



(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung: **10.04.1996 Patentblatt 1996/15** (51) Int Cl.⁶: **C12N 15/55, C12N 15/56, C12N 15/80, C12N 9/18, C12N 9/24**

(21) Anmeldenummer: **90101399.5**

(22) Anmeldetag: **24.01.1990**

(54) **Verfahren zur Expression von Polygalakturonidase und Pektinesterase in Aspergillus niger und Aspergillus awamori**

Method for the expression of polygalacturonidase and pectinesterase in *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*

Méthode par l'expression de polygalacturonidase et pectinestérase dans *Aspergillus niger* et *Aspergillus awamori*

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

(30) Priorität: **17.03.1989 DE 3908813**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
26.09.1990 Patentblatt 1990/39

(73) Patentinhaber: **RÖHM GMBH Chemische Fabrik D-64293 Darmstadt (DE)**

(72) Erfinder:
• **Ruttkowski, Edeltraud, Dr. D-6100 Darmstadt (DE)**

- **Nguyen, Quoc Khahn, Dipl.Ing.Dr. D-6100 Darmstadt (DE)**
- **Gottschalk, Michael, Dipl.Biol.Dr. D-6105 Ober-Ramstadt (DE)**
- **Jany, Klaus-Dieter, Prof.Dr. D-7031 Steinenbronn (DE)**
- **Löffler, Fridolin, Dipl.Chem.Dr. D-6140 Bensheim (DE)**
- **Piepersberg, Wolfgang, Prof.Dr. D-5600 Wuppertal (DE)**
- **Schuster, Erwin, Dr. D-6140 Bensheim-Auerbach (DE)**
- **Gassen, Hans Günter, Prof.Dr. D-6100 Darmstadt (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 222 279 EP-A- 0 271 988
EP-A- 0 324 399 DE-A- 3 044 455
FR-A- 2 021 772

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

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Isolierung und Identifizierung einer Desoxyribonucleinsäure aus *Aspergillus niger* sowie ein Verfahren zur Expression einer aus *Aspergillus* stammenden Pektinase in einem Wirtsorganismus.

Stand der Technik

Ein Verfahren zur Expression eines beispielsweise aus *Aspergillus niger* stammenden Gens in einem *Aspergillus oryzae* als Wirtsorganismus ist aus der EP-A 238 023 bekannt. Das Verfahren umfaßt die Schritte:

a) Erstellung eines rekombinanten DNA-Klonierungs-Vektorsystems, das die Fähigkeit zur ein- oder mehrfachen Integration in das Genom eines *Aspergillus oryzae* als Wirtsorganismus hat, enthaltend DNA-Sequenzen zur Gen-expression, ein geeignetes Marker-Gen zur Selektion von Transformanten, sowie eine DNA-Sequenz, die das zu exprimierende Gen darstellt;

b) Transformation des *Aspergillus oryzae*-Wirtsorganismus, der in Bezug auf das verwendete Marker-Gen selektierbar ist, mit dem gemäß (a) erstellten rekombinanten DNA-Klonierungs-Vektorsystem;

c) Vermehrung des transformierten *Aspergillus oryzae*-Wirtsorganismus in einem geeigneten Nährmedium.

Nach dem bekannten Verfahren lassen sich Glukamylasen, alpha-Amylasen, Lipasen und Proteinasen erzeugen, die u.a. vom Genom eines *Aspergillus niger* stammen können. Es wurde jedoch festgestellt, daß bei der Anwendung des Verfahrens zur Erzeugung von Pektinasen, insbesondere vom PE- und PG-Typ, nicht die erhoffte Ausbeuteverbesserung erreicht wird.

Aufgabe und Lösung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu finden, mit dem sich auch Pektinasen aus *Aspergillus niger* vorteilhaft exprimieren lassen. Dazu ist es erforderlich, die Desoxyribonucleinsäuren für die jeweilige Pektinase zu isolieren und zu identifizieren sowie ein Expressionssystem in Gestalt eines rekombinanten Mikroorganismus zur Gewinnung der Pektinase zu entwickeln. Überraschenderweise gelingt dies erfindungsgemäß durch eine Abwandlung des oben erwähnten bekannten Verfahrens, indem als Wirtsorganismus ein Schimmelpilz der Arten *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori* eingesetzt wird und im übrigen die aus dem Stand der Technik bekannte Arbeitsweise, wie in den Patentansprüchen angegeben, angewendet wird.

Zur Gruppe der Pektinasen gehören die Pektinesterase (PE), die mazerierende oder nicht-mazerierende Polygalacturonase (PG) und die Pektin-Transeliminase (PTE), die auch als Pektinlyase bezeichnet wird. Bevorzugt wird das Verfahren der Erfindung zur Erzeugung der PE oder der - vorzugsweise mazerierenden - PG angewandt. Unter den technisch verfügbaren Schimmelpilzen der Art *Aspergillus niger* sind hervorragende Pektinasebildner bekannt, so daß sich deren Genom für das Verfahren der Erfindung eignet. Eine Steigerung ihrer Produktivität läßt sich durch das Verfahren der Erfindung erreichen, insbesondere wenn das Pektinase-Gen mehrfach in das Genom des Wirtsorganismus inseriert wird.

Als Wirtsorganismus eignet sich außer *Aspergillus niger* auch *Aspergillus awamori*. Der erfindungsgemäß genmodifizierte Schimmelpilz kann in an sich bekannter Weise durch Anlegen einer Kultur und Aufarbeitung des Kulturfiltrats zur Produktion von Pektinasen eingesetzt werden.

Bevorzugte Ausführung der Erfindung

Beispiel 1: Expression eines Polygalacturonase-Gens

Der Stamm *Aspergillus niger* DSM 5575 als Gen-Donor wurde in einem 30 l-Fermenter mit 4 % Weizenkleie, 4 % feingemahlene Rübenschnitzeln und 0,2 % Ammoniumsulfat für 96 Stunden bei 28 Grad C, 1 VVM Belüftung und 600 Upm Rührergeschwindigkeit kultiviert.

Um auf der Grundlage der Proteinsequenz einer während der Fermentation gebildeten Polygalacturonase (PG) mit einem Molekulargewicht von ca. 38 000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von ca. 5,5 eine Oligonucleotid-Sonde zur Auffindung des Gens in einer cDNA-Bank von DSM 5575 ableiten zu können, wurde dieses Enzym aus dem Kulturüberstand gereinigt. Während der Reinigung wurde das Enzym anhand seiner Aktivität in Polygalacturonase (PG) -Einheiten gemäß der Technischen Information der Röhm GmbH Nr. FR-5-01-D vom 12.02.1987 sowie anhand der UV-Absorption bei 280 nm detektiert. Eine Polygalacturonase-Einheit ist definiert durch die Enzymaktivität, welche die

Viskosität einer Standard-Pektinlösung um $l/\eta_{sp} = 0,000015$ unter den Standardbedingungen der Analysenvorschrift senkt.

Dazu wurde der Fermentationsüberstand über ® Sephadex G25 Coarse (Pharmacia) entsalzt. Über Kationenaustauschchromatographie an ® Fractogel TSK CM-650 (Merck) bei pH 4,0 in 10 mM Natriumacetat/Acetat-Puffer, wurde die PG in einem linearen NaCl-Gradienten bei ca. 0,3 M eluiert.

Darauf folgt eine Gelfiltration über ® Sephacryl S 200 (Pharmacia), eine erneute Kationenaustauschchromatographie unter denselben Bedingungen wie oben genannt, jedoch mit ® Pharmacia Mono S als Gelmaterial. Die Endreinigung erfolgte durch nochmalige Gelfiltration über ® Sephacryl S 200 und ® Superose 12 (Pharmacia).

Ausgehend von dem gereinigten Enzym wurden nach Spaltungen mit Bromcyan, Trypsin und Staphylococcus V8 Protease Peptide präpariert und deren Aminosäuresequenzen unter Verwendung eines Gasphasensequenzators (Applied Biosystems Model 470A) bestimmt. Dabei wurde die Online Detektion der Peptide mit einer 120 A HPLC vorgenommen. Die Bromcyanspaltungen erfolgten nach Groß, E. (1967), Methods in Enzymology 11, 238 - 255, die Peptidtrennung wurde auf einer HPLC Reverse Phase C4-Säule in 0,1 % Trifluoressigsäure/Propanol/ Acetonitril-Gradienten durchgeführt. Tryptische Spaltungen und Spaltungen mit der Staphylococcus V8 Protease wurden in 20 mM Ammoniumbicarbonat bei pH 7,8 ausgeführt. Die entsprechenden Peptide wurden wiederum durch Reverse Phase HPLC-Chromatographie, jedoch mit einer C18-Säule getrennt. Die N-terminale Sequenz des nativen Proteins wurde direkt bestimmt. Sie lautet:

Gly-Ser-Cys-Thr-Phe-Lys-Thr-Ala-Ala-Ala-

Ala-Lys-Ala-Gly-Lys-Ala-Gly-Cys-Ser-Thr-

Ile-Thr-Leu-Asp-Asn-Ile-Glu-Val-Pro-Ala-

Eines der nach Bromcyan-Spaltung erhaltenen Peptide, CN7, wurde als Vorlage für die Synthese des Oligonukleotids ER13 verwendet. Die Aminosäure-Sequenz Ile-Gln-Gln-Asp-Tyr-Glu im Peptid CN7 war wegen des gering degenerierten genetischen Codes dieser Aminosäuren für die Ableitung eines Oligonukleotids geeignet. Zur Festlegung der Nukleotidsequenz im Oligonukleotid ER13 wurden die am häufigsten verwendeten Codons im Glucoamylase-Gen aus *A.niger*, Boel, E. et al. (1984), EMBO J. 3, 1097-1102, und im Acetamidase-Gen aus *A.nidulans*, Corrick, C.M. et al. (1987), Gene 53, 63 - 71, zugrundegelegt. Da in beiden Genen keine eindeutige Codonpräferenz für Asparaginsäure ermittelt werden konnte, wurden die beiden möglichen Codons in ER13 eingesetzt.

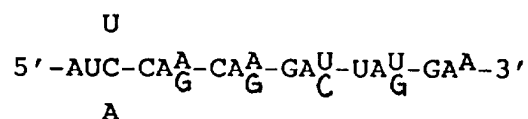
Aminosäuresequenz von CN7:

**Ser-Gly-Ile-Ser-Asp-Tyr-Gly-Val-Val-
Ile-Gln-Gln-Asp-Tyr-Glu-Asp-Gly-Lys**

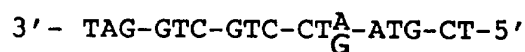
Ausgewählte Aminosäure-Sequenz für die Synthese von ER13:

Ile-Gln-Gln-Asp-Tyr-Glu

mögliche Codons:



Sequenz des Oligonukleotids ER13 komplementär zur RNA:



Zur Präparation von mRNA wurde der Stamm DSM 5575 in Schüttelkolben unter PG-induzierenden Bedingungen, mit 2 % Weizenkleie, 2 % feingemahlene Rübenschnitzeln und 0,1 % Ammoniumsulfat als Nährmedium für 96 Stunden auf einem Reziproschüttler bei 28 Grad C kultiviert. Das erhaltene Mycel wurde abfiltriert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die Präparation von RNA erfolgte nach der Guanidiniumisothiocyanat/CsCl-Methode nach Maniatis, E. et al. (1982), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Seite 196. Aus der so gewonnenen Gesamt-RNA wurde durch Säulenchromatographie an Oligo(dT)-Cellulose Poly(A)⁺-mRNA angereichert, Taylor, J.M. (1979), Ann. Rev. Biochem. 48,

681 - 717.

Aus der mRNA wurde nach Gubler, U. und Hoffmann, B.J. (1983), Gene 25, 263 - 269, cDNA synthetisiert. Hierbei wurden ca. 5 µg mRNA mit 60 U M-MLV Reverser Transkriptase (GIBCO-BRL GmbH, 7514 Eggenstein, BRD) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Aus 400 ng der einzelsträngigen cDNA konnten unter Verwendung von 0,4 U Ribonuklease H (GIBCO-BRD GmbH, 7514 Eggenstein, BRD) 10 U E. coli-DNA-Polymerase I (Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, BRD) und 0,9 U E. coli-DNA-Ligase (New England Biolabs GmbH Schwalbach, BRD) ca. 450 ng doppelsträngige cDNA gewonnen werden. Pufferzusammensetzungen und Nukleotidkonzentrationen entsprachen der Vorschrift von Gubler, U. und Hofmann, B.J. (1983), Gene 25, 263 - 269.

Zur Herstellung von glatten Enden wurden die cDNA-Enden mit Hilfe von 5 U T4-Polymerase (GIBCO-BRL GmbH, 7514 Eggenstein, BRD) und 50 µM Desoxy-nukleosidtriphosphaten nach Gubler, U. (1987), Methods in Enzymology Vol. 152, Seite 330 - 335, aufgefüllt. Zur Anreicherung von cDNA-Molekülen über 900 bp Länge wurde die cDNA über eine Biogel A50m-Säule nach Größe getrennt. Fraktionen, die cDNA-Moleküle über 1 kbp Länge enthielten wurden gesammelt. Zur Insertion der cDNA in dG-geteilten pUC9-Vektor (Pharmacia LKB GmbH, 7800 Freiburg, BRD) wurden 20 ng doppelsträngige cDNA mit über 1 kbp Länge mit einem 10⁴-fachen Überschuß an dCTP und 14,7 U terminaler Transferase (GIBCO-BRL GmbH, 7514 Eggenstein, BRD) für 7 min bei 37 Grad C in einem Gesamtvolumen von 40 µl inkubiert, Maniatis et al. (1982), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Seite 241, und so mit homopolymeren dC-Resten versehen.

5 ng dieser cDNA wurden nach Gubler, U. und Hoffmann, B.J. (1983), Gene 25, 263-269, in 50 ng des pUC9-Vektors eingefügt. Die Transformation des rekombinanten Vektors erfolgte in kompetente E. coli DH5αTM-Zellen (GIBCO-BRL GmbH, 7514 Eggenstein, BRD) nach den Angaben des Herstellers. Auf diese Weise wurde eine ca. 5000 rekombinante Klone umfassende cDNA-Bank von *Aspergillus niger* DSM 5575 erhalten.

Die *Aspergillus niger* cDNA-Bank wurde mit dem (32)P-markierten Oligonukleotid ER13 gescreent. Dabei erfolgte die Hybridisierung bei 37 Grad C; gewaschen wurde jeweils 30 min bei 37 Grad C in Gegenwart von 6-fach SSC-Puffer, dann 2-fach SSC-Puffer, 2-fach SSC-Puffer mit 1 % SDS und schließlich 0,1-fach SSC-Puffer. Nach Autoradiographie der Nitrocellulosefilter konnten drei stark hybridisierende E.coli-Klone identifiziert werden, deren Plasmide nach Restriktionsanalysen und partiellen DNA-Sequenzierungen zeigten, daß alle 3 Insertionen identisch waren. In Abbildung 1 sind die Restriktionsanalyse und das Sequenzierschema der PG-cDNA einer Transformante dargestellt. Das rekombinante Plasmid wurde mit pPG1 bezeichnet. Die Sequenzierung der vollständigen DNA-Sequenz der PG-cDNA erfolgte nach Sanger, F. et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, mit Hilfe von Universal- und PG-spezifischen Sequenzierprimern. Die erhaltene cDNA-Sequenz ist in Tabelle 1 angegeben.

Die aus der cDNA abgeleitete Aminosäure-Sequenz zeigt weitestgehende Übereinstimmung mit den aus der Proteinsequenzierung ermittelten Peptidsequenzen.

Um einen Phagen-Klon mit den zur Expression in *Aspergillus* notwendigen flankierenden Bereichen aus der chromosomalen DNA von DSM 5575 zu erhalten, wurde zunächst chromosomale DNA nach einer Vorschrift von Hynes, M.J. et al. (1983), Mol. Cell. Biol. 3, 1430 - 1439, isoliert. Hierzu wurden etwa 10 g Mycel unter flüssigem Stickstoff zerrieben und nach Aufnahme in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA und 3 % SDS mit Phenol extrahiert. Die weitere Reinigung der DNA erfolgte durch Behandlung mit Proteinase K und RNase A. Die erhaltene hochmolekulare DNA wurde partiell mit Sau3A hydrolysiert und durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nach ihrer Größe fraktioniert. DNA-Moleküle der Größe von 18 - 22 kb wurden in BamHI/EcoRI-hydrolysierte EMBL3-DNA (Stratagene GmbH, 6900 Heidelberg, BRD) inseriert und in vitro verpackt. Die Verpackungsextrakte wurden ebenfalls von Stratagene GmbH bezogen. Nach Vermehrung der Phagen in E.coli P2392 (Stratagene GmbH) konnte eine ca. 70 000 rekombinante Klone umfassende Phagenbank angelegt werden.

Die Phagen-DNA wurde nach Aufbringung auf Hybond-N-Membranen (Amersham Corp., Braunschweig) mit dem (32)P-markierten 1,3-kbp-PstI-Fragment aus pPG 1 gescreent. Die Hybridisierung erfolgte dabei bei 65 Grad C; gewaschen wurden die Filter jeweils 30 min bei 65 Grad C in 2-fach SSC-Puffer, dann 2-fach SSC-Puffer mit 1 % SDS und schließlich 0,1-fach SSC-Puffer. Aus ca. 70 000 rekombinanten EMBL3-Phagen wurden mehrere hybridisierende Klone erhalten. Aus einem davon wurde das einzige wiederum hybridisierende etwa 6 kb große HindIII-Fragment in pUC19 umklont und in E.coli DH5α transformiert. Das resultierende Plasmid, welches das vollständige chromosomale PG-Gen mit den zur Expression notwendigen flankierenden Sequenzen enthielt wurde als pPG67 bezeichnet. E.coli DH5α pPG67 wurde bei DSM unter der Nummer 5553 hinterlegt. Die Restriktionskarte von pPG67 ist in Abbildung 2 gezeigt. Die das Strukturgen sowie flankierende Bereiche aus pPG67 enthaltende DNA-Sequenz ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Stämme *Aspergillus niger* DSM 5575, *A. awamori* DSM 5574 und *A. oryzae* DSM 5573 wurden nach dem folgenden Protokoll transformiert.

100 ml Czapek-Dox-Komplett-Medium (Oxoid Czapek-Dox-Medium mit 0,1 % Hefeextrakt) in einem 1 Liter Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen wurden mit ca. 10⁷ Sporen des jeweiligen Pilzstammes beimpft und 16 Stunden bei 37 Grad C auf einem Reziproschüttler mit einer Frequenz von 120 Auslenkungen pro Minute inkubiert. Das Mycel wurde über ein Papierfilter geerntet und zweimal mit MP-Puffer (1,2 M MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) gewaschen. Etwa

5 g des feuchten Mycels wurden in 15 ml MP-Puffer in einem 100 ml Erlenmeyer-Kölbchen ohne Schikanen aufgenommen. Der Suspension wurden 600 µl einer @ Novozym 234-Lösung (1 g in 6 ml MP-Puffer) und 100 µl β-Glucuronidase (Sigma) zugesetzt und der Ansatz für 5 Minuten in Eis gekühlt. Anschließend wurden 300 µl einer Rinderserumalbumin-Lösung (0,2 g in 4 ml MP-Puffer) zugegeben. Die Protoplastierung des Mycels erfolgt bei 30 Grad C in einem Wasserbadrundschtüttler mit 12,5 mm Schütteldurchmesser bei 100 Umdrehungen pro Minute. Die Protoplastierungszeit betrug bei DSM 5575 und DSM 5574 ca. 3,5 bis 4 Stunden, bei DSM 5573 ca. 1,5 bis 2 Stunden. Der Protoplastierungszustand wurde mikroskopisch kontrolliert.

Die Protoplastensuspension wurde über ein mit MP-Puffer getränktes Glaswoll-Filter in Zentrifugenröhrchen gegeben und jeweils mit einem gleichen Volumen Ü-Puffer (600 mM Sorbitol, 100 mM Tris/HCl pH 7,0) überschichtet. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 20 Grad C und 2500 g wurden die Protoplasten aus der Schicht zwischen den beiden Pufferlösungen entnommen. Die erhaltene Suspension wurde nun mit zwei Volumina ST-Puffer (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) gemischt und 10 Minuten bei 20 Grad C und 1500 g zentrifugiert. Das Protoplastensediment wurde anschließend in 10 ml STC-Puffer (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂) aufgenommen und wiederum bei 20 Grad C und 1500 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt und das Sediment anschließend in 1 ml STC-Puffer resuspendiert.

Da das Plasmid pPG67 keine Selektionsmarker für die zu transformierenden Aspergillus-Stämme besitzt wurde die Methode der Cotransformation angewandt. Für *Aspergillus niger* DSM 5575 und *Aspergillus awamori* DSM 5574 wurde dazu das Plasmid pAN7-1 (Punt et al., Gene 56, 117 -124), das ein in diesen Stämmen exprimierbares Hygromycin-Resistenz-Gen (Hygromycin-Phosphotransferase) enthält, verwendet. Pro Cotransformationsansatz wurden je 20 µg pAN7-1 und die gleiche Menge pPG67 eingesetzt. Da *Aspergillus oryzae* DSM 5573 eine natürliche Resistenz gegenüber Hygromycin B aufweist, wurde dieser Stamm mit dem Plasmid p3SR2 (Kelly und Hynes, EMBO Journal 4, 475 - 479) cotransformiert, das eine Selektion der Transformanten durch einen Wachstumsvorteil auf Minimalmedium mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle durch die Expression eines Acetamidase-Gens ermöglicht. In den Cotransformationsansätzen wurden jeweils 40 µg p3SR2 und die gleiche Menge pPG67 eingesetzt.

Die zur Transformation eingesetzte DNA wurde in einem Volumen von 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Kontrollansätze erhielten jeweils 50 µl TE-Puffer ohne DNA, bzw. nur das Selektionsplasmid pAN7-1 oder p3SR2. 20 µl der DNA Lösung bzw. des TE-Puffers ohne DNA wurden zu 300 µl Protoplastensuspension gegeben und 10 Minuten bei 0 Grad C inkubiert. Nach nochmaliger Zugabe von 25 µl DNA-Lösung bzw. TE-Puffer ohne DNA und Zugabe von 400 µl PEG-Lösung (60 % Polyethylenglykol 4000 von Serva, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM CaCl₂) erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 22 Grad C. Anschließend wurden 600 µl der PEG-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 20 Minuten bei 22 Grad C inkubiert.

Im Falle der Hygromycin B-Selektion wurde der Ansatz in 100 ml Czapek-Dox-Agar (Oxoid mit 1 % Oxoid-Agar No. 1) mit 1 M Saccharose als osmotischem Stabilisator, der bei 45 Grad C flüssig gehalten wurde, gegeben und in jeweils 10 ml Portionen in Petrischalen verteilt. Nach 16 stündiger Inkubation bei 37 Grad C erfolgte die Hygromycin B (Calbiochem)-Zugabe in einer 10 ml Oberschicht des gleichen Agars jedoch ohne Saccharose in einer Konzentration von 200 µg/ml. Nach 2 - 4 Tagen weiterer Inkubation bei 37 Grad C konnten die Transformanten als aus der Agaroberfläche hervorbrechende versporende Kolonien, die sich deutlich von einem Hintergrundwachstum in der Agarschicht abhoben und in den Kontrollansätzen nicht vorhanden waren, identifiziert und isoliert werden. Die Transformanten wurden anschließend zweimal über Einzelsporpassagen auf Czapek-Dox-Agar mit 50 µg Hygromycin B/ml gereinigt. Die Ausgangsstämme DSM 5575 und DSM 5574 wachsen auf diesem Medium nicht. Die Transformationsraten lagen bei etwa 10 Transformanten pro µg pAN7-1 für DSM 5575 und bei etwa 20 Transformanten pro µg pAN7-1 für DSM 5574.

Im Falle der Acetamidase-Selektion wurde der Transformationsansatz mit STC-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 20 Grad C und 1500 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml STC-Puffer resuspendiert und anschließend mit 9 ml Acetamid-Minimal-Agar mit 1 M Saccharose als osmotischem Stabilisator bei 45 Grad C gemischt. Der Agar wurde in 2 ml Portionen auf Acetamid-Minimal-Agar-Platten mit 1 M Saccharose und 15 mM CsCl zur Inhibition des Hintergrundwachstums verteilt. Nach 6 - 12 Tagen konnten die Transformanten als kräftig wachsende und versporende Kolonien, die sich deutlich vom Hintergrundwachstum abheben, identifiziert und isoliert werden. Die Transformanten wurden durch zweimalige Einzelsporpassagen auf Acetamid-Minimalagar ohne CsCl und Saccharose gereinigt. Die Zusammensetzung des Acetamid-Minimal-Nährbodens entsprach der von Kelly und Hynes (siehe oben). Die Transformationsrate für *A. oryzae* DSM 5573 lag bei etwa 2,5 Transformanten pro µg p3SR2.

Aus den Transformationsversuchen und den Kontrollansätzen wurden jeweils 50 Transformanten in Schüttelkolben auf ihre PG-Produktivität hin untersucht. Dabei wurden die gleichen Bedingungen wie bei der Mycelanzucht zur mRNA-Isolierung (siehe oben) gewählt. In Tabelle 3 sind die in den Kulturüberständen gefundenen PG-Aktivitäten in Einheiten/ml der jeweils besten Transformante angegeben. Da die Cotransformationsfrequenz, gemessen an der Zahl der Klone, die den Ausgangsstamm um mindestens das doppelte an PG-Produktivität übertrafen, in allen drei Versuchen > 30 % lag, wurde der beste Klon aus mindestens 15 Transformanten ausgewählt. Da in den Kontrollansätzen keine Transformante die Produktivität des Ausgangsstammes übertraf gilt der angegebene Wert für alle 50 Stämme. Wegen der in Schüttelkolben von Versuch zu Versuch gegebenen Schwankungen sind Wertebereiche angegeben.

EP 0 388 593 B1

Die besten Resultate wurden demnach in *Aspergillus niger* DSM 5575 (Transformante Nr. 7) mit 240 - 270 PG-Einheiten/ml erzielt. In *Aspergillus awamori* DSM 5574 (Transformante Nr. 12) wurde mit 120 - 150 PG-Einheiten/ml ein besseres Ergebnis als in *Aspergillus oryzae* DSM 5573 (Transformante Nr. 4) mit 20 - 30 PG-Einheiten/ml erhalten.

Die folgenden Tabellen erläutern die Erfindung näher. Es zeigen

5

Tabelle 1 die Nucleotidsequenz der PG-cDNA aus *Asp. niger* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code. Start- und Stopcodon des offenen Leserahmens sind unterstrichen. Das N-terminale Ende (Aminosäuren 1 - 30) des nativen Proteins ist gekennzeichnet. Das Peptid CN7 ist durch Pfeile markiert. Die darin unterstrichenen Aminosäuren dienen zur Vorlage für die Synthese des Oligonukleotids ER13.

10

Tabelle 2 die Nucleotidsequenz des chromosomalen PG-Gens aus dem Plasmid pPG67 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code. Die N-terminale Sequenz der nativen PG ist unterstrichen. Ferner sind das Intron 1 sowie die Start- und Stopcodons markiert.

15

Tabelle 3 die in den Kulturüberständen gefundenen PG-Aktivitäten in Einheiten pro ml der jeweils besten Transformante.

Im 1-Buchstaben-Code werden folgende Codons verwendet:

20

A - Alanin, C - Cystein, D - Asparaginsäure, E - Glutaminsäure, F - Phenylalanin, G - Glycin, H - Histidin, I - Isoleucin, K - Lysin, L - Leucin, M - Methionin, N - Asparagin, P - Prolin, Q - Glutamin, R - Arginin, S - Serin, T - Threonin, V - Valin, W - Tryptophan, Y - Tyrosin.

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

TTTTTTCCTATCGCTATCATTGACC ATG CAC TCC TTT GCT TCT CTT
M H S F A S L
CTG GCC TAC GGC CTA GCC GCC AGC GCC ACC CTC GCT TCT GCC TCC CCC ATC GAA GCC CGG
L A Y G L A A S A T L A S A S P I E A R
GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA GCG GGC AAG GCA GGG TGC TCT ACC
G S C T F K T A A A A K A G K A G C S T
1 10 20
ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC
I T L D N I E V P A G T T L D L T G L T
15 30 40
AGC GGT ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA TGG GCA GGG
S G T K V I F E G T T T F D Y E E W A G
50 60
CCC TTG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC
P L I S M S G K D I T V T G A S G H L I
20 70 80
AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG
N C D G A R W W D G K G T S G K K K P K
90 100
TTC TTC TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC AAG AAC ACT
F F Y A H G L D S S S I T G L N I K N T
25 110 120
CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC ACT CTG ACT GAC ATT ACC ATC AAC
P L M A F S V Q A D D I T L T D I T I N
130 140
AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT
N A D G D T L G G H N T D A F D V G N S
30 150 160
GTC GGT GTG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT GCG ATC AAC
V G V N I I K P W V H N Q D D C L A I N
170 180
TCT GGC GAG AAC ATC TGG TTT ACC AGC GGC ACC TGC ATT GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC
S G E N I W F T S G T C I G G H G L S I
35 190 200
GGT TCT GTC GGC GGC CGC TCC AAC AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC
G S V G G R S N N V V K N V T I E H S T
210 220
GTG AGC AAT TCC GAG AAC GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT TCC GTG
V S N S E N A V R I K T V S G A T G S V
40 230 240
TCT GAG ATC ACA TAC TCC AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC
S E I T Y S N I V M S G I S D Y G V V I
250 <-----CN-7-----> 260
CAG CAG GAT TAC GAG GAT GGC AAG CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG
Q Q D Y E D G K P T G K P T N G V T I T
45 -----> 270 280
GAT GTC AAG CTG GAG AGC GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC TAT CTC
D V K L E S V T G T V D S K A T D I Y L
290 300
CTT TGC GGA TCT GGT AGC TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA
L C G S G S C S D W T W D D V K V T G G
50 310 320
AAG AAG TCT ACT GCT TGC AAA AAC TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC TAG GTTAGTAGGTTGTTT
K K S T A C K N Y P S V A S C STOP
330
GGTTGTAGCACTTGCTAACATGCAATTTGCCTTGAGGGGTCAAATGGATTGTGAAATTATCGGTCGAAAGAAGAGATGG
GTTCCAGTAAGATTTCAGTGGTGGCAGCGGTATAGCTCTATACAATGTATTATTCGCATAACTGTATATATCAAATAC
TCCATTAAAGAGAACC (A) 17

TABELLE 2

5

HindIII

ΔAGCTTTCAACCCTGATTAGCGAGCTTTGCACAC

10

TATTCCCAGATGATAGCTGTCGAAGGAACGGATGGACGCTGCACTAGTTTCATTTCGAATCTCTGATATTAATACTAACTA
 CAGAGTACTAGCCGATCACGCTCCCGATCTGGCACAGAGTGATTTTTTGAATCATTTCATTGGTGAATTTGCAAGGCA
 CCATAAATGCCGACAGCCCTGCATATCGAGCTACAGCCTTACTGGGATTAGTATAGCTGCCATCTCGTACTCGTACT
 GCAGAACCCGCTTGGATCCCAAGGCCTACGATGACACCCGTTTCTCCAGGACTGATGGCTGTTTGTGAAGGCGAATTA
 TAGTACTGCTTGTCAATGTCTTGAGTCAGCGGTATATATGAATCTGTCTTTGTCTTTCCACCTTGACAATAATGTTACG
 CTCGAAGAGGGCAATTTTGCCTTCTTTTCATCGACATGCGAACCTGTTCCGGTCACCCGCGGACCCCGTCGGCTGATCAGCC
 ACCACGGCTCATATATATTAGTTGCCACCATGTGCAACTTAAAGTTCATTAATAAAAAAGGTAACATTTGAGACAATATC
 TTAATGTGAAACGTGAACCCTGGACTAGCATCTCTCCAGAGGCTGTCCGGCAGTTATGACTTTCCGATCAGAAGAGATGC
 GCTGAAATGTGACTATAAGAACCCTCAAGCCTGCCGATGCTGAGGTGAGTTTGTCTCATCATCTACACTCATTGGCAT
 CAGACCGATTACACTCTTTTTGTCTTTTTTCTATCGCTATCATTGACC

15

20

ATG CAC TCC TTT GCT TCT CTT
 M H S F A S L
 CTG GCC TAC GGC CTA GCC GCC AGC GCC ACC CTC GCT TCT GGC TCC CCC ATC GAA GCC CGG
 L A Y G L A A S A T L A S A S P I E A R
 GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA GCG GGC AAG GCA GGG TGC TCT ACC
 G S C T F K T A A A A K A G K A G C S T

25

1 10 20
 ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC
 I T L D N I F V P A G T T L D L T G L T

30

30 40
 AGC GGT ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA TGG GCA GGG
 S G T K V I F E G T T T F D Y E E W A G

35

50 60
 CCC TTG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC
 P L I S M S G K D I T V T G A S G H L I

40

70 80
 AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG
 N C D G A R W W D G K G T S G K K K P K

45

90 100
 TTC TTC TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC AAG AAC ACT
 F F Y A H G L D S S S I T G L N I K N T

110 120
 CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC ACT CTG ACT GAC ATT ACC ATC AAC
 P L M A F S V Q A D D I T L T D I T I N

130 140
 AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT
 N A D G D T L G G H N T D A F D V G N S

150 160
 GTC GGT GTG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT GCG ATC AAC
 V G V N I I K P W V H N Q D D C L A I N

170 180
 TCT GGC GAG gtaagcagctttgaacatagatttgatttgcgatgtatggtgatatttatag AAC ATC TGG
 S G E <-----Intron 1-----> N I W

190 200
 TTT ACC AGC GGC ACC TGC ATT GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC GGT TCT GTC GGC GGC CGC
 F T S G T C I G G H G L S I G S V G G R

210 220
 TCC AAC AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC GTG AGC AAT TCC GAG AAC
 S N N V V K N V T I E H S T V S N S E N

230 240
 GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT TCC GTG TCT GAG ATC ACA TAC TCC
 A V R I K T V S G A T G S V S E I T Y S

55

AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC CAG CAG GAT TAC GAG GAT
 N I V M S G I S D Y G V V I Q Q D Y E D
 250 260
 5 GGC AAG CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG GAT GTC AAG CTG GAG AGC
 G K P T G K P T N G V T I T D V K L E S
 270 280
 GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC TAT CTC CTT TGC GGA TCT GGT AGC
 V T G T V D S K A T D I Y L L C G S G S
 290 300
 10 TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA AAG AAG TCT ACT GCT TGC
 C S D W T W D D V K V T G G K K S T A C
 310 320
 AAA AAC TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC TAG GTTAGTAGGTTGTTTCGGTTGTAGCACTTGCTAACATGCA
 K N Y P S V A S C STOP
 330
 15 TTTGCCTTGAGGGGTCAAATGGATTTGTGAAATTATCGGTGAAAGAAGAGATGGTGTCCAGTAAGATTCAGTGGTGGC

TABELLE 3

	PG-Einheiten/ml
1. <i>Aspergillus niger</i>	
DSM 5575 (Ausgangsstamm)	ca. 20 - 30
DSM 5575 pAN7-1 (Transformanten 1-50)	ca. 20 - 30
DSM 5575 pAN7-1/pPG67 (Transformante Nr. 7)	ca. 240 - 270
2. <i>Aspergillus awamori</i>	
DSM 5574 (Ausgangsstamm)	< 10
DSM 5574 pAN7-1 (Transformanten 1-50)	< 10
DSM 5574 pAN7-1/pPG67 (Transformante Nr. 12)	ca. 120 - 150
3. <i>Aspergillus oryzae</i>	
DSM 5573 (Ausgangsstamm)	< 10
DSM 5573 p3SR2 (Transformante 1-50)	< 10
DSM 5573 p3SR2/pPG67 (Transformante Nr. 4)	ca. 20 - 30

Beispiel 2: Expression eines Pektinesterase (PE)-Gens

Der Stamm *Aspergillus niger* DSM 5575 wurde in einem 30 l MBR-Fermenter mit 4 % Weizenkleie, 4 % feingemahl-
 40 len Rübenschneitzeln und 0,2 % Ammoniumsulfat für 96 Stunden bei 28 Grad C, 1 VVM Belüftung und 600 Upm
 Rührergeschwindigkeit kultiviert.

Um auf der Grundlage der Proteinsequenz einer während der Fermentation gebildeten Pektinesterase (PE) mit
 einem Molekulargewicht von ca. 43 000 Dalton und einem isoelektrischen Punkt von ca. 3,6 eine Oligonukleotid-Sonde
 zur Auffindung des Gens in einer cDNA-Bank von DSM 5575 ableiten zu können, wurde dieses Enzym aus dem Kul-
 45 turüberstand gereinigt. Während der Reinigung wurde das Enzym anhand seiner Aktivität in Pektinesterase (PE)-Ein-
 heiten gemäß der Technischen Information der Röhm GmbH Nr. FR-5-02-D vom 12.02.1987 sowie anhand der UV-Ab-
 sorption bei 280 nm detektiert. Die Methode beruht auf der Titration der bei der Spaltung von Pektin freigesetzten
 COOH-Gruppen mit n/10 NaOH bei konstantem pH-Wert. Bei Verwendung einer 1-%igen Obi-Pektinlösung (reines
 50 Apfelpektin, Braunband, hochverestert, Fa. Obipektin AG, Bischofszell/Schweiz) wird die Abbaukurve bis zu einem Ver-
 brauch von 2,5 ml n/10 NaOH gerade. Der pH-Wert bei der Verwendung von Obi-Pektin liegt bei 4,5. Die Aktivität wird
 in internationalen Einheiten angegeben.

Der Fermentationsüberstand wurde über @ Sephadex G25 Coarse (Pharmacia) entsalzt. Über Anionenaustausch-
 chromatographie an @ Fractogel TSK DEAE-650 (Merck) bei pH 8,0 in 10 mM Tris/HCl-Puffer, wurde die PE in einem
 linearen NaCl-Gradienten bei ca. 0,3 M eluiert. Darauf folgt eine Gelfiltration über @ Sephacryl S 200 HR (Pharmacia),
 55 eine erneute Anionenaustauscherchromatographie unter denselben Bedingungen wie oben genannt, jedoch mit @ Phar-
 macia Mono Q als Gelmaterial. Die Endreinigung erfolgte durch hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose
 CL 4B (Pharmacia).

Ausgehend von dem gereinigten Enzym wurden nach Spaltungen mit Bromcyan, Trypsin und Staphylococcus V8 Protease Peptide präpariert und deren Aminosäuresequenzen unter Verwendung eines Gasphasensequenzators (Applied Biosystems Model 470A) bestimmt. Dabei wurde die Online Detektion der Peptide mit einer 120 A HPLC vorgenommen. Die Bromcyanspaltungen erfolgten nach Groß, E. (1967), Methods in Enzymology 11, 238 - 255, die Peptidtrennung wurde auf einer HPLC Reverse Phase C4-Säule in 0,1 % Trifluoressigsäure/Propanol/ Acetonitril-Gradienten durchgeführt. Tryptische Spaltungen und Spaltungen mit der Staphylococcus V8 Protease wurden in 20 mM Ammoniumbicarbonat bei pH 7,8 ausgeführt. Die entsprechenden Peptide wurden wiederum durch Reverse Phase HPLC-Chromatographie, jedoch mit einer C18-Säule getrennt. Die N-terminale Sequenz des nativen Proteins wurde direkt bestimmt. Sie lautet:

Ala-Ser-Arg-Met-Thr-Ala-Pro-Ser-Gly-Ala-

Ile-Val-Val-Ala-Lys-Ser-Gly-Gly-Asp-Tyr-

Asp-Thr-Ile-Ser-Ala-Ala-

Eines der nach tryptischer Spaltung erhaltenen Peptide, T2-21, mit folgender N-terminaler Aminosäure-Sequenz wurde als Vorlage für die Synthese des Oligonukleotids PE 3 verwendet:

T2-21: Thr-Ser-Met-Thr-Asp-Val-Ile-Asn-His-Leu-Gly-Trp-Thr-Glu-Trp

Die Synthese der komplementären Nukleotidsequenz der Gensonde PE 3 erfolgte nach dem von Beaucage, S.L. und Caruthers, M.H. (1981), Tetrahedron Letters 22, 1859 - 1862, entwickelten Phosphoramiditverfahren und wurde mittels eines DNA-Synthesizers (Applied Biosystems 380 A DNA Synthesizer, California, USA) durchgeführt. Die Codon-Auswahl wurde nach den bekannten Codon-Präferenzen des Glucoamylase-Gens aus A.niger (Boel, E. et al. (1984), EMBO J. 3, 1097 - 1102) getroffen. Die Nukleotidsequenz wurde vom Aminosäurebereich Met bis Trp abgeleitet. Entsprechend lautet die komplementäre Nukleotidsequenz der Gensonde PE 3.

**PE 3: 3'-TAC TGG CTG CAG TAG TTG GTG GAG CCG ACC TGG
CTC ACC - 5'**

Zur Präparation von mRNA wurde der Stamm DSM 5575 in Schüttelkolben unter PE-induzierenden Bedingungen, mit 2 % Weizenkleie, 2 % feingemahlene Rübenschnitzeln und 0,1 % Ammoniumsulfat als Nährmedium für 96 Stunden auf einem Reziproschüttler bei 28 Grad C kultiviert. Das erhaltene Mycel wurde abfiltriert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die RNA-Präparation wurde nach der Methode von Chirgwin et al. (1979), Biochemistry 18, 5294 - 5299, durchgeführt. Die Isolierung von Poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA erfolgte durch eine Oligo(dT)-Celluloseaffinitätschromatographie (Avis, H. und Leder, P. (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408 - 1412): Die cDNA-Synthese wurde nach der Methode von Gubler, U. und Hoffmann, B.J. (1983) Gene 25, 263 - 269, modifiziert. Für die Synthese des ersten Stranges wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl 10 µg Poly(A)⁺-RNA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3 5 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 1,0 mM dNTP (je 1,0 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 µg Oligo (dT₁₂₋₁₈) und 2000 U M-MLV Reverse Transkriptase (Gibco-BRL GmbH, 7514 Eggenstein, BRD) eingesetzt. Es wurde für 60 min bei 37 Grad C inkubiert. Anschließend wurde phenolisiert und eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Für die Zweitstrangsynthese wurde das RNA/DNA-Hybrid in einem Reaktionsvolumen von 100 µl mit folgenden Komponenten versetzt: 2 U RNase H (Gibco-BRL GmbH, 7514 Eggenstein, BRD), 1 U E.coli DNA-Ligase (New England Biolabs GmbH, 6231 Schwalbach, BRD), 25 U DNA-Polymerase I (Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, BRD), 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 µM NAD, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM DTT; 5 µg BSA und 60 µM dNTP (je 60 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 14 Grad C und anschließend 1 Stunde bei 20 Grad C inkubiert.

Die cDNA-Fragmente einer Größe von 0,6 bis 1,7 kb wurden durch eine Biogel A50 (100 - 200 mesh)- Säurenchromatographie isoliert, in das mit Smal linearisierte und dephosphorylierte Plasmid pUC 18 inseriert und anschließend in kompetente E. coli DH5α -Zellen (Hanahan, D. (1985) in: Glover D.M. (ed.) DNA cloning: A practical approach Vol. 1, IRL Press Oxford, England, Seit 109 - 135) transformiert. Auf diese Weise wurde eine ca. 10 000 Klone umfassende cDNA-Bank von A. niger DSM 5575 erhalten.

Die cDNA-Klone wurden auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit der (32)P-markierten Gensonde PE 3 bei 50

Grad C für 18 Stunden hybridisiert. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Filter jeweils 30 min bei 68 Grad C mit 2-fach SSC-Puffer, 2-fach SSC-Puffer mit 0,1 % SDS und mit 0,2-fach SSC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde für 48 Stunden bei -70 Grad C eine Autoradiographie durchgeführt.

Insgesamt wurden 38 stark hybridisierende E. coli-Klone identifiziert, deren Plasmide zur weiteren Charakterisierung mittels Schnellpräparationsmethode (Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979), *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523) isoliert wurden. Die Plasmid-DNAs wurden mit EcoRI und HindIII hydrolysiert, die Fragmente elektrophoretisch getrennt, und anschließend wurde eine Southern-Hybridisierung mit der Gensonde PE 3 durchgeführt. Aufgrund der Southern-Blot-Analysen wurden 4 Klone mit einem cDNA-Insert zwischen 0,6 und 1,2 kb ausgewählt und doppelsträngig sequenziert. Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger, F. et al. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467, unter Verwendung von Universal- und PE-spezifischen Sequenzprimern durchgeführt. Vom längsten der 4 Klone sind die vollständige Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz in Tabelle 4 dargestellt. Das offene Leseraster umfaßt 993 Nukleotide und codiert für 331 Aminosäuren bzw. für 314 Aminosäuren ab der Übereinstimmung mit dem aus der Proteinsequenzierung erhaltenen N-Terminus. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pB98 (Abb. 3). Bis auf die 5 Aminosäuren in den Positionen 72, 275, 289, 290 und 292 stimmt die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz mit den aus der Proteinsequenzierung ermittelten Peptidsequenzen überein. Die restlichen 3 Klone waren 600 bis 1100 Nukleotide lang und stimmten vollkommen mit der DNA-Sequenz des Klones pB98 überein.

Um einen Phagen-Klon mit den zur Expression in *Aspergillus* notwendigen flankierenden Bereichen aus der chromosomalen DNA von DSM 5575 zu erhalten, wurde zunächst chromosomale DNA nach einer Vorschrift von Hynes, M.J. et al. (1983), *Mol. Cell. Biol.* 3, 1430 - 1439, isoliert. Hierzu wurden etwa 10 g Mycel unter flüssigem Stickstoff zerrieben und nach Aufnahme in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA und 3 % SDS mit Phenol extrahiert. Die weitere Reinigung der DNA erfolgte durch Behandlung mit Proteinase K und RNase A. Die erhaltene hochmolekulare DNA wurde partiell mit Sau3A hydrolysiert und durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nach ihrer Größe fraktioniert. DNA-Moleküle der Größe von 18 - 22 kb wurden im BamHI/EcoRI-hydrolysierte EMBL3-DNA (Stratagene GmbH, 6900 Heidelberg, BRD) inseriert und in vitro verpackt. Die Verpackungsextrakte wurden von Stratagene GmbH, 6900 Heidelberg, BRD, bezogen. Nach Vermehrung der Phagen in E. coli P2392 (Stratagene, 6900 Heidelberg, BRD) konnte eine ca. 70 000 rekombinante Klone umfassende Phagenbank angelegt werden.

Als radioaktive Probe für die Plaque-Hybridisierung wurde das 1,2-kbp-EcoRI/HindIII-Fragment des cDNA-Klones eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 Grad C; gewaschen wurden die Filter jeweils 30 min bei 68 Grad C in 2-fach SSC-Puffer, dann 2-fach SSC-Puffer mit 0,1 % und schließlich in 0,1-fach SSC-Puffer. Nach der Hybridisierung und mehrfacher Vereinzelnung ließen sich 10 positive Klone identifizieren.

Die Phagen-DNA von Klon 35 wurde präpariert und mit HindIII hydrolysiert. Sie wies nach der Southern-Hybridisierung ein positives Signal bei ca. 6,0 kbp auf. Das HindIII-Fragment wurde mittels LMP-Agarose-Gelelektrophorese isoliert und in pUC 18 umklont und in E.coli DH5 α transformiert. Das resultierende Plasmid, welches das vollständige chromosomale PE-Gen mit den zur Expression notwendigen flankierenden Sequenzen enthielt, wurde als pPE89 bezeichnet. Die Restriktionskarte von pPE89 ist in Abb. 4 dargestellt. Die das Strukturgen sowie flankierende Bereiche enthaltende DNA-Sequenz aus pPE89 wird in Tabelle 5 gezeigt. E.coli DH5 pPE89 wurde bei DSM unter der Nummer 5554 hinterlegt.

Transformationsprotokoll für *Aspergillus niger* DSM 5575, *Aspergillus awamori* DSM 5574 und *Aspergillus oryzae* DSM 5573.

100 ml Czapek-Dox-Komplett-Medium (Oxoid Czapek-Dox-Medium mit 0,1 % Hefeextrakt) in einem 1 Liter Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen wurden mit ca. 10^7 Sporen des jeweiligen Pilzstammes beimpft und 16 Stunden bei 37 Grad C auf einem Reziproschüttler mit einer Frequenz von 120 Auslenkungen pro Minute inkubiert. Das Mycel wurde über ein Papierfilter geerntet und zweimal mit MP-Puffer (1,2 M MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 5,8) gewaschen. Etwa 5 g des feuchten Mycels wurden in 15 ml MP-Puffer in einem 100 ml Erlenmeyer-Kölbchen ohne Schikanen aufgenommen. Der Suspension wurden 600 μ l einer ^RNovozym 234-Lösung (1 g in 6 ml MP-Puffer) und 100 μ l β -Glucuronidase (Sigma) zugesetzt und der Ansatz für 5 Minuten in Eis gekühlt. Anschließend wurden 300 μ l einer Rinderserumalbumin-Lösung (0,2 g in 4 ml MP-Puffer) zugegeben. Die Protoplastierung des Mycels erfolgt bei 30 Grad C in einem Wasserbadrandschüttler mit 12,5 mm Schütteldurchmesser bei 100 Umdrehungen pro Minute. Die Protoplastierungszeit betrug bei DSM 5575 und DSM 5574 ca. 3,5 bis 4 Stunden, bei DSM 5573 ca. 1,5 bis 2 Stunden. Der Protoplastierungszustand wurde mikroskopisch kontrolliert.

Die Protoplastensuspension wurde über ein mit MP-Puffer getränktes Glaswoll-Filter in Zentrifugenröhrchen gegeben und jeweils mit einem gleichen Volumen Ü-Puffer (600 mM Sorbitol, 100 mM Tris/HCl pH 7,0) überschichtet. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 20 Grad C und 2500 g wurden die Protoplasten aus der Schicht zwischen den beiden Pufferlösungen entnommen. Die erhaltene Suspension wurde nun mit zwei Volumina ST-Puffer (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5) gemischt und 10 Minuten bei 20 Grad C und 1500 g zentrifugiert. Das Protoplastensediment wurde anschließend in 10 ml STC-Puffer (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂) aufgenommen und wiederum bei 20 Grad C und 1500 g zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt und das Sediment anschließend in 1 ml STC-Puffer resuspendiert.

Da das Plasmid pPE89 keine Selektionsmarker für die zu transformierenden *Aspergillus*-Stämme besitzt wurde die Methode der Cotransformation angewandt. Für *Aspergillus niger* DSM 5575 und *Aspergillus awamori* DSM 5574 wurde dazu das Plasmid pAN7-1 (Punt et al., Gene 56, 117 -124), das ein in diesen Stämmen exprimierbares Hygromycin-Resistenz-Gen (Hygromycin-Phosphotransferase) enthält, verwendet. Pro Cotransformationsansatz wurden je 20 µg pAN7-1 und die gleiche Menge pPE89 eingesetzt. Da *Aspergillus oryzae* DSM 5573 eine natürliche Resistenz gegenüber Hygromycin B aufweist, wurde dieser Stamm mit dem Plasmid p3SR2 (Kelly und Hynes, EMBO Journal 4, 475 - 479) cotransformiert, das eine Selektion der Transformanten durch einen Wachstumsvorteil auf Minimalmedium mit Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle durch die Expression eines Acetamidase-Gens ermöglicht. In den Cotransformationsansätzen wurden jeweils 40 µg p3SR2 und die gleiche Menge pPE89 eingesetzt.

Die zur Transformation eingesetzte DNA wurde in einem Volumen von 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Kontrollansätze erhielten jeweils 50 µl TE-Puffer ohne DNA, bzw. nur das Selektionsplasmid pAN7-1 oder p3SR2. 20 µl der DNA Lösung bzw. des TE-Puffers ohne DNA wurden zu 300 µl Protoplastensuspension gegeben und 10 Minuten bei 0 Grad C inkubiert. Nach nochmaliger Zugabe von 25 µl DNA-Lösung bzw. TE-Puffer ohne DNA und Zugabe von 400 µl PEG-Lösung (60 % Polyethylenglykol 4000 von Serva, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM CaCl₂) erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 22 Grad C. Anschließend wurden 600 µl der PEG-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 20 Minuten bei 22 Grad C inkubiert.

Im Falle der Hygromycin B-Selektion wurde der Ansatz in 100 ml Czapek-Dox-Agar (Oxoid mit 1 % Oxoid-Agar No. 1) mit 1 M Saccharose als osmotischem Stabilisator, der bei 45 Grad C flüssig gehalten wurde, gegeben und in jeweils 10 ml Portionen in Petrischalen verteilt. Nach 16 stündiger Inkubation bei 37 Grad C erfolgte die Hygromycin B (Calbiochem)-Zugabe in einer 10 ml Oberschicht des gleichen Agars jedoch ohne Saccharose in einer Konzentration von 200 µg/ml. Nach 2 - 4 Tagen weiterer Inkubation bei 37 Grad C konnten die Transformanten als aus der Agaroberfläche hervorbrechende versporende Kolonien, die sich deutlich von einem Hintergrundwachstum in der Agarschicht abhoben und in den Kontrollansätzen nicht vorhanden waren, identifiziert und isoliert werden. Die Transformanten wurden anschließend zweimal über Einzelsporpassagen auf Czapek-Dox-Agar mit 50 µg Hygromycin B/ml gereinigt. Die Ausgangsstämme DSM 5575 und DSM 5574 wachsen auf diesem Medium nicht. Die Transformationsraten lagen bei etwa 10 Transformanten pro µg pAN7-1 für DSM 5575 und bei etwa 20 Transformanten pro µg pAN7-1 für DSM 5574.

Im Falle der Acetamidase-Selektion wurde der Transformationsansatz mit STC-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 20 Grad C und 1500 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml STC-Puffer resuspendiert und anschließend mit 9 ml Acetamid-Minimal-Agar mit 1 M Saccharose als osmotischem Stabilisator bei 45 Grad C gemischt. Der Agar wurde in 2 ml Portionen auf Acetamid-Minimal-Agar-Platten mit 1 M Saccharose und 15 mM CsCl zur Inhibition des Hintergrundwachstums verteilt. Nach 6 - 12 Tagen konnten die Transformanten als kräftig wachsende und versporende Kolonien, die sich deutlich vom Hintergrundwachstum abheben, identifiziert und isoliert werden. Die Transformanten wurden durch zweimalige Einzelsporpassagen auf Acetamid-Minimalagar ohne CsCl und Saccharose gereinigt. Die Zusammensetzung des Acetamid-Minimal-Nährbodens entsprach der von Kelly und Hynes (siehe oben). Die Transformationsrate für *A. oryzae* DSM 5573 lag bei etwa 2,5 Transformanten pro µg p3SR2.

Aus den Transformationsversuchen und den Kontrollansätzen wurden jeweils 50 Transformanten in Schüttelkolben auf ihre PE-Produktivität hin untersucht. Dabei wurden die gleichen Bedingungen wie bei der Mycelanzucht zur mRNA-Isolierung (siehe oben) gewählt. In Tabelle 6 sind die in den Kulturüberständen gefundenen PE-Aktivitäten in Einheiten/ml der jeweils besten Transformante angegeben. Da die Cotransformationsfrequenz, gemessen an der Zahl der Klone, die den Ausgangsstamm um mindestens das doppelte an PE-Produktivität übertrafen, in allen drei Versuchen > 30 % lag, wurde der beste Klon aus mindestens 15 Transformanten ausgewählt. Da in den Kontrollansätzen keine Transformante die Produktivität des Ausgangsstammes übertraf gilt der angegebene Wert für alle 50 Stämme. Wegen der in Schüttelkolben von Versuch zu Versuch gegebenen Schwankungen sind Wertebereiche angegeben.

Die besten Resultate wurden demnach in *Aspergillus niger* DSM 5575 (Transformante Nr. 9) mit 5,5 - 6,5 PE-Einheiten/ml erzielt. In *Aspergillus awamori* DSM 5574 (Transformante Nr. 17) wurde mit 2,5 - 3,0 PE-Einheiten/ml ein besseres Ergebnis als in *Aspergillus oryzae* DSM 5573 (Transformante Nr. 42) mit 0,8 - 1,0 PE-Einheiten/ml erhalten.

Die folgenden Tabellen erläutern die Erfindung näher. Es zeigen

Tabelle 4 die Nucleotidsequenz der PE-cDNA aus *Asp. niger* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code. Start- und Stopcodon des offenen Leserahmens sowie das N-terminale Ende (Aminosäuren 1 - 26) des nativen Proteins und die PE3-Gensonde sind gekennzeichnet.

Tabelle 5 die Nucleotidsequenz des chromosomalen PE-Gens aus dem Plasmid pPE89 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code. Die Introns 1 bis 6 sowie das Stopcodon sind gekennzeichnet.

Tabelle 6 die in den Kulturüberständen gefundenen PE-Aktivitäten in Einheiten pro ml der jeweils besten Transformante.

EP 0 388 593 B1

Die Mikroorganismen DSM 5553 (E.coli DH5 α pPG67), DSM 5554 (E.coli DH5 α pPE89), DSM 5573 (Asp.oryzae RH3011), DSM 5574 (Asp.awamori RH 3630) und DSM 5575 (Asp.niger RH 5344) wurden am 29. September 1989 bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig) gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE 4

5

-20

CGCCGATCAGTCGATCCITTAACAGCAATC

1 31 60
ATG GTT AAG TCA ATT CTT GCA TCC GTT CTC TTT GCA GCG ACC GCG CTG GCC GCG AGC CGC
 M V K S I L A S V L F A A T A L A A S R

10 91 120
ATG ACG GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT GCC AAG TCC GGA GGT GAC TAC GAC ACG ATC
M T A P S G A I V V A K S G G D Y D T I

N-Terminus
 151 180
 AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC AGC ACG ACT TCG ACC GAG ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG
S A A V D A L S T T S T E T Q T I F I E

211 240
 GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG TAT ATT CCC GCC CTC AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC
 E G S Y D E Q V Y I P A L S G K L I V Y

271 300
 GGT CAG ACT GAG GAC ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC ATC
 G Q T E D T T T Y T S N L V N I T H A I

331 360
 GCT TTG GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT GCA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA GGC
 A L A D V D N D D E T A T L R N Y A E G

391 420
 TCG GCC ATC TAC AAC CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC CAC CAG GCT CTC
 S A I Y N L N I A N T C G Q A C H Q A L

451 480
 GCC GTG AGC GCC TAT GCC AGC GAG CAG GGA TAC TAC GCC TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG
 A V S A Y A S E Q G Y Y A C Q F T G Y Q

511 540
 GAC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GGC TAC CAG GTT TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC
 D T L L A E T G Y Q V Y A G T Y I E G A

571 600
 GTC GAC TTC ATC TTT GGA CAG CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC GAC ATC CGC GTC
 V D F I F G Q H A R A W F H E C D I R V

631 660
 CTC GAG GGC CCC AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC GAG TCG GAC GAC
 L E G P S S A S I T A N G R S S E S D D

691 720
 TCT TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GAT GGC AAC GAT GTT TCC TCC
 S Y Y V I H K S T V A A A D G N D V S S

751 780
 GGC ACC TAC TAC CTC GGC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC TGC TTC CAG AAG ACC
 G T Y Y L G R P W S Q Y A R V C F Q K T

811 840
 TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC
S M T D V I N H L G W T E W S T S T P N

-----PE3-Gensonde-----
 871 900
 ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC GGC AAC ACC GGC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT
 T E N V T F V E Y G N T G T G A E G P R

931 960
 GCT AAC TTC TCT TCT GAG CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC
 A N F S S E L T E P I T I S W L L G S D

50 991 1000 1020
 TGG GAG GAC TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC TAA ACTTGTGTGAAAGTTGTAAGCTGGTTGGAGA
 W E D W V D T S Y I N STOP

1040 1060 1080 1100
 AGGGTCGTATATAGTGTGTGGATCTGTATATATGTGAGATGGAGATATAGCTAATTGTGGTTAGTTAATCACTGCTCA
 1120
 ATTCATTTCCAAGCAACTTTTTATTGGAAAAAAAAAAAA

55

EP 0 388 593 B1

TABELLE 5

5 -276 -198
AAGCTTCTTTGAACGCCCCACATTTGTCAACGGCCGGCCCAATTGCCTGACTTCTCCTAGTCTTCTCAGATATGGTTGT
-119
TCAAGCTGTGACAGAACCCCGCCGGCTCTCCACACGGAGTCTTGAACCTTATGAGGCAAATACTGACCCGATAACAAG
- 40
AGCTCATGATGAGTGGATGGCATGCGGTTCTTATAAGAACGAGGTCTCGCAGCGTTCACTGGTTCCTCCATCAGCAGCA
10 AAGTTAAATCGCCGATCAGTCGATCCTTAACAGCAATC ATG GTT AAG TCA ATT CTT GCA TCC GTT CTC
1 M V K S I L A S V L
90
TTT GCA GCG ACC GCG CTG GCC GCG AGC CGC ATG ACG GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT
F A A T A L A A S R M T A P S G A I V V
118 160
15 GCC AAG TCC GGA GGT GAC TAC GAC ACG GTAAGCATCTCCATTGTCGATCGCATGTTGCAGATGTTGGT
A K S G G D Y D T -----Intron1-----
222
GATAGTGTGGTGGACAG ATC AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC AGC ACG ACT TCG ACC GAG
----- I S A A V D A L S T T S T E
282
20 ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG TAT ATT CCC GCC CTC
T Q T I F I E E G S Y D E Q V Y I P A L
318 349
AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GA GTACGTTTGTGTTGCCCTTACGAAGTCGACG
S G K L I V Y G Q T E D -----Intron2-----
410
25 ATACTAAATTATCCTTIAG C ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC
----- T T T Y T S N L V N I T H A
448 476
ATC GCT TTG GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT G GTCAGTCTGCCAGACTGGAAGATATTCCT
I A L A D V D N D D E T ---Intron3-----
538
30 GATTCGCTAACGATACGCAG CA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA GGC TCG GCC ATC TAC AAC
----- A T L R N Y A E G S A I Y N
598
CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC CAC CAG GCT CTC GCC GTG AGC GCC TAT
L N I A N T C G Q A C H Q A L A V S A Y
645 661
35 GCC AGC GAG CAG GGA TAC TAC GCC TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG G GTAGGGCCAAATCCAGA
A S E Q G Y Y A C Q F T G Y Q -----Intron4-----
726
TATGACAATCTACAGTACTAATACCAGTATAG AC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GGC TAC CAG GTT
----- D T L L A E T G Y Q V
756 795
40 TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GT GTATGTCTCCCATCATACTTCAAAATGGTGAACACAGCT
Y A G T Y I E G A V -----Intron5-----
855
AACATAATCACCAG C GAC TTC ATC TTT GGA CAG CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC
----- D F I F G Q H A R A W F H E C
915
45 GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC
D I R V L E G P S S A S I T A N G R S S
975
GAG TCG GAC GAC TCT TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GAT GGC AAC
E S D D S Y Y V I H K S T V A A A D G N
1004 1044
50 GAT GTT TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC G GTATGCCACTAGCCTAGATTGCTCAAAAAGCTACTAGCCC
D V S S G T Y Y L -----Intron6-----
1105
ACTAACAATATITTTAG GC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC TGC TTC CAG AAG ACC
----- G R P W S Q Y A R V C F Q K T
1165
TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC
S M T D V I N H L G W T E W S T S T P N
1225
55 ACC GAG AAC GTC ACC ITT GTT GAA TAC GGC AAC ACC GGC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT

EP 0 388 593 B1

T E N V T F V E Y G N T G T G A E G P R
 1285
 GCT AAC TTC ICT TCT GAG CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC
 5 A N F S S E L T E P I T I S W L L G S D
 1322 1352
 TGG GAG GAC TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC TAA ACTTGTGTGAAAAGTTGTAAGCTGGTGGAGA
 W E D W V D T S Y I N STOP
 1431
 AGGGTCGTATATAGTGTGGATCTGTATATATGTGAGATGGAGATATAGCTAATTGTGGTTAGTTAATCACTGCTCA
 10 ATTCATTTGGAAGCAACTTTTTATTGGTGGACTTTTGTGCCGTGATTGGGAAAGGGACTAGACTGCAGTTGGAGTAATG
 1589
 CAGACTATCAGCAATAAAGTTAGCGTGTGTATTCCGAATGAGCTAACTAGTAACCACTCCTAATATGGAGTAGCACAGC
 1668
 ATAACTCTGCATCCTGCCACACACACTATCTTGTCTTCATAAAATCGCGTACTATTTACTCTCCATTCNAATCCACCTT
 1747
 CTCATATACTCTATACACCCACCCAACTGGCCCCGATAAACTAATATACCATGCCTACTCATAACCGAACCTTATTAATCA
 1826
 ACGTCCCAACACCCCAATCCTAACCCGAATATCATCCCCATCCCTGAGCACCACCCTCGGCTCTTTAAAGAAGCCAAT
 1905
 TCCCGCCGGCGTCCCGGTAAGAATAATAGTCCCGCCTCCAACGTCGTACCTTGTGACAGGTACGGATCGTCTTCTCT

TABELLE 6

	PE-Einheiten/ml
1. Aspergillus niger	
DSM 5575 (Ausgangsstamm)	ca. 0,1 - 0,2
DSM 5575 pAN7-1 (Transformanten 1-50)	ca. 0,1 - 0,2
DSM 5575 pAN7-1/pPE89 (Transformante Nr. 9)	ca. 5,5 - 6,5
2. Aspergillus awamori	
DSM 5574 (Ausgangsstamm)	< 0,1
DSM 5574 pAN7-1 (Transformanten 1-50)	< 0,1
DSM 5574 pAN7-1/pPE89 (Transformante Nr. 17)	ca. 2,5 - 3,0
3. Aspergillus oryzae	
DSM 5573 (Ausgangsstamm)	< 0,1
DSM 5573 p3SR2 (Transformante 1-50)	< 0,1
DSM 5573 p3SR2/pPE89 (Transformante Nr. 42)	ca. 0,8 - 1,0

Patentansprüche

1. Desoxyribonucleinsäure aus Aspergillus niger, deren Nucleotidsequenz Polygalakturonase oder Pektinesterase codiert, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Polygalakturonase folgende Nucleotidsequenz

EP 0 388 593 B1

5 GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA GCG GGC AAG GCA GGG TGC TCT ACC
 ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC
 AGC GGT ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA TGG GCA GGG
 CCC TTG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC
 AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG
 TTC TTC TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC AAG AAC ACT
 10 CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC ACT CTG ACT GAC ATT ACC ATC AAC
 AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT
 GTC GGT GIG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT GCG ATC AAC
 15 TCT GGC GAG AAC ATC TGG TTT ACC AGC GGC ACC TGC ATT GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC
 GGT TCT GTC GGC GGC CGC TCC AAC AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC
 GTG AGC AAT TCC GAG AAC GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT TCC GTG
 TCT GAG ATC ACA TAC TCC AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC
 20 CAG CAG GAT TAC GAG GAT GGC AAG CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG
 GAT GTC AAG CTG GAG AGC GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC TAT CTC
 CTT TGC GGA TCT GGT AGC TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA
 25 AAG AAG TCT ACT GCT TGC AAA AAG TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC

oder eine Nucleotidsequenz, die für die gleiche Aminosäuresequenz codiert, sich jedoch aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes von der gezeigten Nucleotidsequenz unterscheidet, besitzt, und die Pektinesterase folgende Nucleotidsequenz

30 GCG AGC CGC ATG ACG GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT GCC AAG TCC GGA
 GGT GAC TAC GAC ACG ATC AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC AGC ACG ACT TCG
 ACC GAG ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG
 35 TAT ATT CCC GCC CTC AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GAC
 ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC ATC GCT TTG
 GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT GCA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA
 GGC TCG GCC ATC TAC AAC CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC
 40 CAC CAG GCT CTC GCC GTG AGC GCC TAT GCC AGC GAG CAG GGA TAC TAC GCC
 TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG GAC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GGC TAC CAG
 GTT TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GTC GAC TTC ATC TTT GGA CAG
 CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC
 45 AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC GAG TCG GAC GAC TCT
 TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GAT GGC AAC GAT GTT
 TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC GGC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC
 TGC TTC CAG AAG ACC TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT
 50 GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC
 GGC AAC ACC GGC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT GCT AAC TTC TCT TCT GAG
 CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC TGG GAG GAC
 55 TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC

oder eine Nucleotidsequenz, die für die gleiche Aminosäuresequenz codiert, sich jedoch aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes von der gezeigten Nucleotidsequenz unterscheidet, besitzt.

2. Desoxyribonucleinsäure nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie aus *Aspergillus niger* DSM 5575 stammt.
- 5 3. Desoxyribonucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie Polygalakturonase aus *Aspergillus niger* DSM 5575 codiert.
4. Desoxyribonucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie Pektinesterase aus *Aspergillus niger* DSM 5575 codiert.
- 10 5. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Wirtsorganismus, welcher mit einem aus *Aspergillus* stammenden Polygalakturonase-Gen oder Pektinesterase-Gen transformiert ist, durch Klonieren eines rekombinanten Vektors, der das Polygalakturonase-Gen oder Pektinesterase-Gen sowie die zur Expression in *Aspergillus* notwendigen flankierenden Desoxyribonucleotid-Sequenzen enthält und Transformation des rekombinanten Vektors in einen Wirtsorganismus, dadurch **gekennzeichnet**, daß als Polygalakturonase-Gen oder Pektinesterase -Gen eine Desoxyribonucleinsäure aus *Aspergillus niger* nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eine entsprechende chromosomale Desoxyribonucleinsäure verwendet wird, und daß als Wirtsorganismus ein Schimmelpilz der Art *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori* eingesetzt wird.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß die folgenden Schritte durchgeführt werden:
- 20 (a) Kultivierung von *Aspergillus niger* unter Polygalakturonase- oder Pektinesterase-induzierenden Bedingungen,
- (b) Reinigung der Polygalakturonase oder Pektinesterase und partielle Sequenzierung der Proteine,
- 25 (c) Isolierung der Messenger-Ribonucleinsäuren aus den unter (a) kultivierten Zellen,
- (d) Erstellen einer Copy-Desoxyribonucleinsäurebank aus den Ribonucleinsäuren aus (c),
- 30 (e) Herstellung einer Oligodesoxyribonucleotidsonde, die aus der Proteinsequenz aus (b) abgeleitet wurde,
- (f) Klonieren der das Polygalakturonase-Gen oder das Pektinesterase-Gen enthaltenden Copy-Desoxyribonucleinsäure unter Verwendung der Oligodesoxyribonucleotidsonde aus (e) als Hybridisierungsprobe,
- 35 (g) Erstellen einer Genbank, die die chromosomale Desoxyribonucleinsäure des unter (a) verwendeten *Aspergillus*-Stammes enthält,
- (h) Klonieren eines rekombinanten Vektors aus der Genbank nach (g), welcher das chromosomale Polygalakturonase-Gen oder das Pektinesterase-Gen sowie zur Expression in *Aspergillus* notwendige flankierende Desoxyribonucleotid-sequenzen enthält, unter Verwendung der Copy-Desoxyribonucleinsäure aus (f) als Hybridisierungsprobe,
- 40 (i) Umklonieren des Polygalakturonase-Gens oder Pektinesterase-Gens sowie der zur Expression in *Aspergillus* notwendigen flankierenden Desoxyribonucleotid-Sequenzen in ein Plasmid,
- 45 (k) Cotransformation eines *Aspergillus-niger*- oder *Aspergillus-awamori*-Wirtsorganismus mittels des rekombinierten Vektors nach (i) und eines zweiten Plasmids, das einen in dem Wirtsorganismus exprimierbaren Selektionsmarker enthält,
- 50 (1) Selektion eines cotransformierten Stammes aus (k), dessen Polygalakturonase- oder Pektinesterase-Produktivität höher als die des unter (a) verwendeten *Aspergillus niger* ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß zur Herstellung des rekombinanten Wirtsorganismus eine chromosomale Desoxyribonucleinsäure, die Polygalakturonase aus *Aspergillus niger* codiert und folgende Nucleotidsequenz
- 55

AAGCTTCTTTGAAAGCCCCACATTGTCAACGGCCGGCCCAATTGCCTGACTTCTCCTAGTCTTCTCAGATATGGTTGT
 TCAAGCTGTGACAGAACCCCGCCGGCTCTCCACACGGAGGTCTGAACTTATGAGGCAAACTACTGACCGATAACAAG
 AGCTCATGATGAGTGGATGGCATGCGGTTCTATAAGAACGAGGTCTCGCAGCGTCACTGGTCTCCATCAGCAGCA
 5 AAGTTAAAATCGCCGATCAGTCGATCCTTAACAGCAATC ATG GTT AAG TCA ATT CTT GCA TCC GTT CTC

 TTT GCA GCG ACC GCG CTG GCC GCG AGC CGC ATG ACC GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT
 GCC AAG TCC GGA GGT GAC TAC GAC ACG gtaagcatctccattgtcgatcgcatgttgcagatgtgtggct
 -----INTRON 1-----
 10 gatagtgtttgcttggacag ATC AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC AGC ACC ACT TCG ACC GAG

 ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG TAT ATT CCC GCC CTC
 AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GA gtaacglltgcgttgccttaccgaagtgcagc
 -----INTRON 2-----
 15 atactaaatlalcccltag C ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC

 ATC GCT TTG GGC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT G gtaagctcgcctcctggaagatattcct
 -----INTRON 3-----
 20 gatttcgctaacgatalcgcag CA ACC CTC CGT AAC TAC GGT GAA GGC TCG GCC ATC TAC AAC

 CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC CAC CAG GGT CTC GCC GTG AGC GCC TAT
 GCC ACC GAG CAG GGA TAC TAC GCC TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG G gtagggccaatccaga
 -----INTRON 4-----
 25 latgacaalctadagtgactaalaccagtatag AC ACC CTT CTG GGT GAG ACC GGC TAC CAG GTT

 TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GT gtaatgtctccatcatalccclcaaatggtgaacacagct
 -----INTRON 5-----
 aacataalccaccag C GAC TTC ATC TTT GGA CAG CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC

 30 GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC
 GAG TCG GAC GAC TCT TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GGT GGT GGT GAT GGC AAC
 GAT GTT TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC G gtaalqccactagcclagatttcgctcaaaaagctactlagccc
 -----INTRON 6-----
 35 actaacaalalulllag GC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GGT CGC GTC TCG TTC CAG AAG ACC

 TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC
 ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC GGC AAC ACC GGC ACT GGC GGT GAG GGT CCC CGT
 40 GCT AAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC
 TGG GAG GAC TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC TAA ACTTGTGTGAAAGTCTTAAGCTGGTTGGAGA
 AGGGTCTGATATAGTGTGTGGATCTGTATATATGTGAGATGGAGATATAGCTAAATGTGGTATGTTAACTACTGCTCA
 ATTCATTTCCGAAGCAACTTTTTATTTGGTGGACTTTTGTGCCGTGATTCGGAAAGGGACTAGACTGCAGTTGGAGTAATG
 45 CAGACTATCACGAATAAAGTTAGCGTGTGTATTCGCAATGAGCTAACTAGTAACCACTCCTAAATGGAGTAGCACAGC
 ATAACCTTCGCATCCTGCCACACACACTATCTTGTCTTCATAAAATCGCGTACTATTTACTCTCCATTCAATCCACCTTC
 TCATATACTCTATACACCCACCCAACTGGCCCGATAAACTAAATATACCATGCCTACTCATACCGAACCTTATTAATCAA
 CGTCCCAACACCCCAATCCTAACCCGAATATCATCCCCATCCCTGAGCACCACCCTCGGCTCTTTAAAGAAGCCAAAT
 CCGCCGGCGTCCCGGTAAGAATATAGTCCCGCCTCCAACGTCGTACCTTGTGACAGGTACCCGATCGTCTTCTTC

50 oder eine Nucleotidsequenz, die für die gleiche Aminosäuresequenz codiert, sich jedoch aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes von der gezeigten Nukleotidsequenz unterscheidet, besitzt, verwendet wird.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Desoxyribonucleinsäure aus *Aspergillus niger* DSM 5575 stammt.

55 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Desoxyribonucleinsäure Polygalakturonase aus *Aspergillus niger* DSM 5575 codiert.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Desoxyribonucleinsäure Pektinesterase aus *Asper-*

gillus niger DSM 5575 codiert.

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 11, dadurch **gekennzeichnet**, daß als Wirtsorganismus die Schimmelpilzstämme *Aspergillus niger* DSM 5575 oder *Aspergillus awamori* 5574 eingesetzt werden.

13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch **gekennzeichnet**, daß das Pektinase-Gen mehrfach in das Genom des Wirtsorganismus inseriert wird.

14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß eine Desoxyribonucleinsäure eingesetzt wird, die eine mazerierende Polygalakturonase codiert.

15. Verfahren zur Herstellung von Polygalakturonase oder Pektinesterase, dadurch **gekennzeichnet**, daß der nach mindestens einem der Ansprüche 5 bis 14 erhaltene rekombinante Wirtsorganismus in einem geeigneten Nährmedium vermehrt wird und die Polygalakturonase oder Pektinesterase in an sich bekannter Weise isoliert wird.

Claims

1. Deoxyribonucleic acid from *Aspergillus niger*, the nucleotide sequence of which encodes polygalacturonase or pectinesterase, characterised in that the polygalacturonase comprises the following nucleotide sequence

GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA GCG GGC AAG GCA GGG TGC TCT ACC
 ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC
 AGC GGT ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA TGG GCA GGG
 CCC TIG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC
 AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG
 TTC TTC TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC AAG AAC ACT
 CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC ACT CTG ACT GAC AAT ACC ATC AAC
 AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT
 GTC GGT GIG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT GCG ATC AAC
 TCT GGC GAG AAC ATC TGG TTT ACC ACG GGC ACC TGC ATT GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC
 GGT TCT GTC GGC GGC CGC TCC AAC AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC
 GTG ACG AAT TCC GAG AAC GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT TCC GTG
 TCT GAG ATC ACA TAC TCC AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC
 CAG CAG GAT TAC GAG GAT GGC AAG CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG
 GAT GTC AAG CTG GAG ACG GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC TAT CTC
 CTT TGC GGA TCT GGT ACG TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA
 AAG AAG TCT ACT GCT TGC AAA AAG TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC

or a nucleotide sequence which encodes for the same amino acid sequence but which differs from the indicated nucleotide sequence due to the degeneracy of the genetic code, and which encodes pectinesterase of the following nucleotide sequence

5 GCG AGC CGC ATG ACG GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT GCC AAG TCC GGA
 GGT GAC TAC GAC ACG ATC AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC ACG ACG ACT TCG
 ACC GAG ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG
 10 TAT ATT CCC GCC CTC AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GAC
 ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC ATC GCT TTG
 GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT GCA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA
 GGC TCG GCC ATC TAC AAC CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC
 CAC CAG GCT CTC GCC GTG AGC GCC TAT GCC AGC GAG CAG GGA TAC TAC GCC
 15 TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG GAC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GGC TAC CAG
 GTT TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GTC GAC TTC ATC TTT GGA CAG
 CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC
 AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC GAG TCG GAC GAC TCT
 TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GCT GAT GGC AAC GAT GTT
 20 TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC GGC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC
 TGC TTC CAG AAG ACC TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT
 GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC
 GGC AAC ACC GGC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT GCT AAC TTC TCT TCT GAG
 CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC TGG GAG GAC
 25 TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC

or a nucleotide sequence which encodes for the same amino acid sequence but which differs from the indicated nucleotide sequence due to the degeneracy of the genetic code.

- 30
2. Deoxyribonucleic acid according to claim 1, characterised in that it originates from *Aspergillus niger* DSM 5575.
 3. Deoxyribonucleic acid according to claim 1 or 2, characterised in that it encodes polygalacturonase from *Aspergillus niger* DSM 5575.
 - 35 4. Deoxyribonucleic acid according to claim 1 or 2, characterised in that it encodes pectinesterase from *Aspergillus niger* DSM 5575.
 - 40 5. A method of producing a recombinant host organism, which is transformed with a polygalacturonase gene or pectinesterase gene originating from *Aspergillus*, by cloning a recombinant vector which contains the polygalacturonase gene or pectinesterase gene and contains the flanking deoxyribonucleotide sequences necessary for expression in *Aspergillus*, and transformation of the recombinant vector into a host organism, characterised in that a deoxyribonucleic acid from *Aspergillus niger* according to any one of claims 1 to 4 or a corresponding chromosomal deoxyribonucleic acid is used as the polygalacturonase gene or pectinesterase gene, and that a **fungus of the *Aspergillus niger* or *Aspergillus awamori* type is used as the host organism.**
 - 45 6. A method according to claim 5, characterised in that the following steps are carried out:
 - (a) cultivation of *Aspergillus niger* under polygalacturonase-inducing or pectinesterase-inducing conditions,
 - (b) purification of the polygalacturonase or pectinesterase and partial sequencing of the proteins,
 - 50 (c) isolation of the messenger ribonucleic acids from the cells cultivated in (a),
 - (d) preparation of a copy deoxyribonucleic acid bank from the ribonucleic acids from (c),
 - 55 (e) preparation of an oligodeoxyribonucleic acid **probe** which has been derived from the protein sequence from (b),
 - (f) cloning the copy deoxyribonucleic acid containing the polygalacturonase gene or the pectinesterase gene

using the oligodeoxyribonucleic acid **probe** from (e) as a hybridisation specimen,

(g) preparation of a gene bank which contains the chromosomal deoxyribonucleic acid of the *Aspergillus* strain used in (a),

5

(h) cloning a recombinant vector from the gene bank according to (g), which contains the chromosomal polygalacturonase gene or the pectinesterase gene and which contains the flanking deoxyribonucleotide sequences necessary for expression in *Aspergillus*, using the copy deoxyribonucleic acid from (f) as the hybridisation specimen,

10

(i) transcloning the polygalacturonase gene or pectinesterase gene and the flanking deoxyribonucleotide sequences necessary for expression in *Aspergillus* into a plasmid,

(k) cotransformation of an *Aspergillus niger* or *Aspergillus awamori* host organism by means of the recombinant vector according to (i) and a second plasmid which contains a selection marker which can be expressed in the host organism,

15

(l) selecting a cotransformed strain from (k), the polygalacturonase or pectinesterase productivity of which is higher than the *Aspergillus niger* used in (a).

20

7. A method according to claim 5 or 6, characterised in that a chromosomal deoxyribonucleic acid which encodes polygalacturonase from *Aspergillus niger* and which comprises the following nucleotide sequence

25

30

35

40

45

50

55

AAGCTTTC AACCCCTGATTAGCGAGCTTTGCACACTATTCCCGATGTAGCTGTCTGAAGGAACGGAT
 GGACGCTGCACTAGTTTCATTTTCGAATCTCTGATATTAATACTAACTACAGAGTGACTA
 GCCGATCACGCTCCGGATCTGGCACAGAGTGATTTTTTTGAATCATTTCATTGGTGGAAAT
 5 TGCAAGGCACCATAAATGCCGCAGACCCTGCATATCGAGCTACAGCCTTACTGGGATTA
 GTATAGCTGCCATCTCGTACTCGTACACTGCAGAACC GGCTTGGATCCCAAGGCCTACG
 ATGACACCCGTTTTCTCCAGGACTGATGGCTGTTTGTGAAGGCGAATTATAGTACTGCT
 TGTC AATGTCTTGAGTCAGCGGTATATATGAATCTGTCTTTGTCTTTCCACCTTGACAA
 10 TAATGTTACGCTCAAGAGGGCATTTTGCGTTC TTTTCATCGACATGCGAACCTGTTCCG
 TCACCCCGCGACCCCGTCCGGCTGATCAGCCACCACGGCTCATATATATAGTTGCCAC
 CATGTCTGAACCTAAGTTCATTA AAAAAAAAAAGTAAACATTTGAGACAATATCTTAATGTGA
 AACGTGAACCCTGGACTAGCATCTCTCCAGAGGCTGTCCGGCAGTTATGACTTTCCGATC
 AGAAGAGATGCGCTGAAATTTGACTATAAGAACCCTCAAGCCTGCCGATGCTGAGGTGA
 15 GTTTGCTCATCATCCTACACTCATTTGGCATCAGACCGATTACACTCTTTTGTCTTTT
 TTTTCTATCGCTATCATTGACC ATG CAC TCC TTT GCT TCT CTT CTG GCC
 TAC GGC CTA GCC GCC AGC GCC ACC CTC GCT TCT GCC TCC CCC ATC
 GAA GCC CGG GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA
 20 GCG GGC AAG GCA GGG TGC TCT ACC ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA
 GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC AGC GGT
 ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA
 TGG GCA GGG CCC TTG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC
 ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG
 25 TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG TTC TTC
 TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC
 AAG AAC ACT CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC
 ACT CTG ACT GAC ATT ACC ATC AAC AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG
 GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT GTC GGT
 30 GTG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT
 GCG ATC AAC TCT GGC GAG gtaagcagctttgaacatagatttgatttgcattg
 <-----INTRON 1----->
 tatgttgatattctatag AAC ATC TGG TTT ACC AGC GGC ACC TGC ATT
 ----->
 35 GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC GGT TCT GTC GGC GGC CGC TCC AAC
 AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC GTG AGC AAT
 TCC GAG AAC GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT
 TCC GTG TCT GAG ATC ACA TAC TCC AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC
 TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC CAG CAG GAT TAC GAG GAT GGC AAG
 40 CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG GAT GTC AAG
 CTG GAG AGC GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC
 TAT CTC CTT TGC GGA TCT GGT AGC TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC
 GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA AAG AAG TCT ACT GCT TGC AAA AAC
 TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC TAG GTTAGTAGGTTGTTCCGGTTGTAGCAC
 45 TTGCTAACATGCATTTGCCTTGAGGGGTCAAATGGATTTGTGAAATATCGGTGGAAAG
 AAGAGATGGTGTCCAGTAAGATTTCAGTGGTGGC

or a nucleotide sequence which encodes for the same amino acid sequence but which differs from the indicated
 nucleotide sequence due to the degeneracy of the genetic code, is used for the production of the recombinant host
 50 organism.

8. A method according to claim 5 or 6, characterised in that a chromosomal deoxyribonucleic acid which encodes
 pectinesterase from *Aspergillus niger* and which comprises the following nucleotide sequence

55

AAGCTTCTTTGACGCCCCACATTGTCAACGGCCGGCCCAATTGCCTGACTTCTCCTAGTCTTCTCAGATATGGTTGT
 TCAAGCTGTGACAGAACCCCGCGGCTCCACACGGAGGTCCTGAACTTATGAGGCAAACTACTGACCGATAACAAG
 ACCTCATGATGAGTGGATGGCATGGCGTTCCCTATAAGAACGAGGTCCTCCAGCGTTCACTGGTTCCTCCATCAGCAGCA
 5 AAGTTAAAATCGCCGATCAGTCGATCCTTAAACAGCAATC ATG GTT AAG TCA ATT CTT GCA TCC GTT CTC

 TTT GCA GCG ACC GCG CTG GCC GCG AGC CGC ATG ACC GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT
 GCC AAG TCC GGA GGT GAC TAC GAC ACG gtaagcatctccattgtcgcacgcagatgtgagatgtgagct
 10 gatagtgtttgcttgacag ATC AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC ACC ACC ACT TCG ACC GAG
 -----INTRON 1-----
 ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG TAT ATT CCC GCC CTC
 AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GA gtacglttgcgttgccttacgaagtcgacg
 15 atactaaattatccctag C ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC
 -----INTRON 2-----
 ATC GCT TTG GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT G gtcagctctccagactggaagatattcct
 -----INTRON 3-----
 20 gatttccgctaacgatacgcag CA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA GCC TCG GCC ATC TAC AAC
 -----INTRON 4-----
 CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC CAC CAG GCT CTC GCC GTG ACC GCC TAT
 GCC ACC GAG CAG GGA TAC TAC GCC TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG G gtagggccaaatccaga
 25 latgacaatctacagtgaactaataccagtatag AC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GCC TAC CAG GTT
 -----INTRON 5-----
 TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GT gtaatgctcccaacataccttcaaaatggtgaacacagct
 -----INTRON 6-----
 aacataatcaccag C GAC TTC ATC TTT GGA CAG CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC
 30 GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC
 GAG TCG GAC GAC TCT TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GAT GGC AAC
 GAT GTT TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC G gtaatgccaactagcctagattcgtcaaaaagctactagccc
 35 actaacaatatatttag GC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC TGC TTC CAG AAG ACC
 -----INTRON 7-----
 TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC
 ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC GGC AAC ACC GCC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT
 40 GCT AAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC
 TGG GAG GAC TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC TAA ACTTGTGTGMAAGTTCTAAGCTGGTTGGAGA
 AAGGTCTGATATAGTGTGTGGATCTGTATATATGTGAGATGGAGATATAGCTAAATGTGGTTAGTTAACTACTGCTCA
 ATTCATTTCCGAAGCAACTTTTATTTGGTGGACTTTTGTGCCGTGATTTGGGAAAGGGACTAGACTGCAGTTGGAGTAACT
 45 CAGACTATCAGGAATAAAGTTAGCGTGTGTATTCGCAATGAGCTAACTAGTAACCACCTCCTAATATGGAGTAGCACAGC
 ATAACTCTGCATCCTGCCACACACACTATCTTGTCTTCAATAAATCGCGTACTATTTACTCTCCATTCAATCCACCTTC
 TCATATACTCTATACACCCACCCAACTGGCCCGATAAACTAAATATACCATGCCCTACTCATAACCGAACCTTATTAATCAA
 CGTCCCAACACCCCAATCCTAACCCGAATATCATCCCAATCCCTGAGCACCACCCTCGGCTCTTTAAAGAAAGCCAAAT
 CCGCCCGCGTCCCGTAAGAATAATAGTCCCGGCTCCAAACGTCGTACCTTGTGACAGGTACCGGATCGTCTTCTTC

50 or a nucleotide sequence which encodes for the same amino acid sequence but which differs from the indicated nucleotide sequence due to the degeneracy of the genetic code, is used for the production of the recombinant host organism.

9. A method according to at least one of claims 5 to 8, characterised in that the deoxyribonucleic acid originates from
 55 Aspergillus niger DSM 5575.

10. A method according to claim 9, characterised in that the deoxyribonucleic acid encodes polygalacturonase from
 Aspergillus niger DSM 5575.

11. A method according to claim 9, characterised in that the deoxyribonucleic acid encodes pectinesterase from *Aspergillus niger* DSM 5575.
- 5 12. A method according to at least one of claims 5 to 11, characterised in that the fungus strains *Aspergillus niger* DSM 5575 or *Aspergillus awamori* 5574 are used as the host organism.
13. A method according to at least one of claims 5 to 12, characterised in that the pectinase gene is multiply-inserted into the genome of the host organism.
- 10 14. A method according to at least one of claims 5 to 13, characterised in that a deoxyribonucleic acid is used which encodes a macerating polygalacturonase.
- 15 15. A method of producing polygalacturonase or pectinesterase, characterised in that the recombinant host organism obtained according to at least one of claims 5 to 14 is propagated in a suitable nutrient medium and the polygalacturonase or pectinesterase is isolated in a manner known in the art.

Revendications

- 20 1. Acide désoxyribonucléique d'*Aspergillus niger* dont la séquence nucléotidique est codante pour une polygalacturonase ou une pectine-estérase, caractérisé en ce que la polygalacturonase possède la séquence nucléotidique suivante

25 GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA GCG GGC AAG GCA GGG TGC' TCT ACC
 ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC
 AGC GGT ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA TGG GCA GGG
 CCC TTG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC
 30 AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG
 TTC TTC TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC AAG AAC ACT
 CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC ACT CTG ACT GAC ATT ACC ATC AAC
 AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT
 35 GTC GGT GIG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT GCG ATC AAC
 TCT GGC GAG AAC ATC TGG TTT ACC AGC GGC ACC TGC ATT GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC
 GGT TCT GTC GGC GGC CGC TCC AAC AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC
 40 GTG AGC AAT TCC GAG AAC GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT TCC GTG
 TCT GAG ATC ACA TAC TCC AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC
 CAG CAG GAT TAC GAG GAT GGC AAG CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG
 GAT GTC AAG CTG GAG AGC GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC TAT CTC
 45 CTT TGC GGA TCT GGT AGC TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA
 AAG AAG TCT ACT GCT TGC AAA AAG TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC

50 ou une séquence nucléotidique qui est codante pour la même séquence d'amino-acides, mais qui se différencie de la séquence nucléotidique indiquée sur la base de la dégénération du code génétique, et la pectine-estérase possède la séquence nucléotidique suivante

55

GCG AGC CGC ATG ACG GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT GCC AAG TCC GGA
 GGT GAC TAC GAC ACG ATC AGC GCT GCC GIT GAT GCT CTC AGC ACG ACT TCG
 5 ACC GAG ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG
 TAT ATT CCC GCC CTC AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GAC
 ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC ATC GCT TTG
 GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT GCA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA
 10 GGC TCG GCC ATC TAC AAC CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC
 CAC CAG GCT CTC GCC GTG AGC GCC TAT GCC AGC GAG CAG GGA TAC TAC GCC

TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG GAC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GGC TAC CAG
 15 GTT TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GTC GAC TTC ATC TTT GGA CAG
 CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC
 AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC GAG TCG GAC GAC TCT
 TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GAT GGC AAC GAT GTT
 20 TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC GGC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC
 TGC TTC CAG AAG ACC TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT
 GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC
 25 GGC AAC ACC GGC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT GCT AAC TTC TCT TCT GAG
 CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC TGG GAG GAC
 TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC

30 ou une séquence nucléotidique qui est codante pour la même séquence d'acides-amino, mais qui se différencie de la séquence nucléotidique indiquée sur la base de la dégénération du code génétique.

2. Acide désoxyribonucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il provient d'*Aspergillus niger* DSM 5575.
3. Acide désoxyribonucléique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est codant pour la polygalacturonase d'*Aspergillus niger* DSM 5575.
4. Acide désoxyribonucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est codant pour la pectine-estérase d'*Aspergillus niger* DSM 5575.
5. Procédé de préparation d'un organisme hôte recombinant qui est transformé avec un gène de polygalacturonase ou avec un gène de pectine-estérase d'*Aspergillus*, par clonage d'un vecteur recombinant qui contient le gène de polygalacturonase ou le gène de pectine-estérase, ainsi que les séquences encadrantes de désoxyribonucléotides nécessaires à leur expression dans *Aspergillus*, et transformation du vecteur recombinant dans un organisme hôte, caractérisé en ce qu'on utilise, comme gène de polygalacturonase ou comme gène de pectine-estérase, un acide désoxyribonucléique d'*Aspergillus niger* selon l'une des revendications 1 à 4 ou un acide désoxyribonucléique chromosomique correspondant, et qu'on utilise, comme organisme hôte, un hyphomycète de l'espèce *Aspergillus niger* ou *Aspergillus awamori*.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'on effectue les étapes suivantes :
 - (a) mise en culture d'*Aspergillus niger* dans des conditions d'induction de polygalacturonase ou de pectine-estérase,
 - (b) purification de la polygalacturonase ou de la pectine-estérase et séquençage partiel des protéines,
 - (c) isolement des acides ribonucléiques messagers à partir des cellules cultivées en (a),
 - (d) production d'une banque d'acide désoxyribonucléique-copie à partir des acides ribonucléiques obtenus en (c),
 - (e) préparation d'une sonde d'oligodésoxyribonucléotides qu'on obtient à partir de la séquence protéique obtenue en (b),

(f) clonage de l'acide désoxyribonucléique-copie contenant le gène de polygalacturonase ou le gène de pectine-estérase en utilisant la sonde d'oligo-désoxyribonucléotides obtenue en (e), comme sonde d'hybridation,

5 (g) production d'une banque de gènes qui contient l'acide désoxyribonucléique chromosomique de la souche d'*Aspergillus* utilisée en (a),
 (h) clonage d'un vecteur recombinant à partir de la banque de gènes selon (g), qui contient le gène chromosomique de polygalacturonase ou le gène de pectine-estérase, ainsi que les séquences encadrantes de désoxyribonucléotides nécessaires à l'expression dans *Aspergillus*, en utilisant l'acide désoxyribonucléique-copie provenant de (f), comme sonde d'hybridation,

10 (i) clonage du gène de polygalacturonase ou du gène de pectine-estérase ainsi que des séquences encadrantes de désoxyribonucléotides nécessaires à l'expression dans *Aspergillus*, dans un plasmide,

(k) cotransformation d'un organisme hôte d'*Aspergillus niger* ou d'*Aspergillus awamori* au moyen du vecteur recombinant selon (i) et d'un deuxième plasmide qui contient un marqueur de sélection pouvant être exprimé dans l'organisme hôte,

15 (l) sélection d'une souche cotransformée obtenue en (k) dont le rendement en polygalacturonase ou en pectine-estérase est supérieur à celui de l'*Aspergillus niger* utilisé en (a).

7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que, pour la préparation de l'organisme hôte recombinant, on utilise un acide désoxyribonucléique chromosomique qui est codant pour la polygalacturonase d'*Aspergillus niger* et possède la séquence nucléotidique suivante

20

**AAGCTTTC AACCTGATTAGCGAGCTTTGCACACTATTCCCGATGTAGCTGTCTGAAGGAACGGAT
 GGACGCTGCACTAGTTTCATTTCGAATCTCTGATATTAATACTA ACTACAGAGTGACTA
 GCCGATCACGCTCCGGATCTGGCACAGAGTGATTTTTTGAATCATTTCATTGGTGGAAATT
 25 TGCAAGGCACCATAAATGCCGACAGCCCTGCATATCGAGCTACAGCCTTACTGGGATTA
 GTATAGCTGCCATCTCGTACTCGTACACTGCAGAACC GGCTTGGATCCCAAGGCCTACG
 ATGACACCCGTTTCCCTCCAGGACTGATGGCTGTTTGTGAAGGCGAATTATAGTACTGCT
 TGTC AATGCTTGAGTCAGCGGTATATATGAATCTGTCTTTGTCTTTCCACCTTGACAA
 TAATGTTACGCTCAAGAGGGCATT TTTGCGTCTTTTTCATCGACATGCGAACCTGTTCGG
 30 TCACCCGCGGACCCCGTCGGCTGATCAGCCACCACGGCTCATATATATTAGTTGCCAC
 CATGTCTGAACCTTAAGTTCATTA AAAAAAAGGTAACATTTGAGACAATATCTTAATGTGA
 AACGTGAACCCTGGACTAGCATCTCTCCAGAGGCTGTCCGGCAGTTATGACTTTCCGATC
 AGAAGAGATGCGCTGAAATTGTGACTATAAGAACCCTCAAGCCTGCCGATGCTGAGGTGA
 GTTTGCTCATCATCCCTACACTCATT TGGC ATCAGACCGATTACACTCTTTTGTCTTTT
 35 TTTTCTATCGCTATCATTGACC ATG CAC TCC TTT GCT TCT CTT CTG GCC
 TAC GGC CTA GCC GCC AGC GCC ACC CTC GCT TCT GCC TCC CCC ATC
 GAA GCC CGG GGA AGC TGC ACC TTC AAA ACG GCT GCT GCT GCC AAA
 GCG GGC AAG GCA GGG TGC TCT ACC ATC ACC CTT GAC AAC ATC GAA
 GTC CCC GCT GGA ACC ACC CTC GAC CTG ACC GGT CTC ACC AGC GGT
 40 ACG AAG GTC ATC TTC GAG GGC ACC ACG ACC TTC GAT TAT GAA GAA
 TGG GCA GGG CCC TTG ATC TCC ATG AGT GGC AAA GAT ATC ACC GTC
 ACT GGT GCC TCA GGC CAT CTC ATC AAC TGC GAC GGT GCG CGG TGG
 TGG GAC GGC AAG GGG ACC AGC GGA AAG AAG AAG CCC AAG TTC TTC
 TAC GCT CAT GGC CTT GAC TCC TCG TCC ATT ACT GGA TTG AAT ATC**

45

50

55

5 AAG AAC ACT CCC CTT ATG GCG TTT AGT GTT CAG GCG GAT GAC ATC
 ACT CTG ACT GAC ATT ACC ATC AAC AAC GCG GAC GGT GAT ACC CTG
 GGT GGA CAC AAC ACT GAT GCG TTT GAT GTT GGT AAC TCT GTC GGT
 GTG AAT ATC ATC AAA CCG TGG GTC CAT AAC CAG GAT GAC TGT CTT
 GCG ATC AAC TCT GGC GAG gtaagcagctttgaacatagatttgatttgcag
 <-----INTRON 1----->
 10 tatggtgatattctatag AAC ATC TGG TTT ACC AGC GGC ACC TGC ATT
 ----->
 GGC GGC CAC GGT CTC TCC ATC GGT TCT GTC GGC GGC CGC TCC AAC
 AAC GTT GTC AAG AAC GTC ACT ATC GAA CAC TCC ACC GTG AGC AAT
 TCC GAG AAC GCC GTC CGG ATT AAG ACC GTC TCT GGT GCC ACT GGT
 15 TCC GTG TCT GAG ATC ACA TAC TCC AAC ATT GTC ATG TCC GGC ATC
 TCC GAT TAC GGC GTC GTT ATC CAG CAG GAT TAC GAG GAT GGC AAG
 CCT ACG GGT AAG CCC ACG AAC GGT GTC ACT ATT ACG GAT GTC AAG
 CTG GAG AGC GTG ACT GGT ACT GTG GAT AGT AAG GCT ACT GAT ATC
 TAT CTC CTT TGC GGA TCT GGT AGC TGC TCG GAC TGG ACT TGG GAC
 20 GAT GTG AAG GTC ACT GGA GGA AAG AAG TCT ACT GCT TGC AAA AAC
 TAC CCT TCG GTG GCT TCT TGC TAG GTTAGTAGTTGTTCCGGTTGTAGCAC
 TTGCTAACATGCATTTGCCTTGAGGGGTCAAATGGATTTGTGAAATTATCGGTGGAAG
 AAGAGATGGTGTCCAGTAAGATTCAGTGGTGGC

25 ou une séquence nucléotidique qui est codante pour la même séquence d'acides-amino, mais qui se différencie de la séquence nucléotidique indiquée sur la base de la dégénération du code génétique.

- 30 8. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que, pour la préparation de l'organisme hôte recombinant, on utilise un acide désoxyribonucléique chromosomique qui est codant pour la pectine-estérase d'*Aspergillus niger* et possède la séquence nucléotidique suivante

35 AAGCTTCTTTGAACGCCCCACATTGTCAACGGCCGGCCCAATTGCCTGACTTCTCCTAGTCTTCTCAGATATGGTTGT
 TCAAGCTGTGACAGAACCCCGCGGTCTCCACACGGAGGTCCTGAACCTTATGAGGCAATACTGACCGATAACAAG
 AGCTCATGATGAGTGGATGGCATGCGGTTCTATAAGAACGAGGTCTCGCAGCGTTCACTGGTTCTCCATCAGCAGCA
 AAGTTAAATCGCCGATCAGTCGATCCTTAACAGCAATC ATG GTT AAG TCA ATT CTT GCA TCC GTT CTC
 40 TTT GCA GCG ACC GCG CTG GCC GCG AGC CGC ATG ACG GCT CCT TCC GGT GCG ATT GTT GTT
 GCC AAG TCC GGA GGT GAC TAC GAC ACG gtaagcactctccattgtcgcagtcgcatggtgcagatgtgtggct
 -----INTRON 1-----
 gatagtgtttgcttgacag ATC AGC GCT GCC GTT GAT GCT CTC AGC ACG ACT TCG ACC GAG

 ACC CAG ACC ATC TTC ATT GAG GAG GGA TCC TAC GAC GAG CAG GTG TAT ATT CCC GCC CTC
 45 AGT GGA AAG CTG ATT GTC TAC GGT CAG ACT GAG GA gtacglttgcgltgccccttacgaagtcgacg
 -----INTRON 2-----
 atactaaattatccttag C ACT ACC ACC TAC ACC AGC AAC CTG GTC AAC ATC ACC CAC GCC

50

55

ATC GCT TTG GCC GAT GTC GAC AAT GAC GAT GAG ACT G gtcagtctgccagactggaagatattcct
 ---INTRON 3---
 5 gatttcgctaacgatacgcag CA ACC CTC CGT AAC TAC GCT GAA GGC TCG GCC ATC TAC AAC
 CTC AAC ATT GCC AAC ACC TGC GGT CAG GCC TGC CAC CAG GCT CTC GCC GTG AGC GCC TAT
 GCC AGC GAG CAG GGA TAC TAC GCC TGC CAG TTC ACC GGA TAC CAG G gtagggccaaatccaga
 -----INTRON 4---
 10 tatgacaatctacagtgactaataaccagtatag AC ACC CTT CTG GCT GAG ACC GGC TAC CAG GTT
 TAC GCC GGA ACC TAC ATC GAG GGT GCC GT gtatgtctcccatcataccttcaaaatggtgaacacagct
 -----INTRON 5---
 aacataalcaccag C GAC TTC ATC TTT GGA CAG CAC GCC CGC GCC TGG TTC CAC GAG TGC
 15 GAC ATC CGC GTC CTC GAG GGC CCC AGC TCC GCC TCC ATC ACC GCC AAC GGC CGC TCC TCC
 GAG TCG GAC GAC TCT TAC TAC GTG ATC CAC AAG TCC ACC GTC GCT GCT GAT GGC AAC
 GAT GTT TCC TCC GGC ACC TAC TAC CTC G gtatgccactagcctagattcgcctcaaaaagctactagccc
 -----INTRON 6---
 20 actaacaatatatttag GC CGC CCC TGG TCC CAG TAC GCT CGC GTC TGC TTC CAG AAG ACC
 TCC ATG ACC GAT GTG ATC AAC CAC CTC GGC TGG ACT GAG TGG TCG ACC TCC ACC CCC AAC
 ACC GAG AAC GTC ACC TTT GTT GAA TAC GGC AAC ACC GGC ACT GGC GCT GAG GGT CCC CGT
 25 GCT AAC TCC TCT TCT GAG CTG ACT GAG CCC ATC ACT ATC TCT TGG CTT CTC GGA TCT GAC
 TGG GAG GAC TGG GTT GAT ACT AGC TAC ATC AAC TAA ACTTGTGTGAAAGTTCTAAGCTGGTTGGAGA
 AGGGTCGTATATAGTGTGTTGTGGATCTGTATATATGTGAGATGGAGATATAGCTAATTGTGGTtagttaaactactgctca
 ATTCATTTCGAAGCAACTTTTTATTGGTGGACTTTTGTGCCGTGATTGGGAAGGGACTAGACTGCAGTTGGAGTAATG
 30 CAGACTATACCGAATAAAGTTAGCGTGTGATTCCGAATGAGCTAACTAGTAACCACTCCTAATATGGAGTAGCACAGC
 ATAACTCTGCATCCTGCCACACACTATCTTGTCTTCATAAATCGCGTACTATTTACTCTCCATTCAATCCACCTTC
 TCATATACTCTATACACCCACCCAACTGGCCCGATAAACTAATATACCATGCCCTACTCATACCGAACCTTATTAATCAA
 CGTCCCAACACCCCAATCCTAACCCGAATATCATCCCCATCCCTGAGCACCACCCTCGGCTCTTTAAAGAAGCCAATT
 CCGCCGGCGTCCCGTAAGAATAATAGTCCCGGCTCCAACGTCGTACCTTGTGACAGGTACGGGATCGTCTTCTTC

35 ou une séquence nucléotidique qui est codante pour la même séquence d'acides-amino, mais qui se différencie de la séquence indiquée sur la base de la dégénération du code génétique.

9. Procédé selon au moins une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que l'acide désoxyribonucléique provient d'*Aspergillus niger* DSM 5575.
- 40 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'acide désoxyribonucléique est codant pour la polygalacturonase d'*Aspergillus niger* DSM 5575.
11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'acide désoxyribonucléique est codant pour la pectine-estérase d'*Aspergillus niger* DSM 5575.
- 45 12. Procédé selon au moins une des revendications 5 à 11, caractérisé en ce qu'on utilise, comme organisme hôte, les souches d'hyphomycètes *Aspergillus niger* DSM 5575 ou *Aspergillus awamori* 5574.
- 50 13. Procédé selon au moins une des revendications 5 à 12, caractérisé en ce que le gène de pectinase est inséré plusieurs fois dans le génome de l'organisme hôte.
14. Procédé selon au moins une des revendications 5 à 13, caractérisé en ce qu'on utilise un acide désoxyribonucléique qui est codant pour une polygalacturonase en macération.
- 55 15. Procédé de préparation d'une polygalacturonase ou d'une pectine-estérase, caractérisé en ce que l'organisme hôte recombinant obtenu selon au moins une des revendications 5 à 14 s'accroît dans un milieu nutritif approprié, et on isole la polygalacturonase ou la pectine-estérase d'une manière connue en soi.

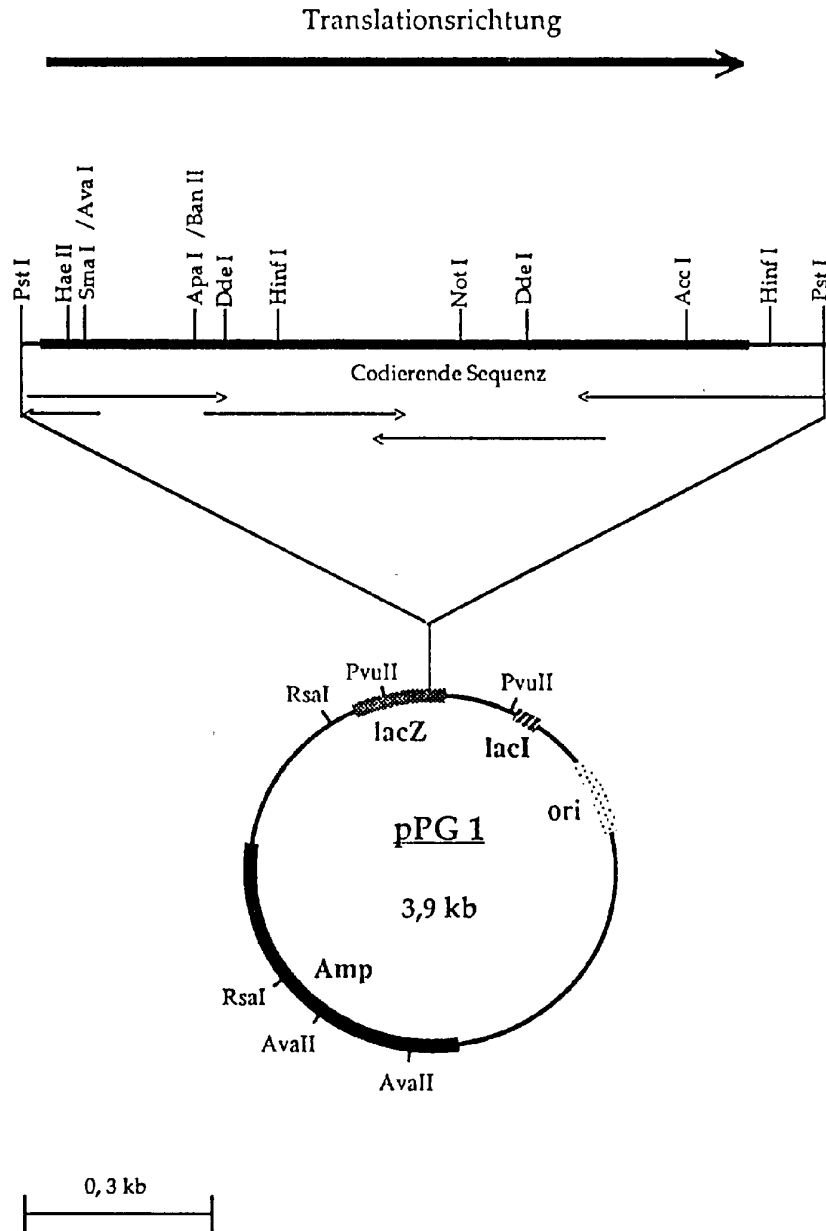


Abbildung 1: Restriktionskarte und Sequenzierschema der PG-cDNA. Pfeile geben die Sequenzierrichtungen an. Die Sequenzierungen wurden mit Universal und PG-spezifischen Primern durchgeführt.

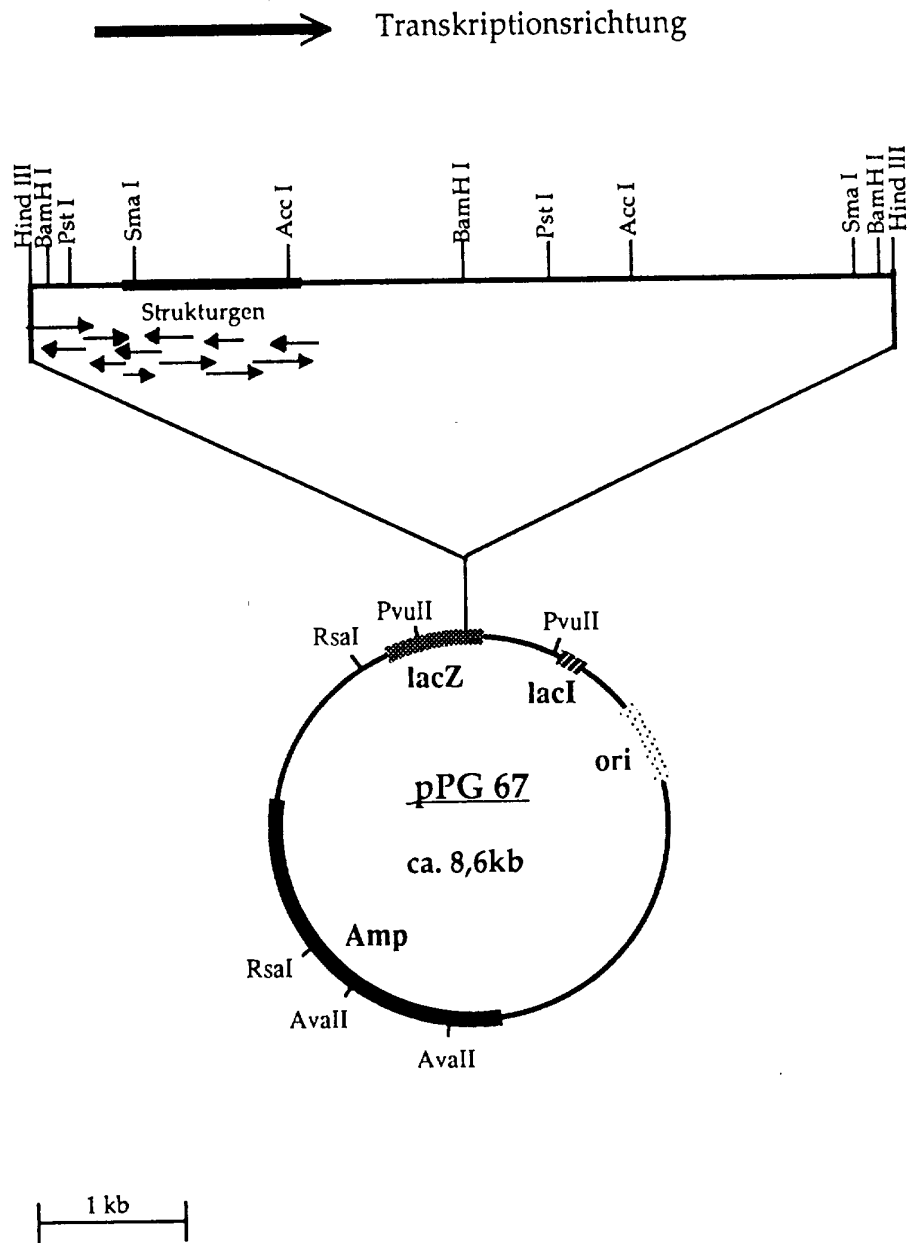


Abbildung 2: Restriktionskarte des chromosomalen PG-Gens mit flankierenden Bereichen im Plasmid pPG 67.

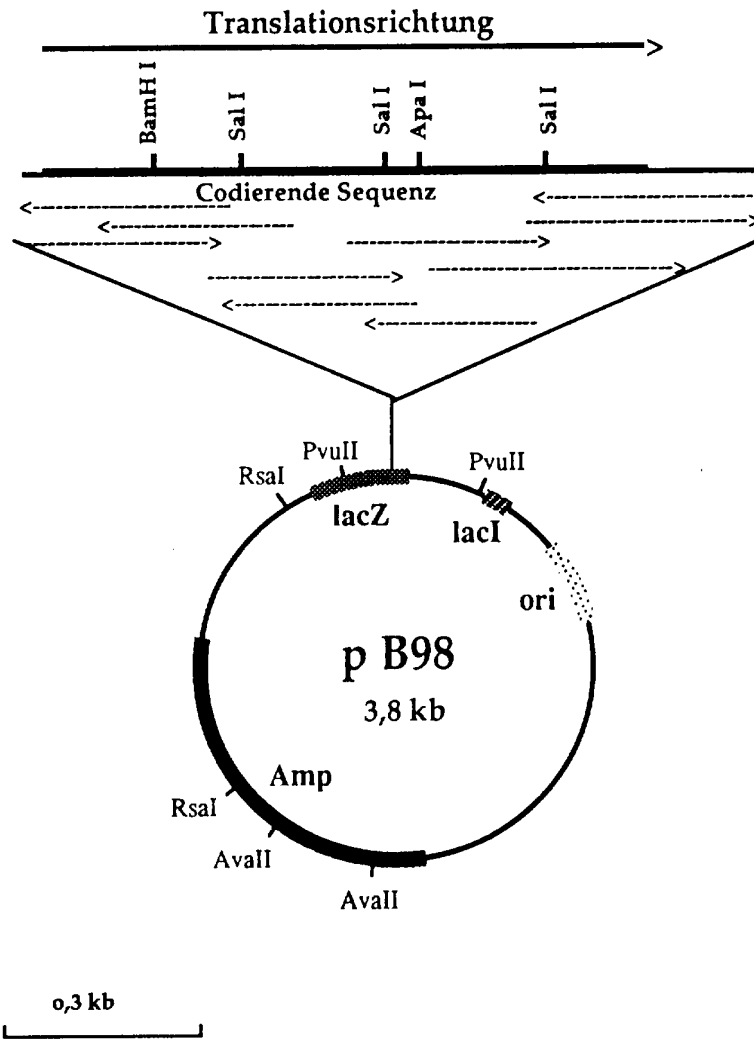


Abb. 3: Restriktionskarte und Sequenzierschema der Pektinesterase-cDNA .
 Pfeile geben Sequenzierrichtungen an. Die Sequenzierungen wurden mit Universal- und PE-spezifischen Primern durchgeführt.

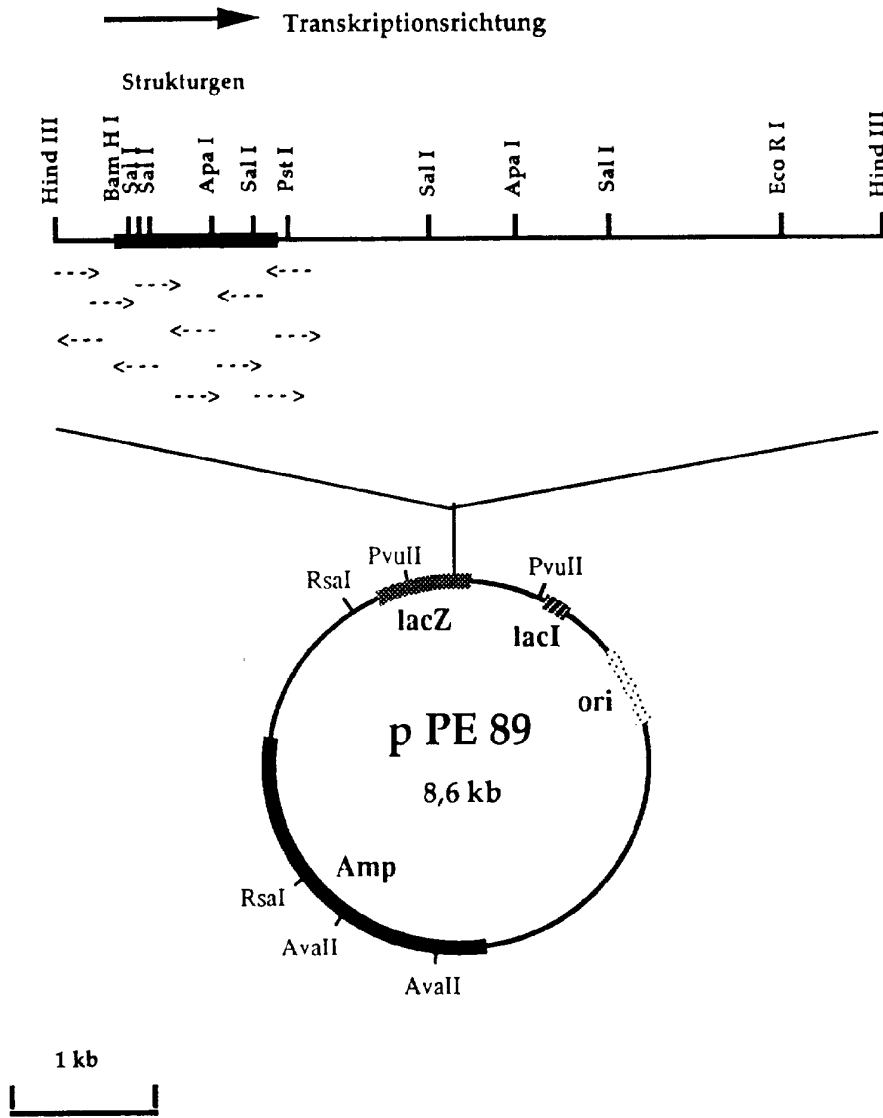


Abb . 4: Restriktionskarte des chromosomalen PE-Gens mit flankierenden Bereichen im Plasmid pPE89. Pfeile geben den doppelsträngig sequenzierten Bereich und entsprechend die Sequenzrichtung an. Die Sequenzierungen wurden mit Universal- und PE-spezifischen Primern durchgeführt.