mM Ca²⁺⁺/Mg²⁺⁺ (5 : 1)

Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesi kit (Kat nr. 200509) (Stratagene, LaJolla, CA)

Ausstattung

473A Protein Sequencer (Applied Biosystems)
Toyopearlbutyl-Säule (XK 16/10) (Pharmacia, Schweden)
Q-Sepharose-Säule (HPQ XK 26/10) (Pharmacia, Schweden)
MonoQ-Säule (1 ml) (Pharmacia, Schweden)
Highperformance Q Sepharose (Pharmacia, Schweden)
Spin-100-Säule (Clontech Lab. Inc., CA, USA)

METHODEN

Hybridisierungsbedingungen

Medium für hohe Stringenz

[0276] Vorränken in 5 × SSC und Prähybridisieren für 1 Stunde bei etwa 40°C in einer Lösung aus 20% Formamid, 5 × Denhardt's Lösung, 50 mM Natriumphosphat, pH, 6,8; und 50 mg denaturierte, mit Ultraschall behandelte Kalbsthymus-DNA, gefolgt von Hybridisieren in der selben Lösung, die mit 100 mM ATP ergänzt ist, für 18 Std. bei etwa 40°C, gefolgt von einem Waschdurchgang in 0,4 × SSC bei einer Temperatur von etwa 45°C.

Konstruktion des Hefe-Expressionsvektors

[0277] Das Expressionsplasmid pJSO37 stammt von pYes 2.0. Der induzierbare GAL1-Promotor von pYes 2.0 wurde gegen den konstitutiv exprimierten TPI (Triose-Phosphat-Isomerase)-Promotor von *Saccharomyces cerevisiae* (Albert und Karwasaki, (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1, 419–434) ausgetauscht, und der URA3-Promotor wurde deletiert. Eine Restriktionskarte von pJSO37 ist in [Abb. 8](#) gezeigt.

Verfahren zum Konstruieren lipolytischer Varianten

[0278] Der Peptidanhang und/oder Mutationen im nicht-strukturellen N-terminalen und/oder C-terminalen Ende des lipolytischen Stammenzymes zum Konstruieren der erfindungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzyme wurde entweder mittels zielgerichteter Mutagenese oder Zufallsmutagenese bewerkstelligt.

Zielgerichtete Mutagenese

[0279] Für die Konstruktion der Varianten des lipolytischen H. lanuginosa-Enzyms kann das kommerzielle Kit, Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet werden.

[0280] Das für das fragliche lipolytische Enzym kodierende Gen wird in das Plasmid pHD414 eingefügt. Entsprechend den Herstellerangaben wird die Scal-Schnittstelle des Ampicillingens von pHD414 unter Verwendung des folgenden Primers in eine MluI-Schnittstelle umgewandelt:

Primer 3: AGAAATCGGGTATCCTTCAG (SEQ ID No. 6)

[0281] Der das fragliche lipolytische Gen umfassende pHD414-Vektor wird anschließend als Matrize für die DNA-Polymerase und die Oligos 7258 und 7770 verwendet. Die gewünschte Mutation (z. B. im N-Terminus des lipolytischen Gens) wird durch Anhängen eines geeigneten Oligos umfassend die gewünschte Mutation in das fragliche lipolytische Gen eingebracht.

[0282] Die PCR-Reaktionen werden entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt.

Zufallsmutagenese

[0283] Kann im Wesentlichen wie in WO 95/22615 beschrieben durchgeführt werden. Genauer gesagt wird die Zufallsmutagenese zum Durchführen der Zufallsmutagenese in kurzen DNA-Bereichen wie z. B. in dem Peptidanhang unter Verwendung von „doped“ oder „spiked“ Oligonukleotid-Sonden durchgeführt. Für größere DNA-Bereiche kann PCR-erzeugte Mutagenese verwendet werden.

Niedrig-Calcium-Filterassay

Verfahren

- 1) Bereitstellen von SC Ura⁻ Replica-Platten (nützlich zum Selektieren von Stämmen, die einen Expressionsvektor tragen) mit einem ersten Proteinbindfilter (Nylonmembran) und einem zweiten schwachen Proteinbindfilter (Celluloseactetat) oben.
- 2) Verteilen der Hefezellen enthalten ein Stammlipase-Gen oder ein mutiertes Lipase-Gen auf dem Doppel-Filter und inkubieren für 2 oder 3 Tage bei 30°C.
- 3) Behalten der Kolonien auf dem oberen Filter durch Transferieren des oberen Filters auf eine neue Platte.
- 4) Entfernen des Proteinbindfilters in eine leere Petrischale.
- 5) Gießen einer Agaroselösung umfassend eine Olivenölemulsion (2% P. V. A.: Olivenöl = 3 : 1; Briliant Green (Indikator, 0,004%), 100 mM Trispuffer pH 9 und EGTA (Endkonzentration 5 mM) auf den unteren Filter, um die Kolonien, die Lipaseaktivität exprimieren, in Form von blau-grünen Punkten zu identifizieren.
- 6) Identifizieren der in Schritt 5) gefundenen Kolonien, die eine verminderte Abhängigkeit für Calcium verglichen mit der Stammlipase aufweisen.

Dobanol® 25-7 Filterassay

[0284] Das Durchmustern hinsichtlich einer verbesserten Toleranz gegenüber einer Waschmittelzusammensetzung wird unter Verwendung eines Filterassays entsprechend dem zuvor beschriebenen Filterassay durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die in 5) definierte Lösung weiterhin 0,02% Dobanol® 25-7 umfasst und optional ohne EGTA ist.

[0285] Ein alternativer Durchmusterungs-Assay lautet folgendermaßen:

Verfahren

- 1) Bereitstellen von SC Ura⁻ Replica-Platten (nützlich zum Selektieren von Stämmen, die einen Expressionsvektor tragen) mit einem ersten Proteinbindfilter (Nylonmembran) und einem zweiten schwachen Proteinbindfilter (Celluloseactetat) oben.

onsvektor tragen) mit einem Proteinbindefilter (Celluloseactetat) oben:

- 2) Verteilen der Hefezellen enthalten ein Stammlipase-Gen oder ein mutiertes Lipase-Gen auf dem Filter und inkubieren für 3 oder 4 Tage bei 30°C.
- 3) Behalten der Kolonien auf dem oberen Filter durch Transferrieren des oberen Filters auf einen neuen Platte.
- 4) Entfernen des Proteinbindefilters in eine Petrischale enthaltend: eine Agaroselösung umfassend eine Olivenölemulsion (2% P. V. A.: Olivenöl = 2 : 1; Briliant Green (Indikator, 0,004%); 100 mM Trispuffer pH 10 und das Waschmittel oder die Waschmittelzusammensetzung, z. B. PCS-Platten.
- 5) Identifizieren der in Schritt 4) gefundenen Kolonien, die Lipaseaktivität exprimieren, in Form von blau-grünen Punkten.

Fermentation in Hefe

[0286] 10 ml SC-ura⁻ Medium werden mit einer *S. cerevisiae*-Kolonie angeimpft und bei 30°C für 2 Tage kultiviert. Die erhaltene 10 ml-Kultur wird zum Animpfen einer Schüttelflasche enthaltend 300 ml SC-ura⁻ Medium verwendet, welche bei 30°C für 3 Tage kultiviert wird. Die 300 ml werden zum Animpfen von 5 Liter des folgenden G-Substrats verwendet:

400 g Amicase
 6,7 g Hefeextrakt (Difco)
 12,5 g L-Leucin (Fluka)
 6,7 g (NH₄)₂SO₄
 10 g MgSO₄ 7H₂O
 17 g K₂SO₄
 10 ml Spurenelemente
 5 ml Vitaminlösung
 6,7 ml H₃PO₄
 25 ml 20% Pluronic (anti-Schaumwirkstoff)
 in einem Gesamtvolumen von 5000 ml.

[0287] Die Hefezellen werden für 5 Tage bei 30°C fermentiert. Ihnen wurde eine Ausgangsdosis von 100 ml 70% Glucose gegeben und 400 ml 70% Glucose/Tag hinzugefügt. Ein pH = 5 wird unter Zugabe von einer 10% NH₃ Lösung beibehalten. Die Rührgeschwindigkeit beträgt 300 Upm für die ersten 22 Std. gefolgt von 900 Upm für den Rest der Fermentation. Luft wird mit 1 L Luft/L/min für die ersten 22 Stunden gefolgt von 1,5 L Luft/L/min für den Rest der Fermentation zugeführt.

[0288] Spurenelemente: 6,8 g ZnCl₂, 54,0 g FeCl₂·6H₂O, 19,1 g MnCl₂·4H₂O, 2,2 g CuSO₄·5H₂O, 2,58 g CaCl₂, 0,62 g H₃BO₃, 0,024 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,2 g KI, 100 ml HCl (konzentriert), in einem Gesamtvolumen von 1 l.

[0289] Vitaminlösung: 250 mg Biotin, 3 g Thiamin, 10 g D-Calciumpanthenonat, 100 g Myo-Inositol, 50 g Cholinchlorid, 1,6 g Pyridoxin, 1,2 g Niacinamid, 0,4 g Folsäure, 0,4 g Riboflavin. In einem Gesamtvolumen von 1 Liter.

Transformation von *Aspergillus oryzae* (allgemeines Verfahren)

[0290] 100 ml YPD (Shermna et al., (1981), Methods of Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) werden mit Sporen von *A. oryzae* angeimpft und unter Schütteln für etwa 24 Stunden inkubiert. Das Myzel wird über Filtration durch Miracloth-Filtermaterial geerntet und mit 200 ml 0,6 M MgSO₄ gewaschen. Das Myzel wird in 15 ml 1,2 M MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 5,8 aufgenommen. Die Suspension wird auf Eis gekühlt und 1 ml an Puffer, enthaltend 120 mg Novozym 234, Charge 1687 wird hinzugefügt. Nach 5 min wird 1 ml 12 mg/ml BSA (Sigma type H25) hinzugefügt und die Inkubation wird unter vorsichtigem Rühren für 1,5–2,5 Stunden bei 37°C fortgesetzt, bis eine große Menge an Protoplasten in einer unter dem Mikroskop beobachteten Probe sichtbar ist.

[0291] Die Suspension wird durch Miracloth gefiltert, das Filtrat in ein steriles Röhrchen überführt und mit 5 ml 0,6 M Sorbitol, 100 mM Tris-HCL, pH 7, überschichtet, die Zentrifugation wird für 15 min bei 1000 g durchgeführt und die Protoplasten wurden oben vom MgSO₄-Kissens gesammelt. Zwei Volumina an STC (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂) werden zu der Protoplastensuspension hinzugefügt und die Mischung wird für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Protoplasten-Pellet wird in 3 ml STC resuspendiert und erneut pelletiert. Das wird wiederholt. Schließlich werden die Protoplasten in 0,2–1 ml STC resuspendiert.

[0292] 100 µl der Protoplastensuspension werden mit 5–25 µg p3SR2 (ein Plasmid, welches das A. nidulans amdS-Gen trägt; beschrieben in Hynes et al., Mol. And Cell. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430–1439, Aug. 1983) in 10 µl STC gemischt. Die Mischung wird für 25 min auf Raumtemperatur belassen. 0,2 ml von 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ und 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 werden hinzugefügt und vorsichtig (zweimal) gemischt und schließlich werden 0,85 ml der selben Lösung hinzu gefügt und vorsichtig gemischt. Die Mischung wird für 25 min auf Raumtemperatur belassen, für 15 min bei 2500 g abzentrifugiert und das Pellet wird in 2 ml 1,2 M Sorbitol resuspendiert. Nach einem weiteren Sedimentationsschritt werden die Protoplasten auf Minimalplatten (Cove 1966), Biochem. Biophys. Acta 113, 51–56), enthaltend 1,0 M Sucrose; pH 7,0, 10 mM Acetamid als Stickstoffquelle und 20 mM CsCl zur Verhinderung von Hintergrundwachstum, ausgestrichen. Nach Inkubation von 4–7 Tagen bei 37°C werden die Sporen gepickt, in sterilem Wasser aufgenommen und auf Einzelkolonien ausgestrichen. Dieses Verfahren wird wiederholt und die Sporen einer einzelnen Kolonie nach der zweiten Re-Isolierung werden als definierte Transformante gelagert.

Zufuhr-Chargen-Fermentation

[0293] Zufuhr-Chargen-Fermentation wird in einem Medium durchgeführt, das Maltodextrin als Kohlenstoffquelle, Harnstoff als Stickstoffquelle und Hefeextrakt enthält. Die Zufuhr-Chargen-Fermentation wurde durch Animpfen einer Schüttelflaschenkultur der fraglichen A. oryzae-Wirtszellen in ein geeignetes Medium umfassend 3,5% der Kohlenstoffquelle und 0,5% der Stickstoffquelle durchgeführt. Nach 24 Stunden Kultivierung bei pH 5 und 34°C wird die kontinuierliche Zufuhr von zusätzlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen eingeleitet. Die Kohlenstoffquelle wird als limitierender Faktor beibehalten und es wird sichergestellt, dass Sauerstoff im Überschuss vorhanden ist. Die Zufuhr-Chargen-Kultivierung wird für 4 Tage fortgeführt, nach denen die Enzyme mittels Zentrifugation, Ultrafiltration, Klarfiltration und Keimfiltration gewonnen werden können. Weitere Reinigung kann mittels aus dem Stand der Technik bekannter Anionenaustausch-Chromatografie-Verfahren erfolgen.

Lipase-Aktivität (LU – Lipase Units)

[0294] Die Lipase-Aktivität wird mittels Glycerin-Tributyrat als Substrat und Gummirabikum als ein Emulgierungsmittel getestet. 1 LU (Lipase Unit) entspricht der Menge an Enzym, welche 1 µmol titrierbare Buttersäure pro Minute bei 30°C, pH 7,0 freisetzt. Die Lipaseaktivität wird bei pH-stat mittels eines Radiometer-Titrationstors VIT90, Radiometer, Copenhagen getestet.

Aufbringen von Schweinefett auf Stoffproben

[0295] 6 ml gefärbtes, auf 70° erhitztes Schweinefett wird auf den Kanter jeder Stoffprobe aufgebracht. Nachdem Aufbringen des Flecks werden die Stoffproben in einem Ofen für 25 Minuten bei 75°C erhitzt und vor dem ersten Waschen über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

3-Zyklus-Waschleistung

[0296] Die 3-Zyklus-Waschleistung des erfindungsgemäßen modifizierten lipolytischen Enzyms kann auf der Basis der Enzymdosis in mg Protein (oder LU) pro Liter verglichen mit dem lipolytischen Stammenzym eingeschätzt werden. Waschdurchgänge erfolgen in 150 ml-Bechern, die in ein Temperatur-geregeltes Wasserbad gestellt werden. Die Becher werden mit dreickigen magnetischen Rührstäbchen gerührt.

[0297] Die experimentellen Bedingungen lauten wie folgt:

Verfahren:	3 Zyklen mit Übernachtrocknung zwischen jedem Zyklus
Waschflüssigkeit:	1000 ml pro Becher
Stoffproben:	6 Stoffproben (3,5 × 3,5 cm, befleckt mit Schweinefett gefärbt mit 0,75 mg Sudanrot/Gramm Schweinefett) pro Becher
Waschmittel:	Waschmittel I, pH eingestellt auf 10,2
Enzym-Konz.:	0,075, 0,188, 0,375, 0,75 und 2,5 mg Lipaseprotein pro Liter
Zeit:	20 Minuten
Temperatur:	30°C

Spülung:
Trocknung:
Auswertung:

15 Minuten in fließendem Leitungswasser
über Nacht bei Raumtemperatur (~20°C; 30–50% rF)
nach dem 3. Waschen wurden die Reflexion bei 460 nm gemessen.

Auswertungen der Waschergebnisse

[0298] Dosis-abhängige Kurven werden für das modifizierte lipolytische Enzym und für das lipolytische Stammenzym verglichen. Die Dosis-abhängigen Kurven werden durch Anpassen der gemessenen Werte an die folgende Gleichung errechnet:

$$DR = DR_{\max} \frac{C^{0,5}}{K + C^{0,5}} \quad (I)$$

wobei DR die Wirkung ausgedrückt in Reflexionseinheiten ist

C die Enzymkonzentration ist (mg/l)

DR_{\max} eine Konstante, die die maximale Wirkung ausdrückt, ist

K eine Konstante ist; K² drückt die Enzymkonzentration aus bei der die Hälfte der maximalen Wirkung erzielt wird.

[0299] Basierend auf den charakteristischen Konstanten DR_{max} und K, die für jedes modifizierte lipolytische Enzym sowie für das lipolytische Stammenzym gefunden wurde, werden die Verbesserungsfaktoren errechnet. Der Verbesserungsfaktor, definiert als:

$$F_{\text{improve}} = C_{\text{parent}}/C \quad (II)$$

drückt die Menge an modifiziertem Lipaseprotein aus, die benötigt wird, um die selbe Wirkung zu erzielen wie sie mit 0,25 mg/l des Referenz-Stammenzyms (C_{parent}) erzielt wird.

[0300] Folglich lautet das Vorgehen zum Errechnen des Verbesserungsfaktors wie folgt:

- 1) Die Wirkung des Stammproteins bei 0,25 mg/l (DR_{parent}) wurde anhand Gleichung (I) errechnet;
- 2) Die Konzentration des modifizierten lipolytischen Enzyms, die zu der gleichen Wirkung wie 0,25 mg/l Stammenzym führt, wurde anhand der folgenden Gleichung errechnet:

$$C = \frac{(K_{\text{modify}})}{DR_{\max(\text{modify})} - DR_{(\text{parent})}} \frac{D_{(\text{parent})}}{)^2} \quad (III)$$

- 3) der Verbesserungsfaktor wurde anhand Gleichung (II) errechnet.

Ein-Zyklus-Waschleistung

[0301] Ein-Zyklus-Waschdurchgänge wurden in einem Temperatur-geregelten Terg-O-to-Meter (TOM) durchgeführt.

Verfahren:	1 Zyklus Waschen gefolgt von Trocknen auf der Leine
Waschflüssigkeit:	100 ml pro Becher
Stoffproben:	7 Stoffproben (9 × 9 cm, befleckt mit Schweinefett gefärbt mit 0,75 mg Sudanrot/Gramm Schweinefett)
Wasser:	3,2 mM Ca ²⁺ /mg ²⁺ (5 : 1)
Waschmittel:	5 g/l inaktiviertes Ariel Futur™, natürlicher pH etwa 10,3 (kommerziell erhältliche Charge Nr. 4279 B 23 : 35)
Lipase-Konzentrationen:	0, 1250, 12500 LU/l
Zeit:	20 Minuten
Temperatur:	30°C
Spülung:	15 Minuten in fließendem Leitungswasser
Trocknung:	über Nacht bei Raumtemperatur (~20°C, 30–50% rF)
Auswertung:	das fettige Material wird mittels Soxhlet-Verfahren, extrahiert die Menge an fettigem Material wird gravimetrisch bestimmt.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

Herstellung der Wildtyp-Humicola lanuginosa-Lipase in Hefe

[0302] Zur Expression der Humicola lanuginosa-Lipase in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 wurde der Hefe-Expressionsvektor pJSO37 (siehe [Abb. 8](#)) wie in dem obigen Abschnitt Material und Methoden beschrieben. pJSO37 umfasst die für die Stammlipase, kodierende DNA-Sequenz und schließt DNA-Sequenzen ein, die für das Signalpeptid und Propeptid (siehe [Abb. 1](#)) kodieren. Das Plasmid wurde in die Hefe mittels Standardverfahren transformiert (vgl. Sambrooks et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor). Die Hefe wurde wie in Material und Methoden zuvor beschrieben kultiviert.

Reinigung der in *S. cerevisiae* exprimierten *H. lanuginosa*-Lipase

[0303] Ammoniumacetat (92 g) wurde zum Fermentationsmedium (1400 ml) hinzugegeben, um eine 0,8 M Ammoniumacetatlösung zu erhalten. Die Lösung wurde auf eine Toyopearl-Butylsäule (XK 16/10) gegeben. Die Säule wurde mit 0,8 M Ammoniumacetat gewaschen und die Lipase in H₂O bei einer Durchflussrate von 5 ml/min eluiert. 10 ml-Fraktionen wurden gesammelt und die Lipase-enthaltenden Fraktionen wurden gemäß der Aktivität in dem Standard-Lipasetitrationsassay gepoolt. Der Lipase-enthaltende Pool wurde gefiltert und der pH wurde auf pH 7,6 eingestellt und auf eine Q-Sepharosesäule (HPQ XK 26/10) gegeben. Die Säule wurde mit 200 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,25 gewaschen und die Lipase wurde in einem linearen Gradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in 400 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,25 bei einer Durchflussrate von 5 ml/min eluiert. 10 ml-Fraktionen wurden gesammelt und die Lipase-enthaltenden Fraktionen wurden gemäß der Aktivität in dem Standard-Lipasetitrations-Assay gepoolt. Der Lipase-enthaltende Pool wurde mit H₂O verdünnt und auf eine 1 ml MonoQ-Säule bei einer Durchflussrate von 1 ml/min gegeben. Die Säule wurde mit 30 ml H₂O gewaschen und die Lipase wurde in einem linearen Gradienten von 0 bis 0,25 M NaCl in 40 ml eluiert. Die Lipase wurde gemäß der Absorption bei 280 nm manuell gesammelt.

N-terminale Aminosäuresequenzierung der in Hefe exprimierten *H. lanuginosa*-Lipase

[0304] Die N-terminale Aminosäuresequenzierung wurde an der *S. cerevisiae*-exprimierten Lipase mittels des 473A-Protein-Sequencers gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

[0305] Wenn die N-terminale Aminosäuresequenz der *S. cerevisiae*-exprimierten Lipase mit der N-terminalen Aminosäuresequenz derselben Lipase, die in *A. oryzae* exprimiert wird (wie beschrieben in EP 305 216) verglichen wird, wurde ein Unterschied beobachtet, da der Hauptteil des in *S. cerevisiae* exprimierten Enzyms 5 Aminosäurereste mehr (SPIRR-) am N-Terminus enthält (siehe Tabelle E1), welcher die entsprechende Information für die in *A. oryzae* exprimierte Lipase einschließt.

Tabelle E1

Expressionssystem	Fraktion enthaltend SPIRR-EVSQ...	Fraktion enthaltend EVSQ...
<i>S. cerevisiae</i>	75 %	25 %
<i>A. oryzae</i>	0 %	100 %

[0306] Wie man in der Tabelle sieht, ist ein Hauptteil der sezernierten, in *S. cerevisiae* exprimierten Lipase um die fünf Aminosäuren SPIRR (vom Propeptid) verlängert. Die relative Menge an Enzym, die diese zusätzlichen Aminosäurereste enthalten, kann anhand der Ausbeuten an PTH-Aminosäuren bei der Aminosäuresequenzierung ermittelt werden.

BEISPIEL 2

Entfernung des SPIRR-Peptids vom N-Terminus der in *S. cerevisiae* exprimierten *H. lanuginosa*-Lipase

[0307] Zu 4,5 mg der vorherigen gereinigten modifizierten („SPIRR“-enthaltenden), in *S. cerevisiae* exprimierten Lipase (in 1,8 ml 0,05 M NH₄HCO₃) wurden 50 mg Rindertrypsin (Sequenziertgrad) hinzugefügt und die Mischung wurde bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nach Inkubation wurde der tryptische Verdau durch Zugabe von mehr als 50 mg Sojabohnen-Trypsininhibitor gestoppt.

[0308] Die Entfernung des N-terminalen SPIRR-Peptidanhangs wurde mittels N-terminaler Aminosäuresequenzierung festgestellt, wobei die Fraktion, die SPIRR enthielt, von 75% auf 13% reduziert war (siehe Tabelle E2).

Tabelle E2

Behandlung	Fraktion enthaltend SPIRR-EVSQ...	Fraktion enthaltend EVSQ...
Unbehandelt (d.h. modifizierte Lipase)	75 %	25 %
Trypsin-Behandlung	13 %	87 %

[0309] Die milde Trypsinbehandlung verursachte keine internen Spaltungen in der modifizierten Lipase, da keine internen Aminosäuresequenzen mittels Aminosäuresequenzierung festgestellt wurden. Ebenso war die spezifische Aktivität der Trypsin-behandelten Lipase vergleichbar mit der spezifischen Aktivität der unbehandelten Lipase, was zeigt, dass die Trypsinbehandlung die Enzymaktivität im Standard-Assay nicht beeinflusste (siehe Tabelle E3).

Tabelle E3

Probe	A ₂₈₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀	Aktivität (LU/ml)	Spezifische Aktivität (LU/A ₂₈₀)
Unbehandelt (d.h. modifizierte Lipase)	2.5	1.8	9725	3890
Trypsin-behandelt	2.2	1.8	9163	4127

BEISPIEL 3

Herstellung der Wildtyp H. lanuginosa-Lipase in Aspergillus oryzae

[0310] Die Klonierung der Humicola lanuginosa-Lipase ist in EP 305,216 beschrieben, worin ebenfalls die Expression und Charakterisierung der Lipase in Aspergillus oryzae unter Verwendung des Expressionsplasmids p960 beschrieben ist. Das Plasmid umfasst das für die Humicola lanuginosa-Lipase kodierende Gen und die für den SPIRR-Peptidanhang kodierende DNA-Sequenz (welche ein Teil des Propeptid-kodierenden Teils des Lipasegens ist). Die Expression der Wildtyp-Lipase in A. oryzae (Stamm IFO 4177) wurde im Wesentlichen wie in WO 95/22615 beschrieben unter Verwendung eines Expressionsplasmid, das verglichen mit p960 leicht modifiziert ist – vgl. WO 95/22615 – durchgeführt.

Reinigung der in A. oryzae exprimierten Wildtyp-H. lanuginosa-Lipase

[0311] Der Fermentationsüberstand von Aspergillus oryzae IFO 4177 wurde zentrifugiert und Zelltrümmer wurden verworfen. Der Überstand wurde über einen 0,45 m Millipore-Filter gefiltert.

[0312] Anschließend wurde der Überstand mit 60% gesättigtem Ammoniumsulfat gefällt. Das Präzipitat wurde in Wasser gelöst und festes Ammoniumacetat wurde in einer Endkonzentration von 0,8 M hinzugegeben. Die Lösung wurde auf eine Butyl-Toyopearl-Säule gegeben, die mit 0,8 M Ammoniumacetat prä-äquilibriert worden war. Das gebundene Enzym wurde mit einem Gradienten mittels Wasser und 50% Ethanol als eluierende Wirkstoffe eluiert.

[0313] Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden dann gepoolt und die Leitfähigkeit wurde auf niedriger als 5 mSi eingestellt und der pH wird auf 7,5 eingestellt.

[0314] Die Pools mit der Aktivität wurden anschließend auf eine Anionenaustauschsäule (z. B. Highperformance Q Sepharose® gegeben, die mit 25 mM Trisacetat-Puffer, pH 7,5, prääquilibriert worden war. Die gebundene Aktivität wurde mit einem linearen Salzgradienten eluiert, wobei derselbe Puffer und 0,5 M Natriumchlorid verwendet wurden. Die Fraktionen mit hoher Lipaseaktivität wurden gepoolt.

BEISPIEL 4

Konstruktion des Stamm-Humicola lanuginosa-Lipase-Expressionsvektors und Expression in E. coli

[0315] pSX92 (siehe [Abb. 4](#)) wurde mit Hind III geschnitten, mittels Klenow-Polymerase mit glatten Enden versehen und dann mit Clal geschnitten. Das große Fragment wurde isoliert (A). pHLL (siehe EP 305,216, [Abb. 3](#) und [Abb. 4](#)) (umfassend die die Stammlipase kodierende DNA-Sequenz) wurde mit BamH1 geschnitten, mit glatten Enden versehen und mit XholI geschnitten. Das Fragment, das den reifen Teil des modifizierten Lipasegens enthielt, wurde isoliert (B).

[0316] A und B wurden mittels eines synthetischen Linkers (KFN 575/576), welcher für die letzten 5 Aminosäuren im Subtilisin-309-Signal, fusioniert mit den ersten vier Aminosäuren der reifen Lipase, kodiert, zusammen ligiert. Das letzte Nukleotid „A“ im oberen Strang veränderte die XholI-Stelle im reifen Lipasegen in eine Bgl II-Stelle.

Synthetischer Linker

KFN 575/576: 5' –CGATCGCATCGGCTGCTGAGGTCTCGCAA–3'
 3–TAGCGTAGCCGACGACTCCAGAGGCTTCTAG–5'

[0317] Das erhaltene Plasmid (pSX167) umfasste die für die reife Lipase kodierende DNA-Sequenz. pSX167 wurde mit Pme I und Bam H1 geschnitten und das Fragment, das die Subtilisin-309-Signalsequenz-Lipasefusion und den SS-Terminator enthielt, wurde isoliert (1769 bp). Dieses Fragment wurde in Hinc II-Bam H1 geschnittenen pUC19 ligiert, wodurch pSX578 entstand.

[0318] Die für die reife Lipase kodierende DNA bis zur Bst XI (von pSX167, 654 bp) wurde an die Achromobacter lyticus-Protease I-Signalsequenz (siehe [Abb. 3](#)) von Sph I mittels des PCR-Verfahrens fusioniert („Splitting by Overlap Extension“, Horton et al., (1989), Gene).

[0319] Das Plasmid (pSX578) (siehe [Abb. 5](#)) wurde mit Sph I und Bst XI geschnitten und die zuvor erwähnte PCR-DNA wurde eingefügt ([Abb. 6](#)). Das erhaltene Plasmid pSX581 (siehe [Abb. 7](#)) wurde in E. coli W3110 lacI^q transformiert. Nach Wachstum in Schüttelflaschen für 72 Stunden in LB-Medium enthaltend 0,4% Lactose bei 30°C produzierte der erhaltene Stamm nicht-glycosyierte Lipase mit derselben spezifischen Aktivität wie das normal glycosyierte Stamm-Lipase-Enzym.

BEISPIEL 5

Konstruktion der H. lanuginosa-Lipase mit Peptidanhang in E. coli

[0320] Das pSX581-Plasmid (siehe [Abb. 7](#)) wurde mit BgIII/HindIII verdaut und das Vektorfragment wurde aus einem Agarosegel mittels Standardverfahren gereinigt.

[0321] Eine PCR-Reaktion wurde mit den folgenden Primern mittels pSX581 als Matrize durchgeführt:

SPIRR-Primer; Primer 1 (SEQ ID NR. 3)

5' -AA CAG ATC TTG CGA GAC CTC TCT ACG TAT AGG GCT AGC GAG CGC
GGC GCT GAT CG-3' (55-mer)

PCR-Primer; Primer 2 (SEQ ID NR. 4)

GTTGTGTGGAATTGTGAGCGG (21-mer)

[0322] Das erhaltene 300 bp-Fragment wurde über Spin100-Säulen gereinigt und mit BgIII/HindIII verdaut und nochmals Spin 100-gereinigt. Das Fragment wurde an das obige Vektorfragment ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde pJSO215 genannt und zum Transformieren von E. coli W3110 lacI^q verwendet. Von einem Transformanden wurde eine Plasmidpräparation hergestellt und die DNA sequenziert, um die Einfügung des SPIRR-Peptidanhangs zu verifizieren.

BEISPIEL 6

Konstruktion und Expression des modifizierten lipolytischen Enzyms aus H. lanuginosa (HLv9s) in Aspergillus oryzae JaL125

[0323] Ein N-terminaler Peptidanhang wurde an das lipolytische Stammenzym aus H. lanuginosa (DSM 4109) mit der Aminosäure- bzw. DNA-Sequenz, die aus der EP 305 216 ersichtlich ist und zusätzlich die folgenden Mutationen D57G, N94K, D96L, Q249K in seinem reifen Teil (eingefügt durch herkömmliche zielgerichtete Mutagenese) in der DNA-Sequenz (EP 305 216) enthält, angehängt. Der Peptidanhang SPIRPRP wurde an den N-Terminus des Stammenzyms wie folgt angehängt:

Konstruktion von pIVI220

[0324] Das Plasmid wurde mit Hilfe des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Strategene gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert.

[0325] pHl296 wurde als Plasmidmatrize verwendet. Das Plasmid enthält das für das lipolytische H. lanuginosa-Enzym kodierende Gen mit den zuvor erwähnten Mutationen (D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R), das in pHd464 kloniert ist.

[0326] Primer Nr. 7258 wurde als Selektionsprimer verwendet.

7258: 5' p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3' (**SEQ ID NR. 79**)

(Damit wurde die im Ampicillin-Resistenzgen gefundene und zum Schneiden verwendete-ScaI-Stelle in eine MluI-Stelle umgewandelt).

[0327] Primer Nr. 7770 wurde als Selektionsprimer verwendet.

7770: 5' p tct agc cca gaa tac tgg atc aaa tc 3' (**SEQ ID NR. 80**)

(Verändert die in dem *H. lanuginosa*-Lipasegen gefundene Scal-Stelle, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern).

[0328] Primer Nr. 8479 wurde als Mutagenesepimer verwendet.

[0329] 8479: 5' p gcg tgg acg gcc ttg gct agc cct att cgt cct cga ccg gtc tcg cag gat ctg 3' (SEQ ID NR. 81) (ersetzt das Propeptid und das N-terminale E1 des *H. lanuginosa*-Stammenzyms (SIRRE durch SIRPRP)).

Konstruktion von pIVI245

[0330] Das Plasmid wurde mit Hilfe des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert.

[0331] pIVI220 wurde als Plasmidmatrize verwendet und Primer Nr. 7887 als Selektionsprimer (verändert die eingeführte MluI-Stelle, die im Ampicillin-Resistenzgen gefunden und zum Schneiden verwendet wurde, in eine Scal-Stelle).

7887: 5' p-gaa tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3' (**SEQ ID NR. 77**).

[0332] Primer Nr. 8932 wurde als Mutagenesepimer verwendet (8932: 5' p-g aac tgg ata gga aat ttg aag ttc ctg ttg aaa gaa ata aat gac 3' (SEQ ID NR. 78)) (dadurch Ändern des M97 zurück in L97 als Wildtyp, wobei die zwei Mutationen N94K und D96L nach wie vor beibehalten werden).

2 Konstruktion des *A. oryzae*-Expressionsplasmids pCaHj483

[0333] pCaHj483 ist in [Abb. 9](#) dargestellt. Es setzt sich aus den folgenden Fragmenten zusammen:

- a) Vektor pToC65 (WO 91/17243), geschnitten mit EcoRI und XbaI.
- b) Ein 2,7 kb XbaI-Fragment aus *A. nidulans*, welches das amdS-Gen trägt (C. M. Corrick et al., (1987), Gene 53, S. 63–71). Das amdS-Gen wird als Selektionsmarker für Transformationen in Pilzen verwendet. Das amdS-Gen wurde so modifiziert, dass die BamHI-Stelle, die üblicherweise in dem Gen vorhanden ist, zerstört wird. Dies erfolgte durch Einführung einer stillen Punktmutation mit Hilfe des Primers 3: AG-AAATCGGGTATCCTTCAG (SEQ ID NR. 6)
- c) Ein 0,6 kb EcoRI/BamHI-Fragment, das den *A. niger*-NA2-Promotor, fusioniert an ein 60 bp-DNA-Fragment der Sequenz, die für das 5'-untranslatierte Ende der mRNA des *A. nidulans* tpi-Gens kodiert, trägt. Der NA2-Promotor wurde aus dem Plasmid pNA2 (EP 383 779) isoliert und an die 60 bp-tpi-Sequenz mittels PCR fusioniert. Der Primer (Primer 4 SEQ ID NR. 14), der für die 60 bp-tpi-Sequenz kodiert, weist die folgende Sequenz auf:

5' –

GCTCCTCATGGTGGATCCCCAGTTGTATATAGAGGATTGAGGAAGGAAGAGAAGTG
TGGATAGAGGTAAATTGAGTTGGAAACTCCAAGCATGGCATCCTTGC-3'

- d) Ein 675 bp-XbaI-Fragment, das den *A. niger*-Glucoamylase-Transkriptionsterminator trägt. Das Fragment wurde aus dem Plasmid pICAMG/Term (EP 238 023) isoliert.

[0334] Die BamHI-Stelle des Fragments c) wurde über den pIC19R-Linker (BamHI bis XbaI) vor den Transkriptionsterminator auf Fragment d) mit der XbaI-Stelle verbunden.

Konstruktion des HLv9s-Expressionsplasmids pCaHj485

[0335] Das Plasmid pIVI245 wurde mit BamH I und Sal I geschnitten, und das erhaltene 904 bp-Fragment, das für das lipolytische Enzym aus HLv9s kodiert, wurde isoliert. pCaHj483 wurde mit BamH I und Sal I geschnitten, und das große Vektorfragment (6757) wurde an das HLv9s-Fragment ligiert. Die Ligationsmischung wurde zum Transformieren von *E. coli*-DH5 α -Zellen verwendet, und eine Transformante, die das erwartete Plasmid trägt, wurde isoliert. Das Plasmid wurde pCaHj485 genannt.

3. Transformation von pCaHi 485 in JaL125

[0336] Aspergillus oryzae JaL125 ist der in der alkalischen Protease deletierte Stamm Aspergillus oryzae IFO 4177, wurde mit pCaHj 485 mittels Selektion auf Acetamid, wie in dem Patent EP 0 531 372 beschrieben, transformiert. Die Transformanten wurden zweimal einer Sporen-Reisolierung unterzogen. Die Sporen der zweiten Reisolierung jeder Transformanten wurden verwendet, um 200 µl YPM (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Maltose) in 96-Well-Mikrotiterplatten anzuimpfen. Die YPM-Kulturen wurden für 4 Tage bei 34°C wachsen gelassen, und die besten Produzenten wurden mittels eines p-Nitrophenylbutyrat-Assays selektiert: Stammlösung: 18 µl p-Nitro-phenylbutyrat wurden in 1 ml Isopropanol gelöst.
Arbeitslösung: 0,1 ml der Stammlösung wurde mit 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM CaCl₂ gemischt.

[0337] Assay: 1 µl des YPM-Überstands wurde mit 200 µl der Arbeitslösung in 96-Well-Mikrotiterplatten gemischt, und die Farbentwicklung wurde bei 450 nm mittels eines ELISA-Readers gemessen.

[0338] Eine Transformante wurde für die Tankfermentation ausgewählt.

4 Tankfermentation von JaL 125/pCaHj 485

[0339] Die Fermentation erfolgte als eine Zufuhr-Chargen-Fermentation bei einer konstanten Mediumtemperatur von 34°C und einem Ausgangsvolumen von 1,2 Litern. Der Ausgangs-pH des Mediums wurde auf 6,5 eingestellt. Nachdem der pH auf 7,0 angestiegen war, wurde dieser Wert durch die Zugabe von 10% H₃PO₄ beibehalten. Die Menge an gelöstem Sauerstoff im Medium wurde durch Verändern der Rührgeschwindigkeit und durch Verwenden einer festen Belüftungsrate von 1,0 Liter Luft pro Liter Medium pro Minute kontrolliert. Die Nährstoff-Zufuhrrate wurde während der gesamten Zufuhr-Chargen-Phase auf einem konstanten Niveau gehalten.

[0340] Das Chargen-Medium enthielt Maltosesirup als Kohlenstoffquelle, Harnstoff und Hefeextrakt als Stickstoffquelle und eine Mischung von Spurenelementen und Salzen. Die Nährstoffe, die kontinuierlich während der Zufuhr-Chargen-Phase zugefügt wurden, enthielten Maltosesirup als Kohlenstoffquelle, während der Hefeextrakt und der Harnstoff zugefügt wurden, um eine ausreichende Versorgung mit Stickstoff sicherzustellen.

5 Reinigung des modifizierten lipolytischen Enzyms

- 1) Der Fermentationsüberstand wurde über einen Millipore-Filter Kat.-Nr. AP2504700 Filtertyp AP25 gefiltert.
- 2) Der Fermentationsüberstand wurde noch einmal über den Sterilfilter des Millipore-Membran-Typs GS 0,22 µm gefiltert.
- 3) Der Fermentationsüberstand wurde anschließend durch Zugabe von festem Ammoniumacetat auf 0,8 M Ammoniumacetat eingestellt.
- 4) Hydrophobe Chromatografie auf TSK gel Butyl-Toyopearl 650. Eine 50 ml-Säule wurde mit der Butyl-Toyopearl-Matrix gepackt. Die Säule wurde gewaschen und mit 0,8 M Ammoniumacetat äquilibriert. Ein Liter, mit Ammoniumacetat eingestellter Fermentationsüberstand wurde anschließend auf die Butyl-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,8 M Ammoniumacetat gewaschen, bis das gesamte nicht gebundene Material herausgewaschen worden war. Das gebundene Material wurde anschließend mit Wasser und 50% Ethanol schrittweise eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und mit Hilfe eines Standard-LU-Assays auf Lipaseaktivität analysiert. Die Lipaseaktivität-enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und verdünnt, um die Leitfähigkeit des Pools unter 4 mSi und den pH auf 8,5 einzustellen.
- 5) Anionenaustausch-Chromatographie auf High-Performance-Q-Sepharose (Pharmacia, Code-Nr. 17-1014-01). Eine 50 ml-Säule wurde gepackt und mit 50 mM Boratpuffer pH 8,5 gewaschen. Der Lipaseaktivität-enthaltende Pool wurde anschließend auf die High-Performance-Q-Sepharose-Säule aufgebracht. Ungebundenes Material wurde mit dem Boratpuffer pH 8,5 gewaschen. Die gebundene Aktivität wurde dann mit einem linearen Gradienten mittels Boratpuffer enthaltend 1 M Natriumchlorid pH 8,5 eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und auf Lipaseaktivität getestet. Die Lipaseaktivitätenthaltenden Fraktionen mit einem Verhältnis der UV-Absorption bei A280 und A260 größer als 1,7 wurden gepoolt.

BEISPIEL 7

3-Zyklus-Waschleistung der H. lanuginosa-Lipase mit einem Peptidanhang

[0341] Die Waschleistung der in EP 305 216 beschriebenen Humicola lanuginosa-Lipase und Varianten da-

von (d. h. erfindungsgemäße modifizierte lipolytische Enzyme) wurde an Hand des 3-Zyklus-Waschleistungs-
tests (beschrieben im Abschnitt Material und Methoden zuvor) an Baumwollstoffproben, die mit rot eingefärbtem Schweinefett beschmutzt waren, in einem Modellwaschsystem bei 30°C, bei einer konstanten Temperatur für 20 Minuten getestet. Die Tests wurden bei Lipasekonzentrationen von 0, 0,075, 0,188, 0,375, 0,75, 2,5 mg Enzymprotein pro Liter durchgeführt.

[0342] 4,2 g/l einer pulverförmigen Waschmittelzusammensetzung europäischen Typs (wie zuvor beschrieben) wurde in dem Test verwendet. Das Waschmittel enthielt vor der Zugabe der erfindungsgemäßen modifizierten Lipase keine Enzyme. Das Waschmittel wurde in etwa 18°dH hartem (Deutsche Härte) Wasser gelöst. Der pH der Waschflüssigkeit lag bei etwa 10. Sechs Stoffproben wurden in 100 ml der Waschflüssigkeit gewaschen. Im Anschluss an das Waschen wurden die Stoffproben unter fließendem Leitungswasser für 15 Minuten gespült und dann über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

[0343] 3 Waschzyklen mit Übernachtrocknung zwischen jedem Waschzyklus wurden durchgeführt.

[0344] Nach dem dritten Waschzyklus wurde die Leistung der erfindungsgemäßen modifizierten Lipase und der in *Aspergillus oryzae* exprimierten Stammlipase untersucht. Dies erfolgte durch Errechnen des Verbesserungsfaktors ($f_{improve}$), wie zuvor beschrieben.

[0345] Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle E4 unten dargestellt.

Tabelle E4

Lipase	N-terminales +/- SPIRR	3-Zyklen $f_{improve}$ (Verbesserungsfaktor)
Stammlipase (exprimiert in <i>A. oryzae</i>)	-	1,0 (Bezugswert)
Modifizierte Lipase (exprimiert in Hefe)	+	2,2
Modifizierte Lipase (exprimiert in Hefe) (Trypsin-behandelt)	-	0,6
Variante der Stammlipase (HLvls) (exprimiert in Hefe)	+	9,3
Variante der Stammlipase (HLvl) (exprimiert in <i>A. oryzae</i>)	-	1,8
Stammlipase (exprimiert in <i>E. coli</i>)	-	1,0
Modifizierte Lipase (exprimiert in <i>E. coli</i>) (+SPIRR)	+	2,0
Modifizierte Lipase (exprimiert in <i>Hansenula</i>)	+	2,1

[0346] In Tabelle E4 kann man sehen, dass der Peptidanhang (d. h. SPIRR), der an den N-Terminus der *Humicola lanuginosa*-Stammlipase angehängt worden ist, die Waschleistung mindestens verdoppelt.

BEISPIEL 8

Ein-Zyklus-Waschleistung von modifizierten *H. lanuginosa*-Lipasen mit einem Anhang

[0347] Der Ein-Zyklus-Waschleistungstest (zuvor beschrieben in dem Abschnitt Material und Methoden) wurde mit *Humicola lanuginosa*-Lipasevarianten der Tabelle M1 mit und ohne den SPIRR-Peptidanhang in 5 g/l an Enzym-inaktiviertem Ariel™ Futur (Procter & Gamble) durchgeführt. Die Tests wurden bei Lipasekonzentrationen von 0, 1250, 12500 LU/l durchgeführt.

[0348] Das Waschmittel wurde in etwa 18°dH hartem (Deutsche Härte) Wasser gelöst. Der pH der Waschflüssigkeit betrug etwa 10,3.

[0349] Die Mengen an Soxhlet-extrahiertem fettigem Material, die von dem Stoff entfernt wurden, sind in der Tabelle unten gezeigt. Die entsprechenden Lipasevarianten mit und ohne Peptidanhang sind paarweise aufgelistet.

Tabelle M5

Lipasevariante	+/- SPIRR	niedrige Dosierung	% Schweinefett entfernt	hohe Dosierung	% Schweinefett entfernt
HLv2s	SPIRR	1250 LU/l	12,5	12500 LU/l	nb
HLv2	-	1250 LU/l	1,7	12500 LU/l	6,0
HLv3s	SPIRR	1250 LU/l	8,9	12500 LU/l	33,9
HLv3	-	1250 LU/l	4,6	12500 LU/l	6,9
HLv4s	SPIRR	2500 LU/l	26,5	12500 LU/l	47,6
HLv4	-	0,25 mg/l	1	12500 LU/l	26
HLv1s	SPIRR	1250 LU/l	12,8	12500 LU/l	45
HLv1	-	1250 LU/l	1,8	12500 LU/l	7,2
HLv5s	SPIRR	1250 LU/l	11,4	12500 LU/l	36,5
HLv5	-	1250 LU/l	1	12500 LU/l	10,6
HLv8s	SPIRR	1250 LU/l	4,5	12500 LU/l	nb
HLv8	-	1250 LU/l	0	12500 LU/l	1

nb nicht bestimmt

[0350] Die obigen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Lipasevarianten mit Peptidanhang eine signifikant verbesserte Ein-Zyklus-Waschleistung aufweisen im Vergleich zu der entsprechenden Lipasevariante ohne einen Peptidanhang.

BEISPIEL 9

Zielgerichtete Mutagenese des N-terminalen Anhangs der H. lanuginosa-Lipase

[0351] Mutationen in der Hunicola lanuginosa-Lipase mit einem SPIRR-N-terminalen Anhang wurden mittels des in dem Abschnitt Material und Methoden zuvor beschriebenen Verfahrens durchgeführt.

[0352] Zuerst wurde das die Lipase kodierende Gen in das Plasmid pHD414 eingefügt. Die Scal-Stelle des Ampicillin-Gens von pHD414 wurde anschließend in eine MluI-Stelle umgewandelt. Anschließend wurde die einzige in dem Lipase-Gen vorhandene Scal-Stelle entfernt.

[0353] Die gewünschte Mutation (d. h. SPIRPRP) wurde in den N-Terminus des Lipase-Gens durch Anhängen des folgenden Oligos umfassend die gewünschte Mutation eingeführt:

Oligo 8479 (SEQ ID NR. 5)

5' -P GCG TGG ACG GCC TTG GCT AGC CCT ATT CGT CCT CGA CCG GTC
TCG CAG GAT CTG-3'

[0354] Dadurch entstand ein H. lanuginosa-Lipase-Gen mit einem N-terminalen SPIRPRP-Peptidanhang.

BEISPIEL 10

Konstruktion N-terminaler Anhänge durch Zufallsmutagenese

[0355] An dem Teil der DNA-Sequenz, die für den N-terminalen Anhang SPIRPRP, angehängt an den ersten Aminosäurerest des reifen, lipolytischen H. lanuginosa-Enzyms (erhältlich von DSM 4109) kodiert und die die folgenden weiteren Mutationen: D57G + N94K + D96L + L97M + Q249R in ihrem reifen Teil enthält, wurde eine Zufallsmutagenese-Behandlung durchgeführt. Die Mutationen im reifen Teil des lipolytischen Stammenzymes wurden anhand PCR-vermittelter zielgerichteter Mutagenese durchgeführt, wobei geeignete Primersequenzen mittels der in WO 95/26215 beschriebenen Verfahren verwendet wurden. Der Peptidanhang SPIRPRP wurde wie in Beispiel 9 beschrieben angehängt.

[0356] Das Schema des Nukleotid-„Doping“ der SPIRPRP-Kodons lautete wie folgt:

Oligo 1: 5'-GCG TGG ACG GCC TTG TGCC 86(T/A) 66(A/T) 58(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) GAG GTC TCG CAG GAT CTG-3' (57-mer) (SEQ ID NR. 82), wobei sich die Nummern darauf beziehen welche der folgenden Flaschen verwendet werden sollen.

Flasche 5: 80% A; 6,66% C; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 6: 80% C; 6,66% A; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 7: 80% G; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% T.

Flasche 8: 80% T; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% G.

[0357] Ein Zweischritt-PCR-Reaktionsprotokoll wurde verwendet: Der erste Schritt wurde mit dem obigen Primer als 5'-Primer und mit dem Primer 2056 (5'gca cgt aat gtt tgt acc 3') als 3'-Primer durchgeführt, wobei pHl296 als Plasmidmatrize verwendet wurde. Das Produkt der ersten PCR-Runde wurde in einer neuen PCR mit 4699 (5'cggt tac ccg ggg atc cac 3') als 5'-Primer (um die BamHI-Stelle und den ersten Teil der kodierenden Sequenz einzuführen) und mit dem PCR-Produkt als 3'-Primer unter Verwendung derselben Matrize verwendet. Das entstehende Produkt wurde auf einer Spin-100 (von Clontech Lab., Inc.) gereinigt und mit BamHI und Pvull geschnitten. Das entstehende DNA-Fragment wurde mit Spin-X (Costar) aus einem Agarosegel gereinigt und in den Hefe-Expressionsvektor pJSO37, der das Gen für das lipolytische H. lanuginosa-Enzym aus pHl296, kloniert als ein BamHI-XbaI-Fragment; geschnitten mit BamHI und Pvull, enthält, ligiert. Die entstehende DNA wurde unter Verwendung des herkömmlichen Verfahrens in DH10/DH12-E. coli-Zellen (GibcoBRG Lifetechnologies) elektrotransformiert.

[0358] Nach Transformation in E. coli und Amplifizierung wurde das Plasmid gereinigt und in S. cerevisiae YNG 318 transformiert. Die erhaltenen S. cerevisiae-Zellen wurden auf gute Leistung hin in dem alternativen Lipase-Filter-Assay, enthaltend ein Waschmittel (3 g/l an PCS), durchgemustert. Die positiven wurden sequenziert und enthielten erwiesenermaßen die Peptidanhänge, die aus Tabelle 1 im Abschnitt Material und Methoden ersichtlich sind (identifiziert als HLv10s1-10).

[0359] Die Ein-Zyklus-Waschleistung von jedem der HL10s1-6 wurde wie in dem Abschnitt Material und Methoden zuvor beschrieben (Ein-Zyklus-Waschleistung) bei einer Temperatur von 30°C und unter Verwendung von 5 g/l an inaktiviertem Ariel Futur als Waschmittel getestet. Die Mengen an fettigem Material, das von jedem der modifizierten Enzyme entfernt wurde, sind unten gezeigt:

Lipasevariante	Niedrige Dosierung	% Schweinefett entfernt	Hohe Dosierung	% Schweinefett entfernt
HLv10s1	1250 LU/I	26	12500 LU/I	54
HLv10s2	1250 LU/I	22	12500 LU/I	53
HLv10s3	1250 LU/I	34	12500 LU/I	55
HLv10s4	1250 LU/I	33	12500 LU/I	55
HLv10s5	1250 LU/I	23	12500 LU/I	47
HLv10s6	1250 LU/I	30	12500 LU/I	53
HLv10s11	1250 LU/I	5	12500 LU/I	27
HLv10s12	-	-	12500 LU/I	15,8

HLv11s	1250 LU/I	21	12500 LU/I	51
--------	-----------	----	------------	----

[0360] Als Tendenz war zu erkennen, dass die Varianten mit der besten Leistung in dem N-terminalen Anhang mehr positiv geladene Aminosäuren aufwiesen.

[0361] Analog dazu wurde eine Zufallsmutagenese an dem N-terminalen Anhang RP RP RP RP, der an die *H. lanuginosa*-Lipasevarianten E1*, D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R plus weitere Varianten angehängt worden war, durchgeführt. Das Schema für das Nukleotid-„Doping“ der RP RP RP RP-Kodons lautete wie folgt:

Oligo 2: 5' -GTC TCT GCG TGG ACG GCG GCG CCA CCT CCA 67 (T/A)
 66 (T/A) 575 66 (T/A) 67 (T/A) 66 (T/A) 575 66 (T/A)
 (6/7) (7/8) (C/G) 57 (C/G) C57 (5/7) 5 (C/G) CTG TTT AAC CAG TTC
AAT CTC-3' (93-mer) (SEQ ID NR. 82)

Flasche 5: 80% A; 6,66% C; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 6: 80% C; 6,66% A; 6,66% G og 6,66% T.

Flasche 7: 80% G; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% T.

Flasche 8: 80% T; 6,66% A; 6,66% C og 6,66% G.

[0362] APPP wird in den N-Terminus von Zufalls-mutagenisiertem RPRPRPRP und vor das Signalpeptid angehängt, um den N-terminalen Anhang gegen proteolytischen Abbau zu schützen. Dies kann auch nicht erforderlich sein. E1 wurde deletiert, um eine negativ geladene Aminosäure zu entfernen. Die Aminosäuren an den Positionen 2 bis 5 der reifen *H. lanuginosa*-Lipase-Sequenz wurden ebenfalls mutagenisiert, um verbesserte Mutanten in diesem nicht-strukturellen Teil der Lipase aufzufinden. Ansonsten erfolgt das Verfahren wie oben für die Zufallsmutagenese von SPIRPRP festgehalten. Die folgenden N-terminalen Peptidanhänge wurden erhalten:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser (APPPRPRLLPIS) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzliche Mutation D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen, Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro (APPPTRQRQSP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2L, S3T und D5V in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro (APPPTIPRSSP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2L, S3R und D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro (APPPRPRPRPRP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2G und D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser (APPPRTRPRPRS) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2GL; S3T, Q4P und D5E in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro (APPPKASPRQRP) (zusätzlich zu dem deletierten E1-Rest trägt diese Variante die zusätzlichen Mutationen V2GL, D5Q und L6M in ihrem nicht-strukturellen N-terminalen Teil des reifen Enzyms).

BEISPIEL 11

Konstruktion von *Ps cepacia*-Lipasevarianten umfassend Peptidanhänge

[0363] Ein Lipasegen aus *Pseudomonas cepacia* SB10, DSM 3959, beschrieben in WO 89/01032 (von Novo Nordisk A/S), kürzlich neu klassifiziert als *Burkholderia cepacia*, wurde kloniert und die Temperatur-induzierbare Expression der Lipase in *Escherichia coli* wurde unter Verwendung des Plasmids pAHE2 erhalten. Der Stamm SJ1503 ist *E. coli* JA221, der pAHE2 enthält.

[0364] Zur Konstruktion von Vektoren, die variante Lipasen mit N-terminalen Verlängerungen exprimieren, machte man sich zwei einzeln vorkommende, in pAHE2 vorhandene Restriktionsschnittstellen zu Nutze, eine einzeln vorkommende BstXI-Stelle; etwa 9 Kodons in der für das Lipase-Signalpeptid kodierenden Sequenz, und eine einzeln vorkommende MluI-Stelle, etwa 7 Kodons strangabwärts von der prozessierenden Stelle, d.

h. am Anfang der Sequenz für die reife Lipase.

[0365] Die PCR-Primer wurden so gestaltet, dass sie eine Amplifizierung über diese Region erlauben, wobei die stromaufwärts von der MluI-Stelle lesenden Primer Sequenzen umfassen, die für die N-terminalen Verlängerungen kodieren. Alle Primer hatten an ihren äußersten 5'-Enden EcoRI-Stellen eingebaut.

[0366] Die folgenden Sequenzen wurden ausgewählt, um die N-terminalen Verlängerungen zu kodieren:

- 1) S P I R P R P
AGC CCG ATC CGC CCG CGC CCG
- 2) T A I R P R K
ACG GCG ATC CGC CCG CGC AAG
- 3) S T R R P R P
TCG ACG CGC CGT CCG CGC CCG
- 4) G P I R P R P
GGC CCG ATC CGC CCG CGC CCG
- 5) S P I R R
AGC CCG ATC CGC CGG
- 6) R P R P R P R P
CGC CCG CGT CCC AGG CCG CGT CCG

[0367] Die folgenden Primer wurden verwendet:

LWN9476 (SEQ ID NR. 7) (stromabwärts von BstXI lesend)

5' -CGAATT CGAT GCGTT CCAGGGT GGT GGCAGG -3'

LWN9472 (SEQ ID NR. 8) (stromaufwärts von MluI lesend, gestaltet zum Einbau von SPIRPRP)

5' -
CGAATT CACGCGT CGCC CGCG TAGCCAGCGGC **CGGGCGCGGGCGGATCGGGCTGGGCGCGGT**
GCCGCCATTGCC -3'

LWN9473 (SEQ ID NR. 9) (stromaufwärts von MluI lesend, gestaltet zum Einbau von TAIRPRK)

5' -
GAATT CACGCGT CGCC CGCG TAGCCAGCGGC **CTT GCGCGGGCGCATCGCCGTGGGCGCGGTG**
GCCGCCATTGCC -3'

LWN9471 (SEQ ID NR. 10) (stromaufwärts von MluI lesend, gestaltet zum Einbau von STRRPRP)

5' -
CGAATT CACGCGT CGCC CGCG TAGCCAGCGGC **CGGGCGCGGACGGCGCGTCGAGGGCGCGGT**
GCCGCCATTGCC -3'

LWN9474 (SEQ ID NR. 11) (stromaufwärts von Mlul lesend, gestaltet zum Einbau von GPIRPRP)

5' -

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGC~~GGCCGGCGCGGGCGGATCGGGCCGGCGCGGT~~
GGCCGCCATTGCC-3'

LWN 9475 (SEQ ID NR. 12) (stromaufwärts von Mlul lesend, gestaltet zum Einbau von SPIRR)

5' -

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGC~~GGCCGGCGGATCGGGCTGGCGCGGTGGCCGC~~
CATTGCC-3'

LWN 9470 (SEQ ID NR. 13) (stromaufwärts von Mlul lesend, gestaltet zum Einbau von RPRPRPRP)

5' -

CGAATTCACGCGTCGCCGCGTAGCCAGC~~GGCCGGCTGGACGCGGGCGGGCGC~~
GGTGGCCGCCATTGCC-3'

[0368] Für die PCR-Amplifizierungen wurde der Primer LWN9476 in Kombination mit jedem der Primer LWN9470 bis LWN9475, mit pAHE2 als Matrize, verwendet. Die Annealing-Temperatur betrug 70°C und die Reaktionen wurden in Anwesenheit von 2% DMSO durchgeführt; ansonsten wurden Standardbedingungen und TaqTM-Polymerase verwendet.

[0369] Die amplifizierten Fragmente wurden aus 2%igen Agarosegel gereinigt, mit BstXI und Mlul geschnitten, an das aus pAHE2 erhaltene 7,1 kb BstXI-Mlul-Fragment ligiert, und die Ligationsmischung wurde verwendet, um E. coli SJ6 zur Ampicillin-Resistenz mittels Elektroporation zu transformieren. Die Transformanten wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (200 mg/ml) bei 30°C ausplattiert.

[0370] Mittels Replica-Plating wurden Kolonien auf Lipase-Durchmusterungsplatten transferiert (enthaltend, pro Liter an Agar, 20 ml an Sigma Lipase Substrat (Katalog-Nr. 800-1) und 4 ml einer 1%igen Brilliant-Green-Lösung (Merck, Art.-Nr. 1.01310)), die bei 42°C inkubiert wurden. Aus jeder Transformationsmischung entwickelten sich schließlich um mehrere Kolonien grüne Lichthöfe, die auf Lipaseaktivität hinwiesen.

[0371] Lipase-positive Kolonien wurden reisoliert, die Plasmide extrahiert, und die BstXI-Mlul-Region-DNA sequenziert. Die folgenden Stämme wurden verwahrt:

SJ3606 (SJ6/pSJ3606); enthält den SPIRPRP-kodierenden Anhang, und hat darüber hinaus das zweite Kodon im nativen, reifen Enzym von einem Alanin in ein Valin geändert.

SJ3608 (SJ6/pSJ3608); enthält einen SPRP-kodierenden Anhang (DNA-Sequenz der Einfügung TCT CCG CGC CCG). Erhalten als Variante bei den Versuchen, einen STRRPRP-kodierenden Anhang herzustellen.

SJ3708 (SJ6/pSJ3708); enthält den SPIRR-kodierenden Anhang.

SJ3717 (SJ6/pSJ3717); enthält den SPIRPRP-kodierenden Anhang.

SJ3718 (SJ6/pSJ3718); enthält den SPIRPRP-kodierenden Anhang.

SJ3719 (SJ6/pSJ3719); enthält den TAIRPRK-kodierenden Anhang.

SJ3720 (SJ6/pSJ3720); enthält den STRRPRP-kodierenden Anhang.

SJ3721 (SJ6/pSJ3721); enthält den GPIRPRP-kodierenden Anhang.

BEISPIEL 12

Schüttelflaschen-Fermentation von Ps. cepacia-Lipasevarianten

[0372] Die anhand Beispiel 11 bereitgestellten Kulturen wurden auf TY-Ampicillinplatten (pH 7) gezüchtet und zum Animpfen von Schüttelflaschen enthaltend 100 ml doppelt konzentriertes TY-Medium mit Ampicillin (100 mg/ml) pH 7 verwendet. Das angeimpfte Material wurde durch Ausstreichen auf Indikatorplatten auf Lipase-Produktivität getestet (wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben): Alle Zellen waren erwiesenermaßen Lipase-positiv (die Platten wurden bei 30°C für 2 Tage inkubiert, dann für 1 Tag auf 40°C transferiert).

[0373] Die Schüttelflaschen wurden inkubiert, indem sie bei 275 Upm bei 30°C für 6 Stunden geschüttelt wurden, bis die Kulturen die optischen Dichten (578 nm) von 2,8 bis 5,3 erreichten. Die Kulturen wurden anschlie-

ßend für weitere 17 Stunden auf 40°C transferiert.

Überprüfung der Lipase-Herstellung in einer *Ps. cepacia*-Kultur

[0374] Die Kultur wurde geerntet, zentrifugiert (20 Minuten bei 900 Upm), der Überstand verworfen und das Pellet in NaCl (0,5 ml 0,9% NaCl) resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (2 Minuten Non-Stopp; auf Eis). Das Ultraschall-behandelte Pellet wurde zur Messung der Lipase-Einheiten (LU) verwendet, wobei die Titrationsmethode mit Tributyrat als Substrat bei pH 7,0 verwendet wurde.

[0375] Alle 8 Stämme außer 1 (SJ3720) zeigten Lipase-Aktivität, wie in der Tabelle unten gezeigt.

Stamm	Zeit (h)	OD = 578	AmpR: Zelle #	OOBGA mp: Zelle #	LU/ml
SJ1503wt	t0=0 h	0,010			
	t1=6 h	2,89	7	7	
	t2=17 h	7,45	0	0	230,5
SJ3606	t0=0 h	0,006			
	t1=6 h	5,24	43	43	
	t2=17 h	9,15	0	0	244,95
SJ3608	t0=0 h	0,015			
	t1=6 h	4,40	67	65	
	t2=17 h	9,2	0	0	298,6
SJ 3708	t0=0 h	0,028			
	t1=6 h	4,69	32	32	
	t2=17 h	11,05	0	0	142,2
SJ3717	t0=0 h	0,007			
	t1=6 h	4,03	28	28	
	t2=17 h	11,2	15	15	163,8
SJ3719	t0=0 h	0,001			
	t1=6 h	4,49	13	13	
	t2=17 h	11,7	0	0	33,55
SJ3720	t0=0 h	0,004			
	t1=6 h	3,70	20	20	
	t2=17 h	10,5	0	0	0
SJ3721	t0=0 h	0,016			
	t1=6 h	4,20	12	12	
	t2=17 h	11,35	0	0	125,75

BEISPIEL 13

Charakterisierung der *Ps. cepacia*-Lipasevarianten

[0376] Die von den in Beispiel 11 beschriebenen Stämmen produzierten Lipasen wurden hinsichtlich ihrer Aktivität in Anwesenheit eines Waschmittels getestet, wobei der PCS-Plattendurchmusterungsassay zur Anwendung kam. Ein Probenset wurde aus den Stämmen SJ1503, SJ3606 und SJ3608 hergestellt, welche wie zuvor beschrieben vermehrt worden waren, die Zellen wurden geerntet und mittels Ultraschall lysiert, um die Lipase freizusetzen. 15 ml-Proben, enthaltend etwa 230 LU/ml, wurden in die Vertiefungen in Durchmusterungsplatten entweder ohne Waschmittel oder enthaltend 1,5 bzw. 3,5 Gramm/Liter an Waschmittel hineingegeben. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und der Durchmesser der grünen Zone, die sich um die Vertiefungen gebildet hatte, wurde gemessen. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:

	STAMM		
	SJ1503	SJ3606	SJ3608
WASCHMITTEL			
Keines	17 mm	15 mm	16 mm
1,5 Gramm/l	7 mm	13 mm	10 mm
3,5 Gramm/l	0 mm	8 mm	6 mm

[0377] Bei höheren Waschmittelkonzentrationen konnten keine grünen Zonen beobachtet werden.

[0378] Ein weiteres Probenset wurde angefertigt, indem die Stämme SJ1503, SJ3708 und SJ3717-SJ3721 auf Zelluloseacetat-Filter (jeder Filter enthaltend alle 7 Stämme) ausplattiert wurden, die Filter auf LB-Platten mit Ampicillin (200 mg/ml) bei 37°C über Nacht platziert wurden, diese Platten mit den Filtern anschließend bei 42°C für 5 Stunden inkubiert wurden, wonach die Filter auf Durchmusterungsplatten (mit der Kolonie-Seite nach oben) übertragen wurden, welche über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

[0379] Ausgeprägte grüne Zonen entwickelten sich unter allen Kolonien auf der Platte ohne Waschmittel; SJ3720 produzierte eine signifikant kleinere Zone als der Rest, was höchstwahrscheinlich auf eine reduzierte Expression der Lipase zurückzuführen ist.

[0380] Grüne Zonen wurden ebenfalls beobachtet bei allen Kolonien auf der Platte, die 1,5 Gramm/l an Waschmittel enthielten. Jedoch war die von SJ1503 produzierte Zone, welcher die native, unmodifizierte Lipase herstellt, signifikant reduziert im Vergleich mit den Zonen, die von den anderen Stämmen produziert wurden.

[0381] Auf der Platte mit 3,5 Gramm/Liter Waschmittel entwickelte sich keine grüne Färbung von SJ1503, wohingegen eine grünliche Färbung noch wahrnehmbar war aus einigen Stämmen, die die modifizierten *B. cepacia*-Lipasen exprimierten, insbesondere SJ3717, SJ3718 und SJ3721.

[0382] Folglich ermöglicht die Modifizierung des *B. cepacia*-Lipasegens für N-terminale Anhänge an die native, reife Lipase, wie solche zuvor beschriebenen, zu kodieren, die Herstellung von Lipasen, welche in Anwesenheit von Waschmittel eine verbesserte Aktivität verglichen mit der nativen Lipase aufweisen.

BEISPIEL 14

Fermentation von SJ1503 und SJ3717 in 10-Liter-Tanks

[0383] Das für Schüttelflaschen beschriebene Verfahren wurde zur Fermentation im 10-Liter-Maßstab verwendet. Das verwendete Medium war Bacto Trypton 400 g, Bacto Hefeextrakt 200 g, Glucose × 2 H₂O 500 g, Ampicillin 1 g, Pluronic 1 ml. Der pH wurde konstant bei pH 7,1 gehalten; die Temperatur betrug 30°C für 7 Stunden, dann eingestellt auf 40°C. Die Zellen wurden nach 16 Stunden mittels Zentrifugation geerntet und die Zellen wurden unter Verwendung eines Hochdruck-Homogenizers geöffnet (800 bar).

Reinigung der in *E. coli* exprimierten *B. cepacia*-Lipase

[0384] *E. coli*-Zellen aus 10 Liter Fermentationsmedium von SJ1503 und SJ3711 wurden zentrifugiert und der

Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden unter Verwendung eines, Rannie-Homogenizers unter Druck von 800 bar geöffnet. Die homogenisierten Zellen wurden bei $305 \times g$ für 60 Minuten zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde abgenommen.

1. Salzfällung

[0385] Der Aktivität-enthaltende Überstand wurde unter Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 35% bei Raumtemperatur präzipitiert. Die Präzipitation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend wurde zentrifugiert bei $350 \times g$ für 1 Stunde. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Aktivität-enthaltende Präzipitat wurde in 30% Ethanol gelöst, um eine hydrophobe Bindung der Lipase-Aktivität an unlösliches Material zu verhindern.

[0386] Um das unlösliche Material von dem in 30% Ethanol gelösten Material loszuwerden, wurde die Lösung zentrifugiert. Die Lipase-Aktivität wurde als Überstand gewonnen und unlösliches Material wurde verworfen. Der Aktivität-enthaltende Überstand wurde eingeengt und mittels Ultrafiltration unter Verwendung einer Amicon-Memberan mit einem Ausschluss von 10 kDa gegen 25 mM Tris-Acetat pH 8 dialysiert. Die eingeengte Probe wurde anschließend fünffach verdünnt, um jegliches rückständiges Ethanol in dem Aktivität-enthaltenden Überstand zu verringern.

2. Hydrophobe Chromatographie

[0387] Obige Aktivität-enthaltende Probe wurde durch Zugabe von festem Ammoniumacetat auf 0,8 M Ammoniumacetat eingestellt. Eine 50 ml-Toyopearl-Butyl-Säule (Tosoh Hass, Japan) wurde gepackt und mit 0,8 M Ammoniumacetat äquilibriert. Die Lipaseaktivitätenthaltenden Proben des vorherigen Schritts wurden anschließend auf 0,8 M Ammoniumacetat eingestellt und auf die Toyopearl-Butyl-Säule aufgebracht. Die gesamte Aktivität bindet an das Trägermaterial. Ungebundenes Material wurde mit 0,8 M Ammoniumacetat ausgewaschen, bis die UV-Absorption des Durchflusses unter 0,05 bei 280 nm lag. Die gebundene Aktivität wurde mit 25 mM Trisacetat-Puffer enthaltend 50% Ethanol eluiert. Lipaseaktivität-enthaltende Fraktionen wurden gepoolt und gegen 25 mM Trisacetat-Puffer pH 8,5 dialysiert.

3. Anionenaustauschchromatographie

[0388] Eine 50 ml-Säule wurde mit Anionenaustausch-High-Performance-Q-Sepharose (Pharmacia) gepackt. Die Säule wurde gewaschen und mit 25 mM Trisacetat-Puffer pH 8,5 äquilibriert. Die dialysierte Probe wurde anschließend auf die Säule aufgebracht. Ungebundene Aktivität wurde unter Verwendung des Tris-Puffers ausgewaschen. Die gebundene Aktivität wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in dem Tris-Puffer pH 8 eluiert. Die Durchflussrate betrug 2 ml/min und das Gesamtvolumen an Puffer, das für die Elution verwendet wurde, betrug 10 Säulenvolumina. Lipaseaktivitätenthaltende Fraktionen wurden gepoolt und auf Leistung in einem PCS-Platten-Assay getestet.

[0389] Genauer gesagt wurden 3LU von jeder der gewonnenen modifizierten Lipasen in die Löcher auf einer PCS-Platte hineingegeben (vgl. Beispiel 15 weiter unten) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

STAMM

	SJ1503	SJ3717
--	--------	--------

WASCHMITTEL

Keines	17 mm	13 mm
0,5 Gramm/l	6 mm	10 mm
1,0 Gramm/l	4 mm	7 mm

[0390] Folglich kann gesehen werden, dass die Anwesenheit eines Peptidanhangs in einer signifikant höheren erhaltenen Waschleistung resultiert.

BEISPIEL 15

Konstruktion modifizierter, lipolytischer H. insolens-Enzyme mit einem N-terminalen Peptidanhang

[0391] Das für das lipolytische Enzym kodierende Gen wurde von Humicola insolens DSM 1800 im Wesentlichen wie in WO 96/13580 beschrieben isoliert. Drei verschiedene Peptidanhänge wurden an den N-Terminus des reifen Enzyms unter Verwendung des Plasmids pIVI1303 als Plasmidmatrize gehängt.

[0392] Die Konstruktion von pIVI1303 (kodierend für eine lipolytische Enzymvariante aus H. insolens, welche eine Mutation in dem Bereich Base 304–369 strangabwärts vom ATG ohne Veränderungen in der Aminosäuresequenz enthält, und Entfernen einer möglichen sekundären DNA-Struktur, welche ansonsten die Verwendung des Chameleon-Double-Stranded-Kit behindert hätte.)

[0393] Das Plasmid wurde unter Verwendung des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert.

[0394] pIVI296 wurde als Plasmidmatrize verwendet und Primer Nr. 7258 als Selektionsprimer.

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

(Folglich Ändern der in dem Ampicillin-Resistenzgen gefundenen und zum Schneiden verwendeten Scal-Stelle in eine MluI-Stelle).

[0395] Primer Nr. 9349 wurde als Mutagenesepriimer verwendet:

9349: 5' p gag tcc cac atc cga aac atc tgg ata caa gga gta gga
gga cct tac gac gcc gcg 3'

1. Variante: HILv4s enthaltend die Mutation: PPRRPR (anstelle von PELVAR in dem nativen H. insolens-Propeptid)

Konstruktion von pIVI335

[0396] Das Plasmid wurde unter Verwendung des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert. pIVI303 wurde als Plasmidmatrize verwendet.

[0397] Primer Nr. 7887 wurde als Selektionspriimer verwendet:

7887: 5' p-gga tga ctt ggt tga gta ctc acc agt cac 3'

(Ändern der eingeführten im Ampicillin-Resistenzgen gefundenen und zum Schneiden verwendeten MluI-Stelle in eine Scal-Stelle).

[0398] Primer Nr. 19473 wurde als Mutagenesepriimer verwendet:

19473: 5' p ac cat acc ccg gcc gct cct cct agg cgt cct cg^g cag
ctg gga gcc 3'

2. Variante: HILv1s enthaltend die Mutation SPPRRP (anstelle von ELVARQ in dem nativen H. insolens-Propeptid)

Konstruktion von pIVI359

[0399] Das Plasmid wurde unter Verwendung des Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert. pIVI303 wurde als Plas-

midmatrize verwendet. Primer Nr. 7887 (vgl. oben) wurde als Selektionsprimer verwendet. Primer Nr. 21992 wurde als Mutagenesepriimer verwendet:

21992: 5' p ac cat acc ccg gcc gct cct agc cct ccg cg_g cg_g ccg
ctg gga gcc atc gag aac ggc 3'

3. Variante: HILv2s enthaltend die Mutation SPPRP (anstelle von ELVARQ in dem nativen H. insolens-Propeptid)

Konstruktion von pIVI360

[0400] Das Plasmid wurde unter Verwendung des Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert. pIVI303 wurde als Plasmidmatrize verwendet, und Primer Nr. 7887 als Selektionsprimer. Der folgende Primer wurde als Selektionsprimer verwendet:

5' p ac cat acc ccg gcc gct cct agc cct ccg cg_g cg_g ccg ctg
gga gcc atc gag aac ggc 3'

4. Variante: HILv3s enthaltend die Mutation SPIRK (anstelle von ELVARQ in dem nativen H. insolens-Propeptid)

Konstruktion von pIVI361

[0401] Das Plasmid wurde unter Verwendung des Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert. pIVI303 wurde als Plasmidmatrize verwendet, und Primer Nr. 7887 als Selektionsprimer.

[0402] Primer Nr. 21994 wurde als Mutagenesepriimer verwendet:

21994: 5' p ac cat acc ccg gcc gct cct agc cct ata cgt aag ctg
gga gcc atc gag aac ggc 3'

5. Konstruktion eines A. oryzae-Expressionsvektors

pIVI296

[0403] pA2L79 ist in Beispiel 2 von WO 96/13580 beschrieben. Das Plasmid enthält die cDNA-Sequenz des lipolytischen H. insolens-Enzyms, die in das A. oryzae-Expressionsplasmid pD414 eingefügt ist. PA2L79 wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und Xhol geschnitten. Das Fragment, das die für das lipolytische Enzym kodierende cDNA-Sequenz (1088 bp) enthielt, wurde aus einem Agarosegel gereinigt. pHD414 wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und Xhol geschnitten und der Vektor wurde aus einem Agarosegel gereinigt.

[0404] Das gereinigte Vektorfragment (pHD414) und das Lipase-enthaltende Fragment wurden ligiert, woraus pIVI296 entstand.

[0405] Jeder der obigen Expressionsvektoren wurde in A. oryzae IFO 4177 unter Verwendung des allgemeinen Transformationsverfahrens, wie in dem Abschnitt Material und Methoden zuvor offenbart, transformiert. Eine Transformante jedes Typs wurde jeweils als HILv1-4s isoliert. Die H. insolens-Transformanten wurden für 3 Tage in Schüttelflaschen bei 30°C in 500 ml YPM-Medium (10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, 20 g/l Maltose) gezüchtet.

[0406] Der Fermentationsüberstand wurde, wie für die lipolytischen, modifizierten H. lanuginosa-Enzyme beschrieben; gefiltert.

[0407] Reinigungsschritt 1:- 1 Liter des Fermentationsüberstands wurde auf pH 8 eingestellt und verdünnt, sodass die Leitfähigkeit des Überstands unter 4 mSi lag.

[0408] Schritt 1: Chargenbehandlung des Fermentationsüberstands auf einem Anionenaustauscher DEAE A50.

[0409] DEAE-Sephadex A50 von Pharmacia wurde gewaschen und mit 25 mM Trisacetat-Puffer pH 8 unter Verwendung eines „Scintered“-Glastrichters mit geeigneter Porengröße äquilibriert. Der Fermentationsüberstand wurde anschließend unter Verwendung des „Scintered“-Glastrichters auf die DEAE-Sephadex A50 aufgebracht. Die lipolytische Aktivität von *H. insolens* band nicht an den Anionenaustauscher bei pH 8 und sammelte sich als Durchfluss von der DEAE-Sephadex A50.

[0410] Schritt 2:- Der pH des Durchflusses von der DEAE-Sephadex wurde durch Zugabe verdünnter Essigsäure auf 4,5 eingestellt. Die Leitfähigkeit wurde ebenfalls durch Zugabe von Wasser auf unter 4 mSi eingestellt.

[0411] Kationenaustausch-Chromatographie auf SP-Sepharose. Eine 50 ml-Säule wurde mit SP-Sepharose Fast Flow Code-Nr. 17-0729-01 Pharmacia gepackt. Die Säule wurde anschließend gewaschen und mit 25 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 äquilibriert.

[0412] Die Probe mit der lipolytischen Aktivität wurde auf pH 4,5 und auf eine Leitfähigkeit von unter 4 mSi eingestellt und anschließend auf die SP-Sepharose-Säule aufgebracht. Das ungebundene Material wurde unter Verwendung von 25 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 gewaschen. Die an die SP-Sepharose gebundene lipolytische Aktivität wurde anschließend mit einem linearen Salzgradienten mit 25 mM Acetat-Puffer pH 4,5, enthaltend 1 M Natriumchlorid, eluiert. Die Fraktionen mit der lipolytischen Aktivität und bei denen das Verhältnis der UV-Absorption bei A280/A260 höher war als 1,8, wurden gepoolt. Die Reinheit der Probe wurde auf SDS-PAGE überprüft.

Verifizierung des N-terminalen Peptidanhangs

[0413] Die N-terminale Aminosäuresequenz des HILv1s lipolytischen Enzyms wurde bestimmt (d. h. die Variante, bei der die letzten 5 Aminosäurereste in dem Propeptid und der erste Aminosäurerest in dem reifen Enzym (ELVARQ durch SPPRRP ersetzt worden sind).

[0414] Die gefundene N-terminale Aminosäuresequenz lautete Arg-Arg-Pro-Leu-Gly-Ala-Ile- entsprechend den letzten drei Aminosäureresten in der substituierten Sequenz und den ersten vier Aminosäureresten, die auf die Substitution folgen.

[0415] Die N-terminale Aminosäuresequenz des HILv2s lipolytischen Enzyms wurde ebenfalls bestimmt (d. h. in der Variante, bei der die letzten 5 Aminosäurereste in dem Propeptid und der erste Aminosäurerest in dem reifen Enzym (ELVARQ durch SPPRP ersetzt worden sind).

[0416] Die gefundene N-terminale Aminosäuresequenz lautete Arg-Pro-Leu-Gly-Ala-Ile-Glu-Asn entsprechend den letzten beiden Aminosäureresten in der substituierten Sequenz und den ersten sechs Aminosäureresten, die auf die Substitution folgen.

BEISPIEL 16

Charakterisierung der modifizierten lipolytischen *Humicola insolens*-Enzyme

[0417] Die modifizierten lipolytischen Enzyme mit den Peptidanhängen, die durch die Stämme HILv1s, HILv2s bzw. HILv3s (beschrieben in Beispiel 21) und dem Wildtyp-Stamm HIL hergestellt worden sind, wurden hinsichtlich ihrer Lipaseaktivität auf PCS-Platten enthaltend 0,5 g/l, 1,0 g/l und 1,5 g/l PCS-Waschmittel charakterisiert.

[0418] 25 µl (entsprechend 5 LU) gereinigte modifizierte HILv1s-, HILv2s- und HILv3s-Lipase und Wildtyp-HIL-Lipase wurden in die mittels einer Pipette (4 mm) in die PCS-Platten gemachten Löcher hineingegeben und für 3 bzw. 6 Stunden inkubiert.

[0419] Das Ergebnis dieses Tests ist in den Tabellen unten gezeigt:

Variante	0,5 g/l PCS-Waschmittel	1,0 g/l PCS-Waschmittel	1,5g/l PCS-Waschmittel
HIL (Wildtyp)	4 mm	4 mm (schwach)	0 mm
HILv1s	6 mm	5 mm	4 mm (schwach)
HILv2s	5 mm	4 mm	0 mm
HILv3s	6 mm	6 mm	5 mm

[0420] Inkubation für 3 Stunden auf PCS-Platten enthaltend FY-Waschmittel.

Variante	0,5 g/l PCS-Waschmittel	1,0 g/l PCS-Waschmittel	1,5g/l PCS-Waschmittel
HIL (Wildtyp)	4 mm	4 mm (schwach)	0 mm
HILv1s	7 mm	5 mm	4 mm (schwach)
HILv2s	5 mm	5 mm (schwach)	4 mm (schwach)
HILv3s	6 mm	6 mm	4 mm (schwach)

[0421] Inkubation für 6 Stunden auf PCS-Platten enthaltend PCS-Waschmittel.

[0422] Wie aus den Tabellen gesehen werden kann, weisen die modifizierten Lipasevarianten (d. h. produziert durch HILv1s, HILv2s und HILv3s) im Allgemeinen eine höhere Lipaseaktivität in Anwesenheit des PCS-Waschmittels auf als die Wildtyp-Lipase.

BEISPIEL 17

Konstruktion der modifizierten lipolytischen *H. lanuginosa*-Enzyme mit einer C-terminalen Verlängerung

[0423] C-terminale Peptidanhänge wurden an die lipolytische *H. lanuginosa*-Enzymvariante HLv12s, enthaltend den N-terminalen Peptidanhang SPIRPRP und die internen Mutationen D57G, N94K, D96L, Q249R, angehängt.

1. Variante HLv13s (HLv12s mit dem C-terminalen Peptidanhang: 270R, 271R, 272P, Stopp)

Konstruktion des Plasmids pS14-1

[0424] Das Plasmid wurde unter Verwendung des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert.

[0425] pIVI245 wurde als Plasmidmatrize (die Konstruktion von pIVI245 ist in Beispiel 6 beschrieben) und Primer Nr. 7258 als Selektionsprimer verwendet.

[0426] 7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3' (Folglich Umwandeln der in dem Ampicillin-Resistenzgen gefundenen und zum Schneiden verwendeten Scal-Stelle in eine MluI-Stelle).

[0427] Primer Nr. 20694 wurde als Mutageneseprimer verwendet.

20694: 5' p-gg gac atg tct tcg acg acc gta gcg gct ggg tcg act c 3'.

2. Variante HLv14s (HLv12s mit der Mutation: 270R, 271R, Stop)

Konstruktion des Plasmids pS20-2

[0428] Das Plasmid wurde unter Verwendung des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Strategene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll konstruiert. pIVI245 wurde als Plasmidmatrize und Primer Nr. 7258 als Selektionsprimer verwendet.

[0429] 7258: 5' p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3' (Folglich Umwandeln der in dem Ampicillin-Resistenzgen gefundenen und zum Schneiden verwendeten Scal-Stelle in eine MluI-Stelle).

[0430] Primer Nr. 20695 wurde als Mutagenesepriimer verwendet:

20695: 5' p-gg gac atg tct tcg gcg gta ggc gcg gct ggg tcg ac 3'

Produktion der Enzymvarianten

[0431] Enzyme wurden analog zu der in Beispiel 6 beschriebenen Weise unter Verwendung des Plasmids pToC 202 für den Cotransformationsschritt und A. oryzae JAL 125 als eine Wirtszelle hergestellt.

Verifikation der Anwesenheit der C-terminalen Verlängerung in HLv12s

[0432] Eine 1 mg Probe von HLv12s enthaltend die C-terminale Verlängerung Arg-Arg-Pro (RRP) wurde unter Verwendung von Standardverfahren vor der Degradation mit einer Lysylspezifischen Protease S-carboxamido-methyliert. Die erhaltenen Peptide wurden unter Verwendung einer „reversed phase“-HPLC voneinander getrennt und die gesammelten Fraktionen einer „Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight“-Massenspektrometrie unterzogen. Eine Fraktion, die ein Peptid mit einer experimentellen Masse von 3906,7 Da enthielt, wurde gefunden. Diese Masse ist innerhalb des experimentellen Fehlers identisch mit der theoretischen Masse des C-terminalen Peptids von HLv12s enthaltend die RRP-Verlängerung, welche 3906,4 Da beträgt.

[0433] Die Aminosäuresequenz des Peptids in dieser Fraktion wurde bestimmt als

Ile-Glu-Gly-Ile-Asp-Ala-Thr-Gly-Gly-Asn-Asn-Arg-Pro-Asn-Ile-Pro-Asp-Ile-Pro-Ala-His-Leu-Trp-Tyr-Phe-Gly-Leu-Ile-Gly-Thr-Cys-Leu-Arg-Arg-Pro

welche die korrekte Aminosäuresequenz des C-terminalen Peptids von HLv12s ist und die C-terminale Verlängerung Arg-Arg-Pro enthält.

C-terminale Verlängerung

[0434] Waschergebnis: 5 g/l inaktiviertes Ariel Futur, 20 Minuten, 1 Zyklus TOM, 30°C, 18°dH.

[0435] Die Enzyme wurden als mg Enzymprotein pro Liter Waschlösung dosiert.
HLv13s: SPIPRR + D57G, N94K, D96L, Q249R, 270R, 271R, 272P
HLv14s: SPIPRR + D57G, N94K, D96L, Q249R, 270R, 271R

Variante	dR (0.5 mg EP/l)	dR (1 mg EP/l)
HLv12s	5	9
HLv13s	1	3
HLv14s	5	9,5

BEISPIEL 18

[0436] Ein Teil der N-terminalen Verlängerung von Hlv15s (Hlv15s enthaltend den N-terminalen Peptidanhang SPIRPR und die folgenden Mutationen in dem reifen Teil des lipolytischen H. lanuginosa-Enzyms EP, D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R) wurde mittels verlängerter Inkubation mit Clostripain abgeschnitten (EC 3.4.22.8; Sigma Nr. C-0888).

[0437] Die Inkubationsmischung enthielt: Hlv15s (1 mg/ml) und Clostripain (20 µg/ml) in 25 mM Natriumphosphat, pH 7,4, enthaltend 2,5 mM DTT und 1 mM Calciumchlorid.

[0438] Vor der Inkubation mit Clostripain trugen 60% der Lipase ein intaktes Propeptid (N-terminale Aminosäuresequenz SPIRPRP), während 10% den ersten Ser-Rest (N-terminale Aminosäuresequenz PIPRPV) und 30% die ersten 5 Aminosäurereste des Propeptids verloren hatten (N-terminale Aminosäuresequenz (RPVS-QDL)).

[0439] Nach 62-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur (resultierend in Hlv15s-C) hatten 60% der Lipase die ersten 4 Aminosäurereste des Propeptids verloren (resultierend in der folgenden Peptidverlängerung PRP-VSQ, 20% waren ohne 5 Aminosäurereste (folglich mit einer Peptidverlängerung RPVSQD), wohingegen die übrigen 20% 6 Aminosäurereste verloren hatten (folglich die Peptidverlängerung PVSQDL aufwiesen).

[0440] Die Propeptid-Prozessierung wurde unter Verwendung von N-terminaler Aminosäuresequenz-Bestimmung bestimmt und es sollte erwähnt werden, dass die angegebenen Prozentualwerte Näherungswerte sind.

Variante	Peptidanhang	
Hlv15s	60 % SPIRPRVPSQD 10 % PIRIRIVSQD 30 % RPVSQD	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R
Hlv15s-C	60 % PRPVSQ 20 % RPVSQ 20 % PVSQDL	D57G, N94K, D96L, L97M, Q249R

Ein-Zyklus-Waschleistung mit einem mit Clostripain behandelten modifizierten lipolytischen Enzym

[0441] Der Ein-Zyklus-Waschleistungstest (zuvor beschrieben in dem Abschnitt Material und Methoden) wurde mit der H. lanuginosa-Lipasevariante Hlv15s, die mit Clostripain behandelt worden ist, durchgeführt. Der Waschtest wurde sowohl mit der Clostripainbehandelten Probe als auch mit der nicht-Clostripain-behandelten Variante durchgeführt. Der Waschtest wurde in 5 g/l Enzym-inaktiviertem Ariel Futur (Procter & Gamble) durchgeführt. Fettgefärbte Stoffproben wurden für 20 Minuten bei 30°C gewaschen. Die Tests wurden bei Lipasekonzentrationen von 0, 5000 LU/1 und 12500 LU/1 durchgeführt.

[0442] Das Waschmittel wurde in etwa 18°dH hartem (Deutsche Härte) Wasser gelöst. Der pH der Waschflüssigkeit betrug etwa 10,3. Sieben Stoffproben wurden in 1000 ml Waschflüssigkeit gewaschen. Im Anschluss an das Waschen wurden die Stoffproben in fließendem Leitungswasser für 15 Minuten gespült und dann über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

[0443] Evaluierung: Der Reflexionsgrad der Stoffproben wurde bei 460 nm gemessen und die Lipaseleistung (ΔR) berechnet als:

$$\Delta R = \text{delta Reflexion} =$$

$$= (R_{\text{Stoffproben gewaschen in Waschmittel mit Lipase}} - R_{\text{Stoffproben gewaschen in Waschmittel ohne Lipase}})$$

[0444] Die Mutationen der Lipasen und die Anhänge sind zuvor beschrieben worden.

[0445] Die ΔR -Werte sind in der Tabelle unten gezeigt.

Variante	+/- Behandlung mit Clostripain	niedrige Dosierung	ΔR	hohe Dosierung	ΔR	
HLv15s	keine Clostripain-Behandlung	5000 LU/I	10	12500 LU/I	13	
HLv15s-C	+	Clostripain-Behandlung	5000 LU/I	6	12500 LU/I	7

[0446] Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit eines intakten Peptidanhangs zu der besten Waschleistung führt. Ein reduzierter (aber nicht vollständig entfernter) Peptidanhang bewirkt eine verbesserte Waschleistung, insbesondere wenn positiv geladene Aminosäurereste in dem Anhang vorliegen.

BEISPIEL 19

Modifiziertes lipolytisches H. lanuginosa-Enzym enthaltend eine Cystein-Brücke (HLv16s)

[0447] das modifizierte lipolytische H. lanuginosa-Enzym Hlv16s enthält die folgenden Mutationen: N94K, D96L, E239C und Q249R und den Peptidanhang SCIRR.

[0448] Das Stammenzym Hlv16 enthält die folgenden Mutationen: N94K, D96L, Q249R.

[0449] Hlv16s wurde wie folgt konstruiert:

1. Konstruktion von N94K, D96L-Mutationen im Wildtyp lipolytischen H. lanuginosa-Enzym

Konstruktion von pIVI290

[0450] Das Plasmid wurde unter Verwendung des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Stratagene gemäß dem beschriebenen Protokoll unter Verwendung von pAHL (vgl. [Abb. 6](#) der WO 92/05249) als Plasmidmatrize und den Primern Nr. 7258 und 7770 als Selektionsprimern konstruiert.

7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3' (Folglich Umwandeln der in dem Ampicillin-Resistenzgen gefundenen Scal-Stelle in eine Mlul-Stelle) (Scal ist zum Schneiden verwendet worden):

7770: Sequenz: 5'p tct aqc cca gaa tac tgg atc aaa tc 3' (Ändert die in dem Wildtyp H. lanuginosa-Lipasegen gefundene Scal-Stelle).

[0451] Primer Nr. 8932 wurde als Mutageneseprimer verwendet.

8932: 5'pgaac tgg ata gga aat ttg aag ttc ctg ttg aaa gaa ata aat gac 3' (Einführend N94K, D96L)

2. Konstruktion von Hlv16s (SCIRR, N94K, D96L, E239C, Q249R)

Konstruktion von pIVI319

[0452] Das Plasmid wurde unter Verwendung des „Chameleon double-stranded, site-directed mutagenesis Kit“ von Stratagene (Kat.-Nr. 200509) gemäß dem beschriebenen Protokoll unter Verwendung von pIVI290 als Plasmidmatrize und dem Primer Nr. 7887 als Selektionsprimer konstruiert.

[0453] 7887: 5'p-gaa tga ctr ggt tga gta ctc acc agt cac 3' (Umwandeln der eingeführten in dem Ampicillinresistenzgen gefundenen Mlul-Stelle in eine Scal-Stelle) (Mlul ist zum Schneiden verwendet worden).

[0454] Die Primer Nr. 8829, 9639 und 9646 wurden als Mutageneseprimer verwendet.

8829: 5'p-ggc ggc aat aac cgg cgg aac att ccg gat atc cc 3' (Einführend Q249R)

9639: 5'p-at atc gtg aag ata tgc ggc att gat gcc acc 3' (Einführend E239C)

9646: 5' p-cg gcc ttg gct agc tgt att cgt cga gag gtc 3' (Das Propeptid modifizierend von SPIRR nach SCIRR)

Produktion der Enzyme HLv16s und HLv16

[0455] Die Enzyme wurde analog zu der in Beispiel 6 beschriebenen Weise unter Verwendung von *A. oryzae* JAL 125 als Wirtszelle hergestellt: Im Anschluss daran wurde die Ein-Zyklus-Waschleistung der Enzyme getestet (unter Verwendung von 5 g/l an inaktiviertem Ariel Futur als Waschmittel und einer Enzymdosis von 0,25 mg Enzymprotein/l bzw. 1,0 mg Enzymprotein/l).

[0456] Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:

	dR (0,25 mg EP/l)	dR (1,0 mg EP/l)
HLv16s	3	7
HLv16	1	2

[0457] Man kann sehen, dass eine signifikant verbesserte Waschleistung für HLv16s, das eine Cystein-Brücke zwischen dem Peptidanhang und dem reifen Teil des Enzyms enthält, erhalten wird.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
- (A) NAME: Novo Nordisk A/S
 (B) STRASSE: Novo Allet
 (C) STADT: Bagsvaerd
 (E) LAND: Dänemark
 (F) POSTLEITZAHL (PLZ): DK-2880
 (G) TELEFON: +45 4444 8888
 (H) TELEFAX: +45 4449 3256
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Ein modifiziertes Enzym mit lipolytischer Aktivität
- (iii) ANZAHL SEQUENZEN: 92
- (iv) COMPUTERLESBARE FORM:
- (A) ART: Diskette
 (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 1:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

GAATGACTTG GTTGACCGGT CACCAAGTCAC**30**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 2:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

TCTAGCCCAAG AATACTGGAT CAAATC**26**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure

- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 1"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

**AACAGATCTT GCGAGACCTC TCTACGTATA GGGCTAGCGA
GCGGGCGCT GATCG**

55

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 4:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 2"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

GTTGTGTGGA ATTGTGAGCGG

21

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 5:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligo 8479"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

**GCGTGGACGG CCTTGGCTAG CCCTATTGCT CCTCGACCGG TCTCGCAGGA
TCIG**

54

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 6:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 3"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

AGAAAATCGGG TATCCCTTCA G

21

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 7:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9476"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

CGAATTTCGAT CGCTTCCAGG GTGGTGGCAG G**21**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 8:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9472"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

**CGAATTTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGGCGCGG GCGGATCGGG
CTGGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC****74**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 9:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9473"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

**CGAATTTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCTTGCGCGG GCGGATCGCC
GTGGGCAGCGG TGGCCGCCAT TGCC****74**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 10:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9471"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

**CGAATTTCACG CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGGCGCGG ACGGCGCGTC
GAGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC****74**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 11:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 74 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9474"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

**CGAATTCACT CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGGCGCGG GCGGATCGGG
CCGGGCGCGG TGGCCGCCAT TGCC**

74

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 12:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9475"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

**CGAATTCACT CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCCGGCGGAT CGGGCTGGGC CGGGTGGCCG
CCATTGCC**

68

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 13:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer LWN9470"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:

**CGAATTCACT CGTCGCCGCG TAGCCAGCGG CCGGACCGCG CCTGGGACGC
GGGCGGGCG CGGTGGCCGC CATTGCC**

77

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 14:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 105 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 4"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:

GCTCCTCATG GTGGATCCCC AGTTGTGTAT ATAGAGGATT
 GAGGAAGGAA GAGAAGTGTG GATAGAGGTA XATTGAGTTG
 GAAACTCCAA CCATGGCATC CTTGC

105

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 15:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 876 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: DNA (genomisch)
- (vi) ORIGINALHERKUNFT:
 - (B) STAMM: Humicola lanuginosa DSM 4109
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..876
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 - (B) LAGE: 1..66
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu	48
1 5 10 15	
GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe	96
20 25 30	
AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT GCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn	144
35 40 45	
GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG GGA AAT GCC TGC CCC Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro	192
50 55 60	
GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser	240
65 70 75 80	
GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys	288
85 90 95	
TTC ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TGG ATC Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile	336
100 105 110	
GGG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly	384
115 120 125	
TGC AGG GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp	432

130

135

140

ACG TTA AGG CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGG GAG CAT CCC GAC TAT Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr 145 150 155 160	480
CGC GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GCA TTG GCA ACT GTT Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val 165 170 175	528
GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GGG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser 180 185 190	576
TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr 195 200 205	624
GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CGC ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile 210 215 220	672
GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro 225 230 235 240	720
GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp 245 250 255	768
ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro 260 265 270	816
AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT CGG Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly 275 280 285	864
ACA TGT CTT TAG Thr Cys Leu * 290	876

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 16:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 292 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 16:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 20 25 30

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Glu Lys Asn Asn
 35 40 45

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 50 55 60

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 85 90 95

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 100 105 110

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 115 120 125

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 130 135 140

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 145 150 155 160

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 165 170 175

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 180 185 190

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 195 200 205

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 210 215 220

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 225 230 235 240

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 245 250 255

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 260 265 270

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
 275 280 285

Thr Cys Leu *

290

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 17:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

Arg-Pro-Val-Ser-Glu-Asp

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 18:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 18:

Ser-Pro-Ile-Arg-Met

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 19:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

Ser-Pro-Ile-Arg-Ala-Arg

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 20:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 21:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

Ser-Pro-Ile-Arg-Glu-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 22:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 23:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 23:

Ser-Pro-Ile-Lys-Lys**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 24:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 24:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 25:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 25:

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 26:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 5 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 26:

Ser-Pro-Iso-Pro-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 27:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 5 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 27:

Ser-Pro-Arg-Pro-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 28:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 4 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 28:

Ser-Pro-Ile-Arg

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 29:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 5 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 29:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 30:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 30:

Ser-Cys-Ile-Arg-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 31:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 31:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 32:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 32:

Ser-Cys-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 33:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 33:

Ser-Pro-Arg-Arg-Pro-Arg-Thr**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 34:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 34:

Ser-Pro-Phe-Arg-Pro-Lys-Leu

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 35:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 35:

Ser-Pro-Pro-Arg-Arg-Pro

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 36:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 36:

Ser-Pro-Ile-Arg-Arg-Glu

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 37:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 37:

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Pro

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 38:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 38:

Ser-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 39:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 39:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 40:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 40:

Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 41:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 41:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 42:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure

- (D) TOPOLOGIE:
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 42:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 43:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 43:

Ser-His-Trp-Arg-Arg-Trp**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 44:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 44:

Ser-His-Trp-Arg-Lys**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 45:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 45:

Ser-His-Trp-Arg-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 46:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure

- (D) TOPOLOGIE: • linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 46:

Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 47:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 47:

Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 48:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 48:

Gly-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 49:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 49:

Leu-Pro-Phe-Arg-Glu-Arg-Pro

5

- (2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 50:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure

- (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 50:

Ser-Arg-Ser-Arg-His-Asp-Ala

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 51:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 51:

Ile-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Arg

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 52:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 52:

Ser-Thr-Arg-Arg-Pro-Arg-Pro

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 53:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 53:

Thr-Ala-Ile-Arg-Pro-Arg-Lys

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 54:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 54:

Trp-Arg-Trp-Arg-Trp-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 55:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 55:

Glu-Pro-Ile-Arg-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 56:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 56:

Ser-His-Trp-Glu-Glu**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 57:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 57:

Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 58:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 58

Ser-Ser-Thr-Arg-Arg-Ala-Ser-Pro-Ile-Lys-Lys

5 10

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 58:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|----------------|
| (A) LÄNGE: | 11 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 58:

Ala-Trp-Trp-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro

5 10

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 60:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|----------------|
| (A) LÄNGE: | 12 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 60:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro

5 10

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 61:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|----------------|
| (A) LÄNGE: | 12 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 61:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Ser

5 10

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 62:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 8 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 62:

Ser-Pro-Lys-Arg-Lys-Pro-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 63:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 63:

Ser-Gln-Arg-Ile-Lys-Gln-Arg-Ile-Lys**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 64:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 64:

Ser-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 65:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 65:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg**5****10**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 66:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 65:

Ser-Pro-Ile-Arg-Lys-Ala-Trp-Trp-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 67:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	12 Aminosäuren
(B) ART:	Aminosäure
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 67:

Ala-Pro-Pro-Pro-Lys-Ala-Ser-Pro-Arg-Gln-Arg-Pro**5****10**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 68:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	15 Aminosäuren
(B) ART:	Aminosäure
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 68:

Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg**5****10****15**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 69:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	8 Aminosäuren
(B) ART:	Aminosäure
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 69:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 70:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE:	8 Aminosäuren
(B) ART:	Aminosäure
(D) TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 71:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Arg-Trp**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 71:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A)	LÄNGE:	8 Aminosäuren
(B)	ART:	Aminosäure
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART:

Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 71:

Ser-Pro-Pro-Arg-Trp-Pro-Trp-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 72:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A)	LÄNGE:	8 Aminosäuren
(B)	ART:	Aminosäure
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART:

Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 72:

Ser-Pro-Pro-Trp-Arg-Pro-Arg-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 73:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A)	LÄNGE:	8 Aminosäuren
(B)	ART:	Aminosäure
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART:

Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 73:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Arg-Trp**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 74:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A)	LÄNGE:	8 Aminosäuren
(B)	ART:	Aminosäure
(D)	TOPOLOGIE:	linear

(ii) MOLEKÜLART:

Peptidanhang

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 74:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Arg**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 75:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 8 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 75:

Ser-Pro-Pro-Trp-Trp-Pro-Trp-Trp**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 76:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|----------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 8 Aminosäuren |
| (B) ART: | Aminosäure |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 76:

Ser-Pro-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro**5**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 77:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|-------------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 30 Basenpaare |
| (B) ART: | Nukleinsäure |
| (C) STRÄNGIGKEIT: | einzel |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 7887"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 77:

gaatgacgttggtagttt caccaggatc

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 78:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- | | |
|-------------------|---------------|
| (A) LÄNGE: | 46 Basenpaare |
| (B) ART: | Nukleinsäure |
| (C) STRÄNGIGKEIT: | einzel |
| (D) TOPOLOGIE: | linear |
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 8932"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 78:

ggactggata ggaatttgtt agtcctgtt gaaagaata taigac

46

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 79:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 7258"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 79:

gaatgacttg ttgtacgcgt caccaggcac

30

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 80:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 7770"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 80:

tcgtggcccg atatcggtt caatac

26

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 81:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 8479"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 81:

gcgtggacgg ccgtggctgg ccattatcggtt ccgtggacgg tcgtggcggta tcgt

54

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 82:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligo 1"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 82:

**GCGTGGACGG CCTTGGCC₆₆(T/A) 66(A/T) :₅₈(T/A) 67(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) GAGGTC TCG
CAGGATC TG**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 83:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 93 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligo 2"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 83:

**GTCTCTGCCTT GGACGGCCTT GGCGGCCCA CCTCCA₆₇(T/A) 66(T/A) 575 66(T/A) 67(T/A)
66(T/A) 575 66(T/A) (6/7)(7/8)(C/G) 57(C/G) C57 (5/7)5(C/G) CTGT TTAACCAGTT CAATCTC**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 84:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 7887"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 84:

gaatggatgg gttttttttt caccaggatc

30

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 85:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 19473"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 85:

accataaaaaa ggccgcctt ccgtgggtc ctggggatc gggagcc

47

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 86:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: ••• andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 21992"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 86:

actatcccc ggccgcctt agccctccgc ggccggcgct gggapccatc gagacggc 59

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 87:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 21994"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 87:

accatcccc ggccgcctt agccctatac gttagtcgg agccatcggc acggc 56

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 88:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: andere Nukleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer 9349"
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 88:

gatgtccaca tccggatcat cttggatcaa ggatgtgggg gaccttacgtac gcccgg 56

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 89:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 89:

Ser-Ala-Leu-Arg-Pro-Arg-Lys

5

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 90:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 90:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Pro-Arg-Leu-Leu-Pro-Ile-Ser:**5****10**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 91:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 91:

Ala-Pro-Pro-Pro-Thr-Arg-Gln-Arg-Gln-Ser-Pro**5****10**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 92:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Peptidanhang
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 92:

Ala-Pro-Pro-Pro-Arg-Thr-Ile-Pro-Arg-Ser-Ser-Pro**5****10**

(2) ANGABEN ZUR SEQ ID NR: 93:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 288 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: Protein
- (vi) ORIGINALURSPRUNG:
- (B) STAMM: P?sp?eudomonas sp.
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 93:

Phe Gly Ser Ser Asn Tyr Thr Lys Thr Gln Tyr Pro Ile Val Leu Thr**1****5****10****15**

His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Leu Leu Gly Val Asp Tyr Trp Tyr
 20 25 30

Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Lys Asp Gly Ala Thr Val Tyr Val Thr
 35 40 45

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

Thr Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Pro Lys Val Asn
 65 70 75 80

Leu Phe Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala
 85 90 95

Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Ile Gly Ala Pro His
 100 105 110

Lys Gly Ser Ala Thr Ala Asp Phe Ile Arg Gln Val Pro Glu Gly Ser
 115 120 125

Ala Ser Glu Ala Ile Leu Ala Gly Ile Val Asn Gly Leu Gly Ala Leu
 130 135 140

Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Asp Thr Pro Gln Asn Ser Leu
 145 150 155 160

Gly Thr Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala
 165 170 175

Arg Phe Pro Gln Gly Val Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Asp Tyr
 180 185 190

Val Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Thr Ser Pro Leu
 195 200 205

Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Leu Gly Ala Thr Ser Leu
 210 215 220

Thr Phe Gly Phe Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Arg Cys Ser Ser
 225 230 235 240

Arg Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp
 245 250 255

Glu Val Asn Gln Thr Phe Gly Leu Thr Ser Ile Phe Glu Thr Ser Pro
 260 265 270

Val Ser Val Tyr Arg Gln Gln Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Gly Leu
 275 280 285

Patentansprüche

1. Lipase besitzend eine der folgenden: N- oder C-terminalen Sequenzen:
- a) SPIRR oder
 - b) RPVSQD oder
 - c) SPIRM oder
 - d) SPIRAR oder
 - e) SPIRPR oder
 - f) SPIRER oder
 - g) SPIRK oder
 - h) SPIKK oder
 - i) SPIRRP oder
 - j) SPPRR oder

k) SPIPR oder
 l) SPRPR oder
 m) SPIR oder
 n) SCIRR oder
 o) SPIRPRP oder
 p) SCPIRPRP oder
 q) SPRRPRT oder
 r) SPFRPKL oder
 s) SPPRRP oder
 t) SPIRRE oder
 u) SPPRPP oder
 v) SPPRPR oder
 w) SPPWWP oder
 x) SPPWRP oder
 y) SPPRWP oder
 z) SPPRWP oder
 aa) SHWRRW oder
 bb) SHWRK oder
 cc) SHWRR oder
 dd) TAIRPRK oder
 ee) STRRPRP oder
 ff) GPIRPRP oder
 gg) LPFRQRP oder
 hh) SRSRHNA oder
 ii) IIPRPRR oder
 jj) STRRPRP oder
 kk) TAIRPRK oder
 ll) WRWRWR oder
 mm) QPIRR oder
 nn) SHWQQ oder
 oo) RPRPRPRRP oder
 pp) SSTRRASPIKK oder
 qq) AWPSPIRPRP oder
 rr) APPPRPRPRPRP oder
 ss) APPPRTRPRPRS oder
 tt) SPKRKPRP oder
 uu) SQRIKQRIK oder
 vv) SPPRPRP oder
 ww) SPIRPRPRPR oder
 xx) SPIRKAWWP oder
 yy) APPPKASPRQRP oder
 zz) SPIRPRSPIRPRP oder
 aaa) SPPRWPRR oder
 bbb) SPPRWPRW oder
 ccc) SPPRWPRWR oder
 ddd) SPPWRPRR oder
 eee) SPPWWPRW oder
 fff) SPPWWPWR oder
 ggg) SPPWWPW or
 hhh) SPPWPRPRP.

2. Lipase nach Anspruch 1, wobei die N- oder C-terminale Sequenz an eine Lipase aus *Pseudomonas* sp. angehängt ist.

3. Lipase nach Anspruch 2, wobei die N- oder C-terminale Sequenz an eine Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) angehängt ist.

4. Lipase nach Anspruch 1, wobei die N- oder C-terminale Sequenz an eine Lipase aus *Humicola* sp. angehängt ist.

5. Lipase nach Anspruch 4, wobei die N- oder C-terminale Sequenz an eine Lipase aus *H. lanuginosa* oder *H. insolens* angehängt ist.
6. Lipase nach Anspruch 1, welche von einer Aminosäuresequenz der [Fig. 1](#) (SEQ ID NO: 16) abgeleitet ist.
7. Lipase nach Anspruch 6, wobei die terminale Sequenz einen ausgetauschten Aminosäurerest E23 in [Fig. 1](#) (SEQ ID NO: 16) hat.
8. Lipase nach einem der Ansprüche 1–7, wobei die N- oder C-terminale Sequenz einen Cysteinrest umfasst und der übrige Teil der Lipase einen Cysteinrest umfasst, so dass die zwei Cysteinreste zusammen eine Cystinbrücke bilden.
9. DNA-Sequenz kodierend für die Lipase nach einem der Ansprüche 1–8, welche eine N- oder C-terminale Sequenz b)-hhh) besitzt.
10. Expressionsvektor, der die DNA-Sequenz nach Anspruch 9 umfasst und weiterhin DNA-Sequenzen umfasst, die die Expression der Lipase erlauben.
11. Transformierte Wirtszelle, die eine DNA-Sequenz nach Anspruch 9 oder einen Vektor nach Anspruch 10 birgt.
12. Transformierte Zelle nach Anspruch 11, wobei die Wirtszelle ein filamentöser Pilz, eine Hefe- oder eine bakterielle Zelle ist.
13. Transformierte Zelle nach Anspruch 12, wobei die Wirtszelle ein Stamm von *Aspergillus* sp. ist.
14. Transformierte Zelle nach Anspruch 13, wobei die Wirtszelle ein Stamm von *A. oryzae* ist.
15. Transformierte Zelle nach Anspruch 12, wobei die Wirtszelle ein Stamm von *Bacillus*, *Streptomyces*, *E. coli* oder *Pseudomonas* ist.
16. Transformierte Zelle nach Anspruch 12, wobei die Wirtszelle ein Stamm von *Saccharomyces* sp. oder *Hansenula* sp. ist.
17. Transformierte Zelle nach Anspruch 16, wobei die Wirtszelle ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* ist.
18. Verfahren zum Herstellen der Lipase nach einem der Ansprüche 1–8, umfassend
 - a) Kultivieren der transformierten Zelle nach einem der Ansprüche 11–17 unter Bedingungen, die für die Herstellung der Lipase förderlich sind, und
 - b) Gewinnen und optional Reinigen der erhaltenen Lipase.
19. Waschmittelzusammensetzung umfassend die Lipase nach einem der Ansprüche 1–8.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

ATGGAGGAGCTTCCCTTGCTGTCTTGTCTCGGACGCCCTGGCAGTCCTATT
 1 K R S S L V L F F V S A W T A L A S P I -
 CGTCGAGAGGCTCTGGCAAGGATCTGTTAACACTTCATACTCTTGCACAGTAATCTGCA
 31 R R E V S Q D L F N Q P N L P A Q Y S A -
 GCGGCAATCTGGGMAAAAACAATGATGCCCCCTGGTACRACCATTAAGTGACGGGA
 41 A A Y C G K H N D A P A G T N I T C T G -
 AATGCCCTGCGGAGCTAGAGAAGGGGGATGCAAGCTTCTACTCCTTGAGAGCTT
 61 N A C P E V E K A D A T F L Y S F E D S -
 CGACTCGCCGATCTCACCGGCTTCTGCTCTGACACAGGACAAATGATEGTCCTC
 81 G V G D V T G F L A L D M T N E L I V L -
 TCTTTCCTGCTCTCTCTCCATAGAGAACCTGGATGGGAACTCTAACCTGGACTTAA
 101 S F R G S R S I E N N I G H L N F D L K -
 GAAATTAATGCAATTGCTCGGAGCTGAGGGACATGACGGCTTCACTTGGCTGGAGG
 121 E I N D I C S G C R G H D G F T S S M R -
 TCTGTCACCGATACGTTAACCCAGAACGCTGGGAGATCTTGCGGACCTCTCCACTAT
 141 S V A D T L R Q K V E D A V R E H F D Y -
 CGCGGGTTTACCGGACATAGCTTGGCTGGCATTCGACTGTTGGCCGGAGCGAC
 161 R V V F T G H S L G G A L A T V A G A D -
 CTGGCTGGAAATGGGTATGATATGGCTGGCTGGCATATGGCCGGGGAGTCGGAAAC
 181 L R G N G Y D I D V F S Y G A P R V G H S -
 AGGGCTTTGCAGAATTCCTGACCGTAGAGAACCGGCGAACACTCTACCGCATACCCAC
 201 R A F A E F L T V Q T G G T L Y R I T N -
 ACCAATGATATTGTCCCTAGACTCGCGCGCAATGGTTACGGCAATCTGGCCAA
 221 T W D I V P R L P P R E F G Y S H S S P -
 GAGTACTGGATCAAATCTGGACCCCTTGCTCCCGTCAACCGGAAACGATTCGTGAAGATA
 241 E Y W I K S G T L V P V T R N D I V K I -
 GAGGGATGGATCCGACCGGCGAACAGGCTAACCTGGGNTATGGCGAC
 261 E G I D A T G G N N Q P N I F D I P A E -
 CTATGGTACCTGGGTTAAATGGGCAATGCTTGTAG
 281 L W Y F G L I G T C L *

Fig. 1

1 ATGAAACGCAATTGGTTCCCTGCTGGTTCGGTTGTCGATCAGCGCCGCGCTCGCT
 1 M K R I C G S L L L G L S I S A A L A

 21 AGCCCTATACGTAGAGAGGTCTCGCAGGATCTGTTAACAGTTCAATCTCTTGACACAGTATTCGCA
 21 S P I R R E V S Q D L F N Q F N L F A Q Y S A

 44 GCCGCATACTGCGGAAAAAAACAAATGATGCCCAAGCTGGTACAAACATTACGTGCACGGGA
 44 A A Y C G K N N D A P A G T N I T C T G -

 64 AATGCCTGCCCGAGGTAGAGAAGGGCGATGCAACGTTCTACTCGTTGAAGACTCT
 64 N A C P E V E K A D A T F L Y S F E D S -

 84 CGAGTGGCGATGTCACCGSCTTCCTGCTCTGACAACAGAACAAATTGATCGTCCTC
 84 G V G D V T G F L A L D N T N K L I V L -

 104 TCTTCCGTTGGCTCTCGTTCATAGAGAACTGGATCGGAATCTTAACCTCGACTTGAAA
 104 S F R G S R S I E N W I G N L N F D L K -

 124 GAATAAATGACATTGCTCCGGCTGCAGGGGACATGACGGCTTCACCTCGTCCTGGAGG
 124 E I N D I C S G C R G H D G F T S S W R -

 144 TCTGTAGCCGATACGTTAAGGCAGAAGGTGGAGGATGCTGTGAGGGAGCATCCGACTAT
 144 S V A D T L R Q K V E D A V R E H P D Y -

 164 CGCGTGGTGTACCGGACATAGCTTGGGTGGTGCATTGCAACTGTTGCCGGAGCAC
 164 R V V P T G H S L G G A L A T V A G A D -

 184 CTGCGTGGAAATGGGTATGATATCGACGTGTTTCATATGGGCCCGAGTCGGAAAC
 184 L R G N G Y D I D V F S Y G A P R V G N -

 204 AGGGCTTTGCAGAATTCTGACCGTACAGACCGGGAACACTCTACCGCATTACCCAC
 204 R A F A E F L T V Q T G G T L Y R I T H -

 224 ACCAATGATATTGTCCTAGACTCCCACGGGAATTGGTTACAGCCATTCTAGCCCA
 224 T N D I V P R L P P R E F G Y S H S S P -

 244 GAGTACTGGATCAAATCTGGAACCCCTGTCACCGAAACGATATCGTGAAGATA
 244 E Y W I K S G T L V P V T R N D I V K I -

 264 GAAGGCATCGATGCCACCGCGGCAATAACCAACCTAACATTCGGATATCCCTGGCAC
 264 E G I D A T G G N N Q P N I P D I P A H -

 284 CTATGGTACTTCGGGTTAACGGGACATGTCCTTAG
 284 L W Y F G L I G T C L *

Fig. 2

1 ATGAAACGCATTTGGTCCCTGCTGGCTCGGTTGTGATCAGGCCGCCCTGCC
 M K R I C G S L L L L G L S I S A A L A
 21 GAGGTCTCGCAGGATCTGTTAACCAAGTTCAATCTCTTGACAGTATTCTGCA
 E V S Q D L F N Q F N L F A Q Y S A
 39 GCCGCATACTGGGAAAAAACAAATGATGCCCGACTGGTACAAACATTACGTGCACGGGA
 A A Y C G K N N D A P A G T N I T C T G -
 59 AATGCCTGCCCGAGGTAGAGAAGGGGGATGCAACGTTCTACTCGTTGAAGACTCT
 N A C P E V E K A D A T F L Y S F E D S -
 79 GGAGTGGCGATGTCACCGCTTCCTGCTCTGACAACACGAACAAATTGATGTCCTC
 G V G D V T G F L A L D N T N K L I V L -
 99 TCTTCCGTGGCTCTGGTCCATAGAGAACTGGATGGGAATCTAACCTCGACTTGAAGAAA
 S F R G S R S I E N W I G N L N F D L K -
 119 GAAATAATTGACATTGCTCCGGCTGCAGGGACATGACGGCTTCACTTCGTCCTGGAGG
 E I N D I C S G C R G H D G F T S S W R -
 139 TCTGTAGCCGATACGTTAACGGCAGAACGGTGGAGGATGCTGTGAGGGAGCATCCGACTAT
 S V A D T L R Q K V E D A V R E H P D Y -
 159 CGCGTGGTGTACCGGACATAGCTGGGTGGTCATTGGCAACTGTTGCCGGAGCAGAC
 R V V F T G H S L G G A L A T V A G A D -
 179 CTGCGTGGAAATGGGTATGATATCGACGTGTTCTATATGGCGCCCCCGAGTCGGAAAC
 L R G N G Y D I D V F S Y G A P R V G N -
 199 AGGGCTTTGAGAACATTCTGACCGTACAGACCGGGCGAACACTCTACCGCATTACCCAC
 R A F A E F L T V Q T G G T L Y R I T H -
 219 ACCAATGATATTGTCCTAGACTCCCGCCGCGCAATTGGTACAGCCATTCTAGCCCA
 T N D I V P R L P P R E F G Y S H S S P -
 239 GAGTACTGGATCAAATCTGGAACCTTGTCCCCGTACCCGAAACGATATCGTAAGATA
 E Y W I K S G T L V P V T R N D I V K I -
 259 GAAGGCATCGATGCCACCGGGCGAACAAACCGCTAACATTGGATATCCCTGCCAC
 E G I D A T G G N N Q P N I P D I P A H -
 279 CTATGGTACTCGGGTTAATTGGGACATGTCTTAG
 L W Y F G L I G T C L *

Fig. 3

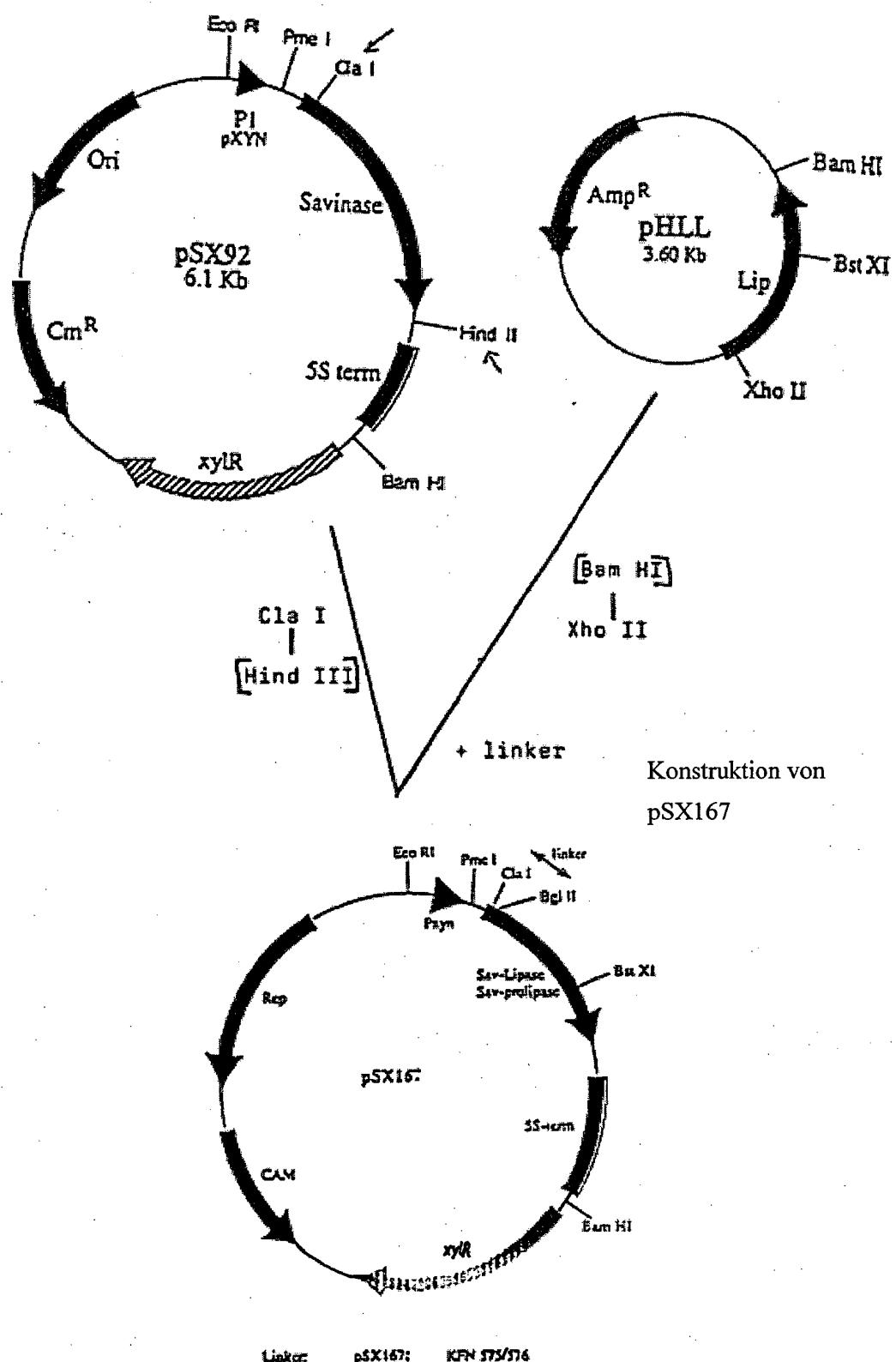


Fig. 4

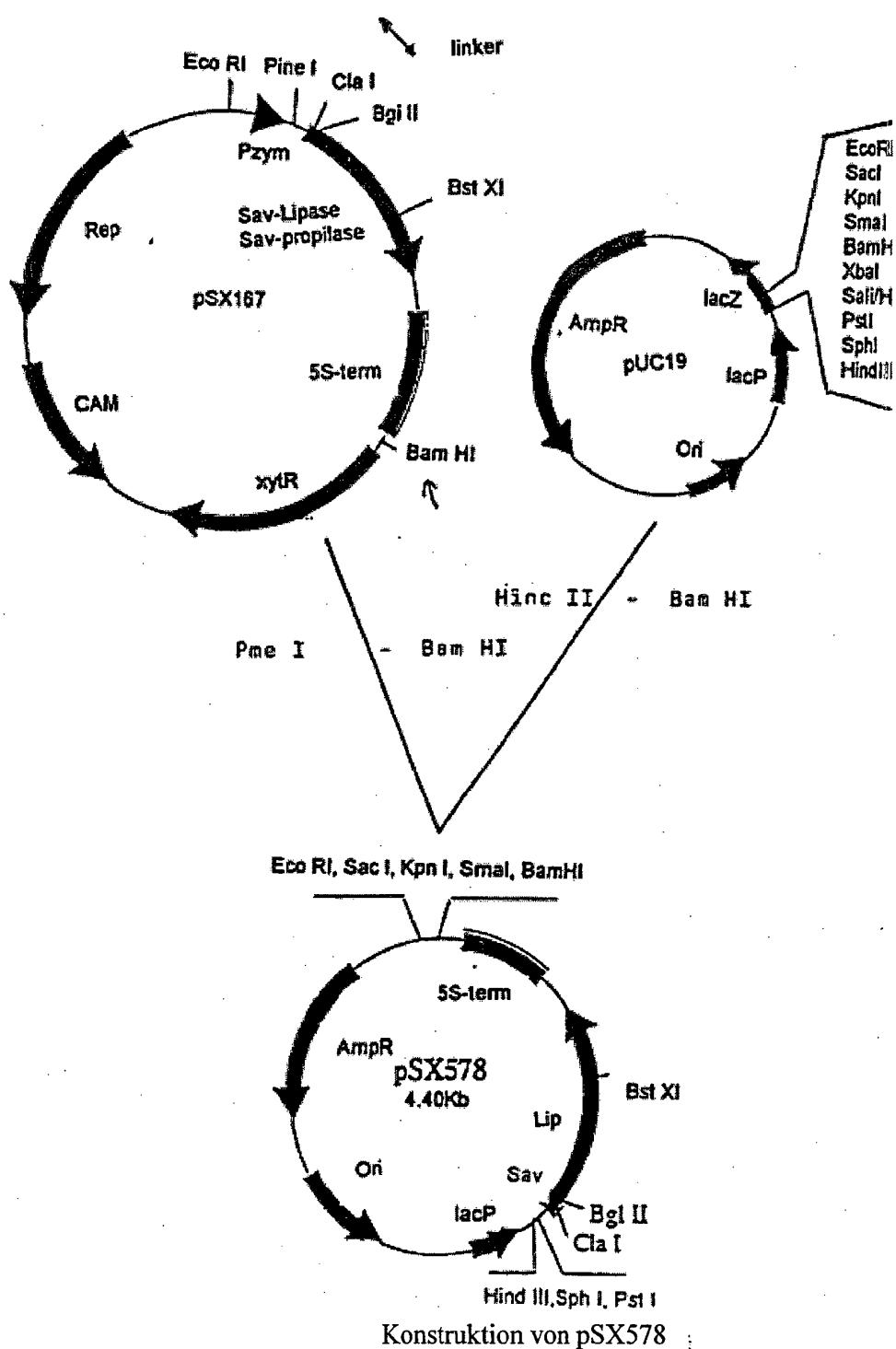


Fig. 5

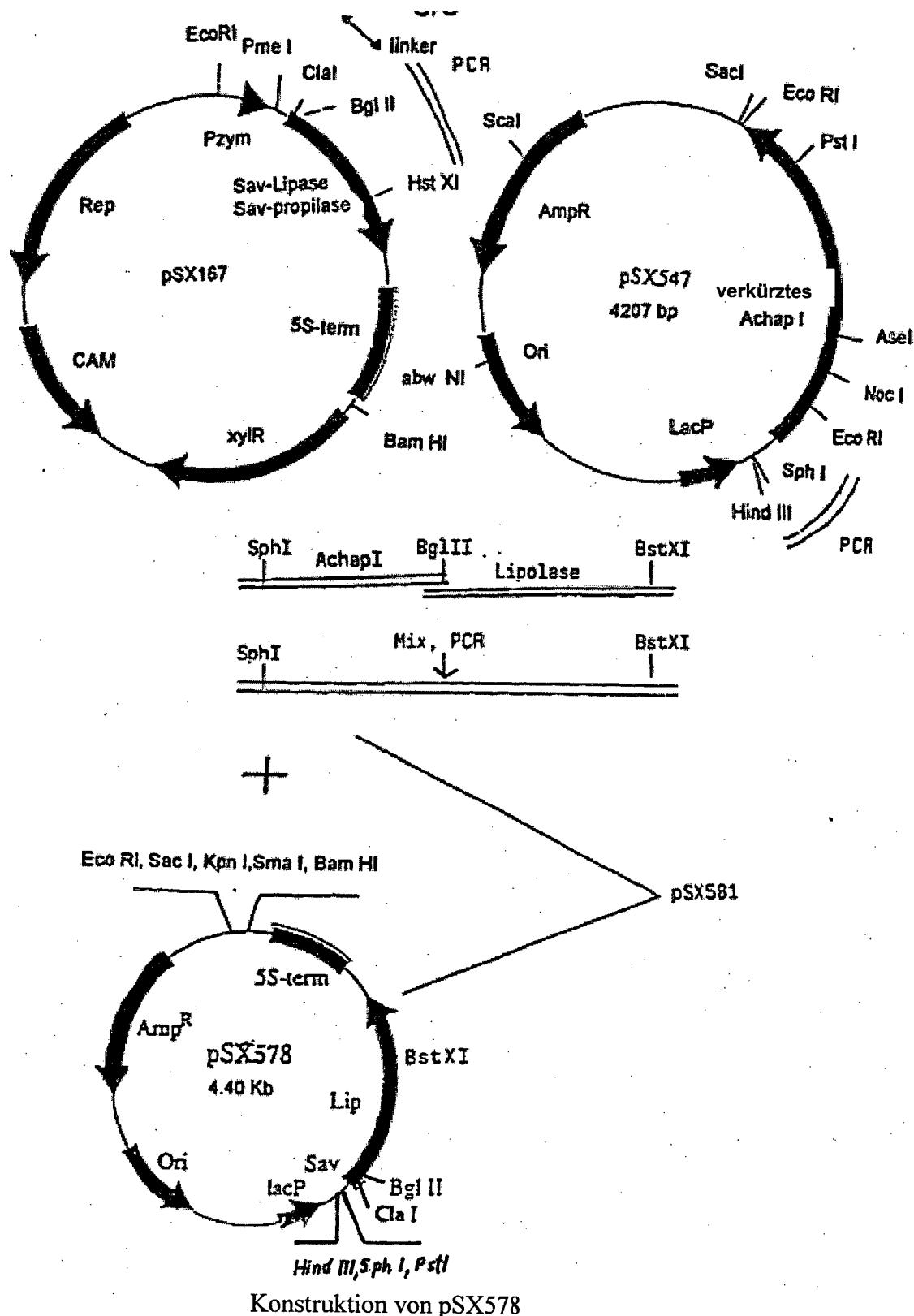
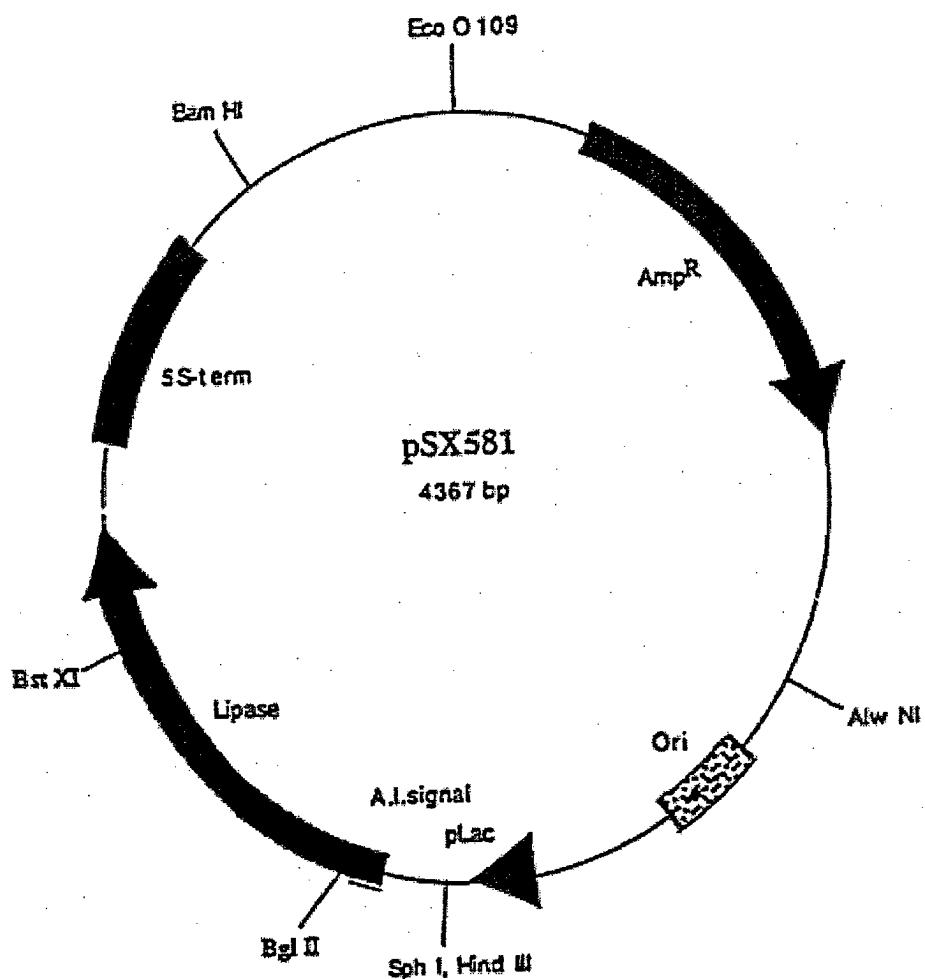
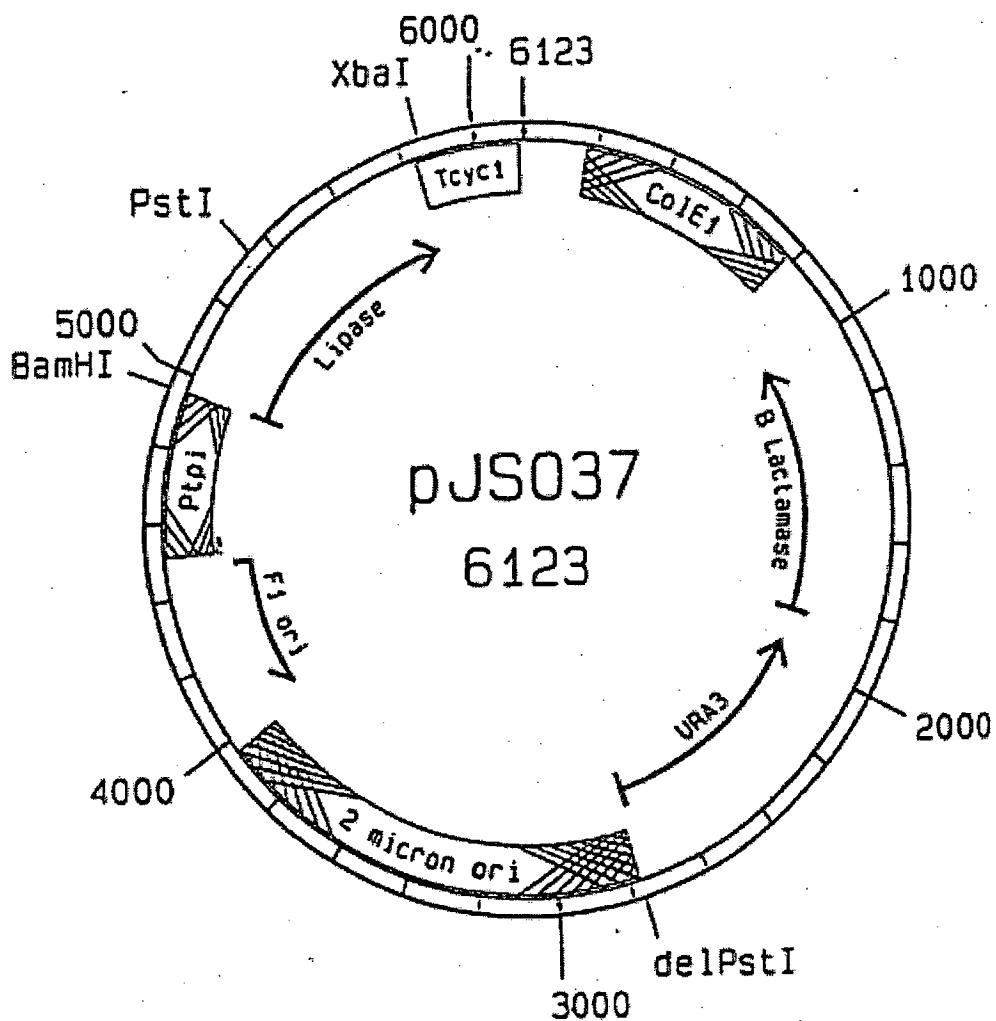


Fig. 6



pSX581

Fig. 7



pJS037

Fig. 8

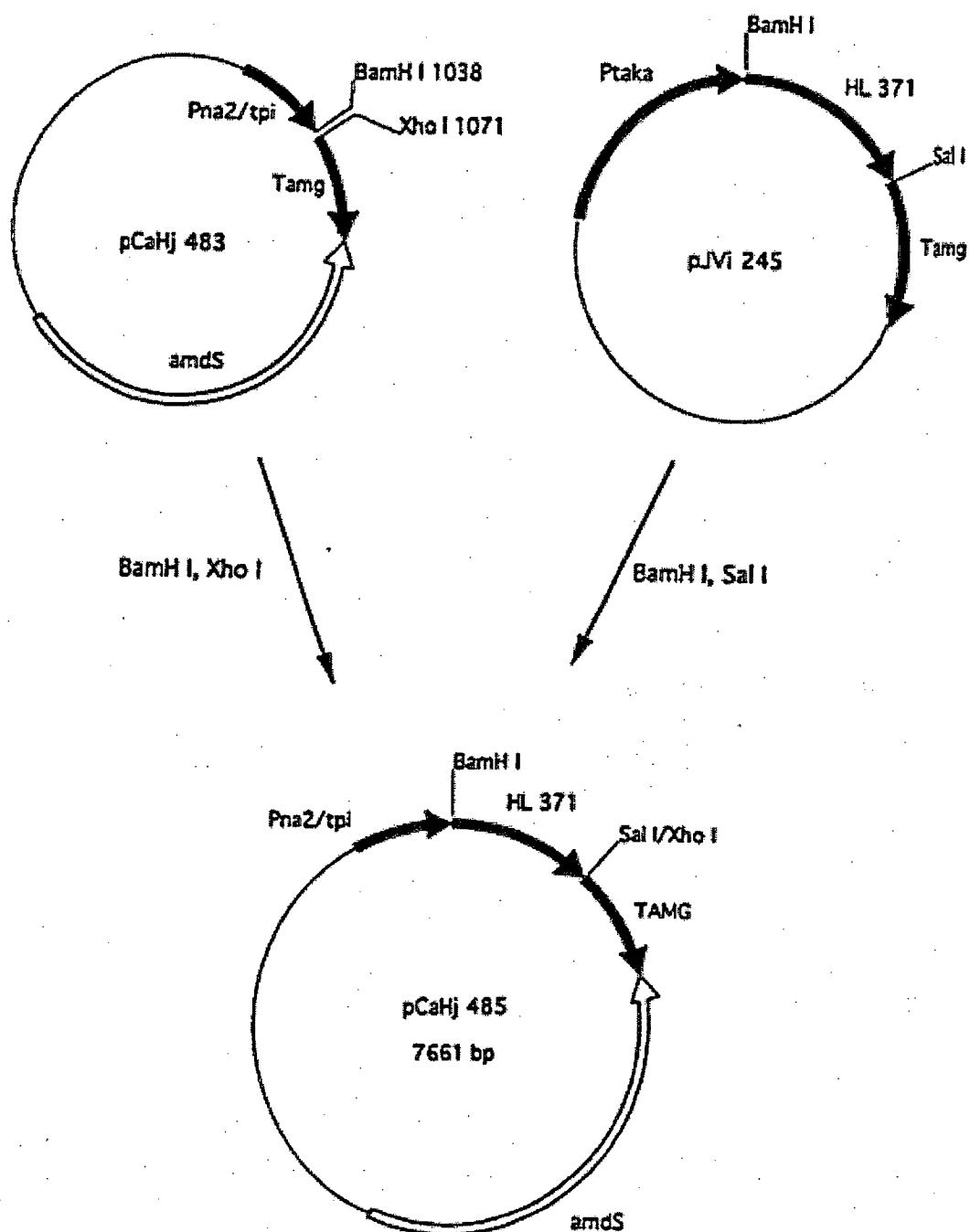


Fig. 9