



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120835 B**

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

31.03.2010

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C12N 9/18 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
D06M 16/00 (2006.01)

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(21) Patentihakemus - Patentansökning

20075532

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag

10.07.2007

(24) Alkuperäpäivä - Löpdag

10.07.2007

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

11.01.2009

(73) Haltija - Innehavare

1 •Valtion teknillinen tutkimuskeskus, Vuorimiehentie 3, 02150 ESPOO, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Buchert, Johanna, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)
2 •Nakari-Setälä, Tiina, Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)
3 •Halonen, Pasi, Turku, SUOMI - FINLAND, (FI)
4 •Kontkanen, Hanna, Vantaa, SUOMI - FINLAND, (FI)
5 •Westerholm-Parvinen, Ann, Kirkkonummi, SUOMI - FINLAND, (FI)
6 •Rättö, Marjaana, Vantaa, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud

Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Uusia esteraaseja ja niiden käyttö
Nya esteras och deras användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Carvalho M. L. ET AL. "Cutinase: From molecular level to bioprocess development", Biotechnology and Bioengineering, 1999, vol. 66, nro 1, p. 17-34, Database UniProtKB, CUTI_BOTCI, Accession number Q00298, Cutinase precursor (EC 3.1.1.74) (cutin hydrolase), Botrytis cinerea (Noble rot fungus) (Botryotinia fuckeliana), entry version 39, 12.6.2007. Database UniProtKB, A4QRZ1_MAGGR, Accession number A4QRZ1, Hypothetical protein, Magnaporthe grisea (Rice blast fungus) (Pyricularia grisea), entry version 4, 26.6.2007. Database DGENE (Derwent), ADK70253 protein, Aspergillus sp ester hydrolase protein. 12.2.2004. Database UniProtKB, A4RFE1_MAGGR, Accession number A4RFE1, Hypothetical protein, Magnaporthe grisea (Rice blast fungus) (Pyricularia grisea), entry version 4, 26.6.2007. EMBL Nucleotide Sequence Database, Accession number DY849925, CcinSEQ17107 Coprinus cinereus pBluescript (EcoRI-XhoI) Coprinopsis cinerea cDNA clone CcinSEQ17107, mRNA sequence. Version 2, 25.3.2006. EMBL Nucleotide Sequence Database, Accession number EE296673, EST0471 Mycelia Grown in Crab Chitin Hypocrea virens cDNA clone TvC104G04 similar to gbLEAL85398.1 esterase family protein, mRNA sequence. Version 2, 1.9.2006.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö liittyy polyesteraaseihin, joilla on kutinaasi ja/tai suberinaasi aktiivisuutta, joka saadaan Coprinuksesta ja Trichodermosta. Keksintö liittyy edelleen menetelmään polyesteraasien tuottamiseksi ja siinä käytettäviin polynukleotideihin, vektoreihin ja isäntäsoluihin. Entsyymit ovat käyttökelpoisia hydrolysoitaessa kutiinia, suberiinia ja muita polyestereitä, esimerkiksi käsiteltäessä maatalous- tai elintarviketuotteiden raaka-aineita, tai puuraaka-aineita, massa- ja paperituotteita ja jätteitä, ja muokattaessa polyesterikuituja, tai pyykin- tai astianpesuovellutuksissa.

Föreliggande uppfinningen härrör sig till polyesteras, som har kutinas och/eller suberinas aktivitet som kan fås från Coprinus and Trichoderma. Uppfinningen härrör sig ytterligare till en metod för producering av polyesteras och nuk-leotider, vektorer och värdceller, som används däri. Enzymerna är användbara i hydrolysering av kutin, suberin och andra polyesteras, till exempel i behandling av jordbruks- eller livsmedelsråmaterial, eller träråmaterial, massa- and papperprodukter, och avfall, och i modifiering av polyesterfiber, eller i tvätt- och diskapplikationer.

Uusia esteraaseja ja niiden käyttö

Keksinnön ala

Keksintö liittyy uusiin esteraaseihin ja erityisesti polyesteraasiproteiineihin, joilla on kutinaasi- ja/tai suberinaasiaktiivisuutta. Mainittuja entsyymejä
5 voidaan saada *Coprinus* tai *Trichoderma* -suvun sienistä. Keksintö liittyy myös eristettyihin polynukleotideihin, jotka koodaavat mainittuja proteiineja, ja polynukleotideja käsittäviin vektoreihin ja geneettisesti modifioituihin mikro-organismeihin sekä menetelmiin proteiinien tuottamiseksi. Keksintö liittyy myös entsyymivalmistukseen, joka käsittää polyesteraasiproteiinin ja proteiinin tai val-
10 misteen käyttöön. Keksinnön kohteena on myös menetelmä kutiinin ja/tai suberiinin tai muiden polyesteraaseja käyttävien polyestereiden hydrolysoimiseksi.

Tekniikan taso

Kutinaasit ja suberinaasit ovat polyesteraaseja, jotka kykenevät hajottamaan tai osittain depolymerisoimaan kasvien polyesterivahoja eli kutiinia
15 ja suberiinia. Merkittäviä määriä kutiinia/suberiinia on läsnä maa- ja metsätalouden erilaisissa raaka-aineissa ja sivutuotteissa, kuten koivuntuohessa ja korkissa, marjoissa, viljoissa, vihanneksissa ja niiden prosessoinnin sivutuotteissa. Näiden vahojen läsnäolo kasvien raaka-aineissa voi haitata kasvimateriaalien teollista käsittelyä niiden hydrofobisen luonteen ja heikosti hajoavan
20 rakenteen vuoksi.

Polyesterien modifiointi parantaisi useiden luonnonmateriaalien prosessointia ja hyödyntämistä ja vähentäisi prosessin sivutuotteiden ja jätteiden käsittelyä. Näitä jätefraktioita voitaisiin käyttää hyväksi arvokkaampien koostumusten lähteenä, esimerkiksi suberiinipohjaiset oligoesterit voisivat olla mah-
25 dollisia raaka-aineita voitelu- ja sidosaineissa. Polyesteraasien käyttö parantaa useiden kasvimateriaalien, kuten viljojen, hedelmien, vihannesten ja marjojen, prosessointia ja hyväksikäyttöä ja myös arvokkaiden bioaktiivisten ja funktionaalisten komponenttien vapautumista ja talteenottoa näistä raaka-aineista.

Luonnonresurssien kestävä käyttö ja jätehuolto vähentävät osaltaan
30 jätteen tuotantoa. Entsyymien käyttö yhdessä kemiallisten ja fysikaalisten prosessien kanssa on ympäristöystävällinen tapa tuottaa lisäarvoa jättesivutuotteille. Kutinaaseja/suberinaaseja voidaan myös käyttää esim. pyykinpesu- ja astianpesusovelluksiin rasvojen poistamiseksi sekä puuvillan biopesuun ja ihmisen valmistamien polyesterikuitujen pinnan muokkaamiseen.

Vaikka lipidejä ja vahoja on runsaasti erilaisten teollisten tuotteiden ja lignoselluloosajätteiden ainesosina, ainoastaan rajoitettu joukko lipidejä muuntelevia muita entsyymejä kuin tavanomaisia lipaaseja on kaupallisesti saatavilla. Kutinaaseja ja suberinaaseja pidetään potentiaalisina entsyymeinä
5 muokattaessa luonnollisia lipidejä ja vahoja, joita ei voida hydrolysoida tavanomaisilla lipaaseilla.

Tähän mennessä tutkituin on kasvi-/ihmispatogeenisestä sienestä *Fusarium solani* sp. *pisi* peräisin oleva kutinaasi (Carvalho *et al.*, 1999), mutta kutinaaseja on löydetty myös sellaisista mikro-organismeista kuin *Alternaria*
10 *brassicicola* (Trail ja Köller, 1993), *Botrytis cinerea* (Gindro ja Pezet 1999), *Venturia inaequalis* (Köller ja Parker, 1989), *Aspergillus oryzae* (Maeda *et al.*, 2005) ja tietyistä *Streptomyces*-lajeista (Fett *et al.*, 1992). Kaikki biokemiallisesti hyvin karakterisoidut kutinaasit ovat seriiniesteraaseja, jotka sisältävät klassisen Ser-His-Asp-triadin, joka on yleinen seriiniproteaaseissa ja useissa
15 lipaaseissa. Karakterisoiduilla kutinaaseilla on optimaalinen pH, joka vaihtelee neutraalista emäksiseen.

Kutinaaseille on esitetty monia käyttötarkoituksia, joista vain muutamia mainitaan tässä. Esimerkiksi julkaisussa WO2004/029193 esitetään kutinaaseja sisältävien lipaasien käyttö fermentaatioprosessissa, erityisesti prosesseissa, joissa tuotetaan etanolia. Julkaisu US 6,255,451 liittyy biohajoavien
20 polymeerien hajottamiseen lipaasilla ja kutinaasilla. Mahdollisesti lipolyyttisiä entsyymejä tuottavia organismeja on luetteloitu suuria määriä, näiden joukossa mm. *Coprinus cinereus* ja *Trichoderma reesei*. Ei ole kuitenkaan mitään esitystä näistä organismeista peräisin olevista lipaaseista. Garcia-Lepe *et al.*, 1997,
25 seuloivat lipaasiaktiivisuutta 51 eri suvun ja kannan sienestä autolyysiviljelmässä. Parhaiksi lipaasiaktiivisuuden tuottajiksi osoittautuivat *Fusarium*-suvun sienet, joissa myös ilmeni matalaa kutiini- ja suberiiniaktiivisuutta. Myös *Aspergillus* osoitti jonkin verran aktiivisuutta, kun taas *Penicillium*-lajissa aktiivisuus oli hyvin matala. Suvun *Trichoderma* lahkoon *Mucorales* ja luokan *Basidiomycetes*
30 muissa lajeissa ja kannoissa ei ilmennyt lipaasiaktiivisuutta.

Kutinaaseja tuottavat usein fytopatogeeniset sienet, koska ne osallistuvat korkeampien kasvien rakenteellisen kutiinipolymeerin hajottamiseen. Kutinaasit ovat eritettyjä proteiineja, joiden avulla patogeeniset sienet pääsevät tunkeutumaan kutikulaarisen esteen läpi isäntäkasviin sieni-infektion alkuvaiheessa. Fytopatogeeniset sienet ovat kuitenkin ei-toivottuja teollisten entsyymien lähteitä, koska käyttäjillä on niistä negatiivinen käsitys. Itse asiassa tällä
35

hetkellä ei ole kaupallisesti saatavilla elintarvikelaatua olevia polyesteraaseja ja suberiinia prosessoivia entsyymejä. Edelleen siis tarvitaan uusia ja tehokkaampia polyesteraaseja. Tämä keksintö täyttää kyseisen tarpeen.

Keksinnön lyhyt selostus

5 Keksinnön yhtenä tavoitteena on polyesteraasiproteiini, joka sisältää aminohapposekvenssin, jolla on ainakin 50-prosenttinen identtisyys sekvenssin nro 2, 6, 11 tai 13 kanssa, tai sen variantin tai fragmentin, jolla on polyesteraasiaktiivisuutta.

10 Keksinnön eräänä toisena tavoitteena on eristetty polynukleotidi, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu:

a) polynukleotidista, joka sisältää sekvenssin nro 1, 3, 5, 10 tai 12 mukaisen nukleotidisekvenssin, tai nukleotidisekvenssin, joka koodaa patenttivaatimuksen 1 mukaista proteiinia,

b) kohdan a) komplementaarista säikeestä, ja

15 c) sekvenssistä, joka degeneroitunut geneettisen koodin suhteen jonkin kohdan a) tai b) mukaiselle sekvenssistä.

Keksinnön tavoitteena on myös vektori, joka sisältää mainitun polynukleotidin, ja geneettisesti modifioitu mikro-organismi, joka on transformoitu tällä vektorilla.

20 Keksinnön kohteena on myös menetelmä mainitun polyesteraasiproteiinin tuottamiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa transformoidaan mikro-organismi vektorilla, joka sisältää mainitun polynukleotidin, viljellään transformoitu mikro-organismi olosuhteissa, jotka sallivat mainitun polynukleotidin ekspression, ja otetaan talteen ekpressoitu proteiini.

25 Keksintö kattaa myös entsyymivalmisteen, joka sisältää mainitun polyesteraasiproteiinin.

Lisäksi keksintö kattaa menetelmän kutiin, suberiinin tai muun polyesterin hydrolysoimiseksi, joka menetelmä sisältää vaiheet, joissa kutiinia, suberiinia tai muuta polyestereä sisältävää materiaalia käsitellään polyesteraasiproteiinilla olosuhteissa, jotka sallivat mainitun polyesterin osittaisen hydrolyysin tai kokonaishydrolyysin.

35 Edelleen keksintö kattaa mainitun polyesteraasiproteiinin tai entsyymivalmisteen käytön elintarviketeollisuudessa, massa- ja paperiteollisuudessa, tekstiiliteollisuudessa, tai pyykki- ja astianpesusovelluksissa tai kemiallisessa synteessissä. Keksinnön erityisiä suoritusmuotoja on esitetty epäitsenäisissä vaatimuksissa. Keksinnön muita tavoitteita, yksityiskohtia ja etuja tulee

esiin seuraavista piirustuksista, yksityiskohtaisesta kuvauksesta ja esimerkeistä.

Kuvioiden lyhyt selostus

5 Kuvio 1 esittää *Coprinus cinereus* -sienen kutinaasityyppisten proteiinien aminohapposekvenssit.

Kuvio 2 esittää solunulkoista *Coprinus cinereus* -kutinaasin 09668 (CcCUT) tuotantoa 20 l:n bioreaktoriviljelyssä.

Kuvio 3 esittää solunulkoista *Trichoderma reesei* -kutinaasin (TrCUT) ja -suberinaasin (TrSUB) tuotantoa 20 l:n bioreaktoriviljelyssä.

10 Kuvio 4 esittää rasvahappoketjun pituuden vaikutuksia *Coprinus cinereus* -kutinaasin 09668 (CcCUT) ja *Trichoderma reesei* -kutinaasin (TrCUT) esterolyyttiseen aktiivisuuteen mitattuna pH-arvolla 7 ja 40 °C:ssa.

Keksinnön yksityiskohtainen selostus

Keksintö antaa käyttöön uusia entsyymiproteiineja, jotka kykenevät
15 hydrolysoimaan esterisidoksia luonnollisissa ja keinotekoisissa polyestereissä. Ainakin joillakin niistä on merkittävää aktiivisuutta myös happamalla pH-arvolla, mikä on edullista tietyissä sovelluksissa. Proteiinit ovat ”esteraaseja”, jotka kattavat luokan (EC 3.1.1.) entsyymit ja joita kutsutaan myös karboksyyliesterihydrolaaseiksi. Keksinnön mukaiset proteiinit ovat erityisesti ”polyesteraaseja”,
20 mikä tarkoittaa, että niillä on merkittävää aktiivisuutta monilla eri polyestereillä, kuten kasvipolyesterivahoilla eli kutiini-, suberiini- tai keinotekoisilla polyestereillä. Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan proteiinilla on kutinaasiaktiivisuutta. ”Kutinaasi” on luokan (EC 3.1.1.74) entsyymi. Kutinaasi on seriiniesteraasi, joka sisältää klassisen Ser, His, Asp -seriinihydrolaasien triadin. Keksinnön erään toisen suoritusmuodon mukaan proteiinilla on suberinaasiaktiivisuutta. ”Suberinaasi” on entsyymi, joka kykenee hajottamaan suberiinia. Proteiineissa voi olla enemmän kuin yksi mainituista entsyymien aktiivisuuksista mitattuna mallisubstraateilla tai substraattina käytetyllä eristetyllä kutiinilla tai suberiinilla. Polymeraasiaktiivisuus saattaa siis olla ainakin kutinaasi-
30 aktiivisuutta tai suberinaasiaktiivisuutta tai molempia. Lisäksi proteiineissa voi olla muuta entsyymiaktiivisuutta, kuten lipaasiaktiivisuutta, joka kuuluu myös luokkaan EC 3.1.1.

Polyesteraasit sisältävät aminohapposekvenssin, jolla on ainakin 50-prosenttinen tai edullisesti ainakin 60-, 70-, 80-, 90-, 95- tai 98-prosenttinen
35 identtisyys sekvenssin nro 2, 6, 11 tai 13 kanssa, tai sen variantin tai fragmen-

tin, jolla on polyesteraasiaktiivisuutta. Erään edullisen suoritusmuodon mukaan polyesteraasi sisältää aminohapposekvenssin, jolla on ainakin 50-prosenttinen identtisyys sekvenssin nro 2 kanssa, tai sen variantin tai fragmentin, jolla on kutinaasiaktiivisuutta. Tällaisia ovat esimerkiksi polyesterit, jotka sisältävät sekvenssin nro 4, 7, 8 tai 9 mukaisen aminohapposekvenssin, tai sen entsymaattisesti aktiivisen variantin. Tällaisella proteiinilla voi olla 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 95- tai 98-prosenttinen identtisyys sekvenssin nro 4 kanssa.

Termillä "identtisyys" tarkoitetaan tässä kahden aminohapposekvenssin välistä sekvenssi-identiteettiä toisiinsa verrattuna. Sekvenssien identiteetti määritetään tässä käyttämällä ClustalW-monirinnastusohjelmaa, joka on saatavilla Euroopan molekyylibiologian laboratorion - Euroopan bioinformatiikan instituutin internet-sivuilta (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) käyttämällä oletusasetuksia ja Blosum62:ta substituutiomatriisina (Thompson et al., 1994).

Tiedetään hyvin, että yhden tai muutaman aminohapon poistaminen, lisääminen tai substituutio ei välttämättä muuta entsyymiproteiinin katalyyttisiä ominaisuuksia. Tämän vuoksi keksintö kattaa myös variantteja ja fragmentteja tietyistä aminohapposekvensseistä, joilla on polyesteraasiaktiiviteettia. Termillä "variantti" viitataan tässä sekvenssiin, jonka aminohapposekvenssissä on vähäisiä muutoksia tiettyyn sekvenssiin verrattuna. Tällainen variantti voi ilmetä luonnollisesti esim. alleelisena varianttina samassa kannassa, lajissa tai suvussa, tai se voidaan saada aikaan mutageneesillä tai jollain muulla geenimuuntelulla. Se voi sisältää aminohappojen substituutioita, poistoja tai lisäyksiä, mutta silti se toimii olennaisesti samalla tavalla kuin annetut entsyymit, ja erityisesti se säilyttää katalyyttisen toimintansa polymeraasina.

Tietyn proteiinisekvenssin "fragmentti" tarkoittaa kyseisen sekvenssin osaa eli sekvenssiä, joka on katkaistu N- ja/tai C-terminaalisisessä päässä. Se voi olla esimerkiksi signaalisekvenssin sisältävä proteiinin kypsä osa, tai se voi olla vain kypsän proteiinin entsymaattisesti aktiivinen fragmentti.

Keksintö kohdistuu myös eristettyihin polynukleotideihin, jotka koodaavat esitettyjä polyesteraaseja, mukaan lukien komplementaarisia kantoja ja degeneroituneita kantoja. Polynukleotidi, joka on "geneettisen koodin seurauksena degeneroitunut" tietystä sekvenssistä, tarkoittaa, että se sisältää yhden tai useamman erilaisen kodonin, mutta koodaa samoja aminohappoja. Termillä "polynukleotidi" tarkoitetaan tässä joko yksi- tai kaksijuosteista polynukleinihappoa. Termi kattaa genomisen DNA:n, cDNA:n ja RNA:n.

Eri organismeista peräisin olevilla geeneillä, jotka koodaavat entsyymejä, joilla on sama katalyyttinen aktiivisuus, on usein sekvenssin samankaltaisuuksia. Näitä samankaltaisuuksia voidaan käyttää hyväksi kloonattaessa muita geenejä muista organismeista, joilla on samanlainen tai samankaltainen katalyyttinen aktiivisuus.

Uusia esteraaseja koodaavia polynukleotideja voidaan identifioida esim. *in silico* vertaamalla nukleotidisekvenssejä. Jos tällaisia sekvenssejä ei ole saatavilla, voidaan nukleotidi- tai aminohapposekvenssin konservoitunut alue identifioida ja kloonata geenifragmentti PCR-menetelmillä. Kloonaus tarkoittaa mielenkiinnon kohteena olevan DNA-fragmentin siirtoa organismista itsekopioituvaan geneettiseen elementtiin ja edelleen mahdollisesti vieraaseen isäntäsoluun. Kokonainen geeni voidaan saada fragmentin sekvensoinnin jälkeen esim. käyttämällä cDNA-kirjastoa tunnetulla tavalla. Toinen tapa identifioida polyesteraasiageeni on käyttää perinteistä nukleiinihappohybridisaatiota.

Kloonaukseen voidaan valmistaa erityisiä koettimia esimerkiksi vastaavasta mRNA:sta, tai koetin voidaan valmistaa, jos osa geenin koodaaman proteiinin aminohapposekvenssistä tunnetaan. Kun ehdokkaina olevat DNA-sekvenssit on määritelty, voidaan algoritmisilla menetelmillä tehokkaasti etsiä kohteena olevasta genomista vastaavuuksia. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) on laajalti käytössä oleva järjestelmä, joka on suunniteltu tätä tarkoitusta varten.

Keksinnön mukaiset proteiinit tai polynukleotidit voidaan saada mistä tahansa sopivasta organismista, mukaan lukien niitä sisältävät bakteeri-, sieni-, hiiva-, kasvi- tai nisäkkäistä peräisin olevat solut. Edullisesti entsyymi saadaan sienestä ja erityisesti rihmasienestä, kuten *Coprinus* tai *Trichoderma*-suvun sienestä, erityisesti lajista *C. cinereus* tai *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*).

Tietystä organismista "saadut" proteiinit tai polynukleotidit kattavat mainitusta organismista eristetyt tuotteet sekä niiden muunnokset. Tietystä organismista johdettu proteiini voi olla rekombinantisti tuotettu tuote, joka on identtinen luonnollisesti esiintyvän proteiinin kanssa tai muunnos siitä. Proteiinia voidaan myös muunnella esim. glykosylaatiolla, fosforylaatiolla tai muulla kemiallisella muuntelulla. Muunteluun voi myös kuulua sopivan peptidin tai proteiinifuusiokumppanin liittäminen mielenkiinnon kohteena olevaan proteiiniin. Fuusiokumppanilla voi olla hyödyllinen tehtävä eli se voi vahvistaa mielenkiinnon kohteena olevan proteiinin hydrolyysiä tai prosessointitehokkuutta. Esimerkkejä tällaisista fuusiokumppaneista ovat mm. hydrofobiinisenet. Tietystä

organismista saatuihin tuotteisiin kuuluu myös tuotteiden mutantteja ja luonnollisia variantteja, joista poistetaan, lisätään ja/tai korvataan yksi tai useampi nukleiinihappo ja/tai aminohappo.

Kuten edellä on esitetty, proteiini voidaan eristää organismista, jossa se esiintyy luonnollisesti, tai se voidaan valmistaa rekombinantisti isäntäsolussa tai tuottaa synteettisesti esim. peptidisynteesillä. Proteiini on edullisesti rekombinantti proteiini. Se voidaan valmistaa eristämällä ensin proteiinia koodaavaa polynukleotidia sisältävä fragmentti monistamalla PCR-reaktiossa (Coen, 2001) tai joillain muilla rekombinantti-DNA-menetelmillä (Sambrook et al., 1989). Eristetty polynukleotidi viedään sitten vektoriin, esim. plasmidivektoriin, erityisesti ekspressiovektoriin, joka sisältää seuraavat toiminnallisesti liitetyt elementit: transkriptiopromoottorin, polyesteraasia koodaavan segmentin ja transkriptioterminaattorin. Promoottori on edullisesti vahva promoottori, joka mahdollistaa proteiinin yliekspression. Yksi sopiva promoottori on *T. reesein* sellobiohydraasin I (cbh1) promoottori. Promoottori valitaan siten, että se kykenee toteuttamaan mielenkiinnon kohteena olevan geenin ekspression valitussa tuotantoisännässä. Vektori voi olla integroitu kromosomiin tai se voi olla automaattisesti monistuva.

Seuraavaksi vektori transformoidaan heterologiseen tai homologiiseen isäntäsoluun, jotta saadaan luotua ”geneettisesti muunneltu mikro-organismi”, jota viljellään olosuhteissa, joissa proteiinin ekspressio on mahdollinen. Menetelmiä eri isäntäjärjestelmässä tapahtuvaan proteiinin tuotantoon rekombinanttitekniikoilla tunnetaan alalla hyvin (Gellissen, 2005). Vaihtoehtoisesti ainostaan vahva promoottori on liitetty polyesteraasigeeniin isännän kromosomissa, jolloin mainitun geenin ekspressio on yliekspressoitu. Isäntäsolu voi olla mikä tahansa sopiva eukaryoottinen tai prokaryoottinen solu. Edullisesti se on sieni, kuten rihmasieni tai hiiva, ja edullisimmin se kuuluu sukuun *Trichoderma*, erityisesti se on *T. reesei*. Se voi myös olla *Saccharomyces*- tai *Pichia*-kantaa, kuten *S. cerevisiae* ja *P. stipitis*, vastaavasti. Edelleen se voi olla *Aspergillus* -kantaa, kuten *A. nidulans*, *A. niger* tai *A. oryzae* tai jopa bakteerisäntä.

Polyesteraasiproteiini tuoteaan edullisesti solun ulkopuolella, jolloin eritetty proteiini voidaan saada kasvualustasta. Vaihtoehtoisesti solut voidaan rikkoa entsyymien vapauttamiseksi, ja entsyymi voidaan sitten ottaa supernatantista solujätteiden poiston jälkeen. Entsyymiä voidaan puhdistaa edelleen useilla erilaisilla proteiininpuhdistusmenetelmillä, jos halutaan. Tällainen puh-

distaminen voi sisältää esim. konsentraation, saostamisen, kromatografian, immunopuhdistuksen, faasierottelun jne. muiden proteiinien ja erityisesti muiden entsyymien poistamiseksi.

Tässä yhteydessä ”entsyymivalmiste” voi olla mikä tahansa koostumus, joka sisältää ainakin yhden keksinnön mukaisista polyesteraaseista. Se voi myös sisältää yhden tai useampia entsyymejä. Se voi olla raakamuodossa, esim. käytetyn viljelmän tai solun supernatantin muodossa, tai se voi sisältää polyesteraasin puhdistetussa tai olennaisesti puhdistetussa muodossa.

Polyesteraasit ovat hyödyllisiä kutiinia, suberiinia tai muuta polyesteriä sisältävän materiaalin hydrolyysille. Kutiinia ja/tai suberiinia sisältävä materiaali on yleensä kasviperäistä, kun taas muu polyesteriä sisältävä materiaali voi olla kasvista saatua tai ihmisen tekemää. Käsiteltävään materiaaliin lisätään entsyymiä määrää, joka on tehokas halutun reaktion katalysoimiseksi, hydrolyysin sallivissa olosuhteissa. Polyesteraaseja voidaan esim. käyttää kasvi-
polyesterivahojen, eli kutiinin ja suberiinin, hajottamiseksi tai niiden depolyme-
roinniksi osittain. Näin ollen polyesteraaseja voidaan käyttää esim. maatalous-
tai elintarviketuotteiden tai vihanneksista, hedelmistä, marjoista ja viljoista saa-
tavien sivutuotteiden käsittelyyn. Niitä voidaan myös soveltaa muissa kuin elin-
tarvikeprosesseissa, kuten menetelmissä, jotka käsittävät puuraaka-aineiden,
massa- ja paperituotteiden tai prosessin jätteiden tai vesien tai sivutuotteiden
käsittelyä, tai synteettisten tai muiden ihmisen tekemien polyesterikuitujen tai
-tekstiilien muokkausta tai tahrojen tai rasvan poistamista pyykistä ja tiskeistä.

Sopivissa olosuhteissa polyesteraaseja voidaan käyttää myös katalysoimaan käänteinen reaktio eli esterifikaatio, jossa muodostetaan esterisidoksia esim. rasvahappojen ja alkoholien välille.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavilla esimerkeillä, jotka eivät ole rajoittavia. Tulisi kuitenkin ymmärtää, että edellä olevassa kuvauksessa ja esimerkeissä esitetyt suoritusmuodot on tarkoitettu ainoastaan havainnollistaviksi ja että useat erilaiset muutokset ja muunnelmat ovat mahdollisia patenttivaatimusten puitteissa.

Esimerkki 1. Polyesteraasiaktiivisuuksien mittaaminen

Menetelmiä suberiinin hajottamisen mallintamiseksi

Suberiinin alifaattisen kerroksen hajoamista jäljiteltiin mallisubstraateilla eli naftolijohdannaisilla, joissa oli eroja sekä kromoforin (1-naftyyli, 2-naftyyli, Naftooli AS, Naftooli AS-D) irtotilavuuden että esterisidoksen sisältävän

hiiliketjun suhteen. Naftolijohdannaisten substraattiliuoksia (0,5 - 1 mM) valmistettiin 1-prosenttisessa asetonissa ja 1-prosenttisessa Triton X-100:ssa 50 mM:ssa Na-sitraattia (pH 5) tai 50 mM:ssa NaP:ta (pH 8). Reaktioseos, joka sisälsi 170 µl substraattiliuosta ja 10 µl entsyyminäytettä inkuboitiin 40 °C:ssa
 5 20 minuuttia. Inkubaation jälkeen lisättiin 20 µl 1-prosenttista Fast Blue BB -suolaväriä ja absorbanssi (1NA substraatit - 450 nm, 2NA substraatit - 510 nm, NAS substraatit - 595 nm, NASD substraatit - 595 nm) mitattiin 10 minuutin lisäinkubaation jälkeen. Entsyymien aktiviteetit määriteltiin vertaamalla standardikäyrään, joka tehtiin useille eri 1NA:n, 2NA:n, NAS:n tai NASD:n määriille
 10 (värjäytyneet reaktiotuotteet).

Aromaattisia aineita sisältävien suberiinikerrosten hajoamista valvottiin mallisubstraattilla 4-metylumbelliferyyli 4-metyyliferuulihappoesteri (MUFE), joka sisälsi *p*-kumaronihappojohdannaisia (havaitaan luonnollisessa suberiinissa), jotka oli esteröity fluoresoivalla molekyylillä (4-metyyliumbelliferoni,
 15 4MU). MUFE-testi tehtiin inkuboimalla 190 µl 0,1 mM substraattiliuosta ja 10 µl entsyymiliuosta 40 °C:ssa. Fluoresenssi mitattiin ($\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$) 20 min inkubaation jälkeen käyttämällä 4- metyyliumbelliferonia (4MU) standardina.

Suberiinin hajoamista mitattiin myös käyttämällä radioaktiivisesti leimattua suberiinia substraattina. Koivun pinnan tuohesta eristettyä suberiinia leimattiin yhdisteellä [^3H]NaBH₄. Reaktioseos sisälsi 10 mg suberiinia ($5 \times 10^5 - 10^6$ dpm/mg), 1,9 ml puskuria (0,1 % Triton X-100:aa 50 mM:ssa Na-sitraattipuskuria, pH 5, tai 50 mM:ssa Na-fosfaattipuskuria, pH 7) ja 0,1 ml entsyymiliuosta. Reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa, ja 0,1 ml:n reaktionäytteitä otettiin 48 tuntia
 25 kestäneen inkubaation aikana. Entsymaattisen toiminnan vapauttamat hydrolyysituotteet (^3H -leimatut monomeerit) uutettiin reaktionäytteistä etyyliasetaatilla, ja näin syntynyt radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskimella. Entsymaattisen hajoamisasteen (%) määrä todettiin mittaamalla radioaktiivisuus, joka vapautui, kun emäs oli kokonaan hydrolysoinut suberiinin.

30 **Menetelmiä kutiin hajoamisen mallintamiseksi**

Kutinaasiaktiivisuutta mallintavaa esteraasiaktiivisuutta mitattiin spektrofotometrisellä testillä (hieman muunneltu Davies *et al.*, 2000), jossa substraattina oli 2,1 mM *p*-nitrofenyylibutyaattia (*p*-NPB). Reaktio toteutettiin 0,1 M:ssa natriumfosfaattipuskuria (pH 7,0) 40 °C:ssa 10 minuutin ajan ja vapautuneen *p*-nitrofenolin määrä mitattiin 340 nm:ssä käyttämällä standardina kau-
 35

pallista *p*-nitrofenolia. Tällä menetelmällä saatiin sopiva ja nopea testi epäspesifille esteraasiaktiivisuudelle.

Myös kutinaasiaktiivisuutta mitattiin käyttämällä ³H-leimattua omenakutiinia substraattina ja soveltamalla metodologiaa, jonka ovat esittäneet Köller *et al.* (1982) ja Davies *et al.* (2000). Reaktioseos sisälsi 8 mg kutiinia (5x10⁶ dpm/mg), 1,9 ml reaktioseosta (joka sisälsi 0,025 % Triton X-100:aa 50 mM:ssa Na-fosfaattipuskuria, pH 7,0) ja 0,1 ml entsyymiliuosta. Reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa, ja reaktiota seurattiin 24 h. Kutinaasin toiminnan seurauksena vapautuneet hydrolyysituotteet (³H-leimatut monomeerit) uutettiin 0,1 ml:n reaktionäytteestä etyyliasetaatilla, ja näin syntynyt radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskimella. Entsymaattisen hajoamisasteen (%) määrä voidaan todeta mittaamalla radioaktiivisuus, joka vapautuu, kun emäs on kokonaan hydrolysoinut kutiinin.

Esimerkki 2. Polyesterolyttisten aktiivisuuksien seulonta

Kaikkiaan 55 mikro-organismia, joista suurin osa rihmasieniä, seulottiin, jotta saatiin selville niiden kyky tuottaa suberiinia muuntelevia entsyymejä suberiini-indesoiduissa olosuhteissa. Seulonta perustui viljelysupernatantilla tehtyihin entsyymaattisiin kokeisiin (naftoolisubstraattien hydrolyysi ja fluoresoivasti leimattu aromaattinen yhdiste ja radioleimattu suberiini, kuten Esimerkissä 1 on esitetty) ja eroteltujen kiinteiden aineiden GC/MS-analyysiin, jolloin pitkien rasvahappojen, kuten hydroksirasvahappojen ja diolien, lisääntyneet määrät vahvistivat, että mikro-organismi kykeni hajoittamaan suberiinia kasvunsa aikana. *Coprinus cinereuksen* ja *Trichoderma reesein* havaittiin olevan potentiaalisia kutiinia/suberiinia hajoittavien entsyymien tuottajia.

Esimerkki 3. Polyesteraasia koodavien geenien genomianalyysi *Coprinus cinereuksesta*

Coprinus cinereuksen todettiin kykenevän tuottamaan polyesteraaseja, joilla on aktiivisuutta luonnollisissa polyestereissä, kuten kutiinissa ja suberiinissa (Esimerkki 2). *Coprinus cinereuksen* julkaistua genomia (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/coprinus_cinereus/Home.html) käytettiin tunnettujen polyesteraasien (kutinaasien ja suberinaasien) perusteella tehtyihin samankaltaisuushakuihin, ja kuusi erilaista kutinaasi-tyyppistä geeniä löydettiin. Proteiinien samankaltaisuutta analysoitiin ClustalW-monirinnastusohjelmalla. Geeneistä viisi (CC1G_09668.1, CC1G_03922.1, CC1G_11503.1, CC1G_07482.1 ja CC1G_09365.1) osoitti korkeaa sekvens-

sihomologiaa kutinaaseille ja yhdellä (CCIG_05430.1) oli korkeampi homologia asetyyli-ksylaaniesteraasien (AXE) kanssa siten, että esim. sekvenssi-identtisyys *Trichoderma reesei* AXE1:n kanssa oli 30%. Tulokset on esitetty kuviossa 1, jossa on osoitettu kutinaasien seriini-aktiivinen kohta ja aspartaatti- ja histidiini-aktiiviset kohdat. Mainituista geeneistä ja vastaavista entsyymeistä käytetään tästä eteenpäin yksinkertaisesti merkintöjä 09668, 03922, 11503, 07482, 09365 ja 05430, vastaavasti.

ClustalW-monirinnastusohjelmalla analysoitujen *Coprinus cinereus* -kutinaasien väliset sekvenssi-identiteetit on esitetty taulukossa 1. Geeneissä 09668, 03922 ja 11503 oli 199 aminohappoa, 07482:ssa oli 200 aminohappoa, 09365:ssa oli 216 ja 05430:ssa oli 229 aminohappoa.

Taulukko 1. *Coprinus cinereus* -kutinaasien väliset sekvenssi-identiteetit

| | 09668 | 03922 | 11503 | 07482 | 09365 | 05430 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 09668 | 100 | | | | | |
| 03922 | 88 | 100 | | | | |
| 11503 | 75 | 76 | 100 | | | |
| 07482 | 60 | 59 | 57 | 100 | | |
| 09365 | 53 | 53 | 49 | 53 | 100 | |
| 05430 | 29 | 30 | 25 | 25 | 24 | 100 |

Esimerkki 4. Polyesteraasia koodaavien geenien genomianalyysi *Trichoderma reesei*stä

*Trichoderma reesei*llä havaittiin olevan aktiivisuutta kutiin ja suberiinin suhteen (esimerkki 2). *T. reesei*n julkaistua genomia (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>) käytettiin tunnettuihin kutinaaseihin perustuvien hakujen tekemiseen, ja yksi kutinaasi (tyyppinen) geeni (v1.2: tre17732, v2.0: tre60489, teline 7) löydettiin.

Laajojen blast-hakujen tuloksena löydettiin suberinaasi-tyyppinen geeni (v1.2: tre40871, v2.0: tre31227, teline 37). *Streptomyces scabies*in suberinaasin proteiinisekvenssiä käytettiin ensin haussa, joka tehtiin BLAST-ohjelmalla (blastp) National Center for Biotechnology Information -keskuksessa, NCBI, käyttämällä oletusparametrejä (matriisi: Blosum62, gap costs: olemassaolo 11, laajennus 1). Tämän jälkeen tehtiin oletusparametrejä käyttäen BLAST-haku *Trichoderma reesei* -genomille fungaalisilla sekvensseillä, joissa

oli samankaltaisuutta *S. scabies* -suberinaasin (joka sisälsi SEST-tyyppisiä alueita) kanssa.

Tämän SEST-alueen sisältävät entsyymit toimivat esteraaseina ja lipaaseina, mutta niiden sekvenssihomologia todellisten lipaasien kanssa on
5 pieni. Näiden entsyymien tertiaarirakenne on olennaisesti erilainen kuin alfa-/beetahydrolaasiperheessä ja ainutkertainen kaikkien tunnettujen hydrolaasien joukossa. Tämän tyyppistä esteraasialuetta sisältäviä proteiineja on löydetty useista erilaisista hydrolaaseista. Rakennetietoa sisältäviin kuuluu *Streptomyces scabiesista* saatava esteraasi (SEST), joka on perunaruven aiheuttaja ja
10 hydrolysoi tietyn esterisidoksen suberiinissa. Joillakin hypoteettisilla tai putatiivisilla proteiineilla on myös havaittu olevan samankaltaisuutta *S. scabies* -esteraasin kanssa.

Esimerkki 5. Uusien polyesteraasien kloonaus *Coprinus cinereuksesta*

Kolme erityyppistä polyesteraasia (09668, 07482, 05430), joiden vä-
15 llinen homologia oli matalin, valittiin esimerkistä 3 yliekspressioon *Trichoderma reesei*ssä. Valituissa kutinaaseissa oli optimaalinen kodonin käyttö ja sopivia natiivisignaalisekvenssejä ekspressioisännälle.

Kromosomi-DNA:n eristämiseksi kasvatettiin *Coprinus cinereus* -kantaa VTT-D-041011 sienirihmastona nesteviljelyissä, jotka aloitettiin itiöistä.
20 Itiöitä inokuloitiin 50 ml:ssa YP-kasvualustaa ja kasvatettiin kaksi vuorokautta 24 °C:ssa ravistellen. Sienirihmastosta korjattiin sato suodattamalla, ja genomien DNA eristettiin Raederin ja Brodan, 1985, menetelmällä. Genomista DNA:ta käytettiin templaattina kahden kutinaasigeenin (CC1G_09668.1, CC1G_07482.1) ja AXE-tyyppisen geenin (CC1G_05430.1) PCR-monistuksiin
25 alukkeilla, jotka oli suunniteltu siten, että ne luovat C-terminaalisen His₆-tagin, ja joilla oli lambdafaagi-pohjaisia paikkakohtaisia rekombinaatiosekvenssejä. Geenien natiivisignaalisekvenssejä käytettiin. Käytetyt alukkeet olivat: CC1G_09668.1 eteenpäinsuuntaava: sekvenssin nro: 14, CC1G_09668.1 käänteissuuntaava: sekvenssin nro: 15, CC1G_07482.1 eteenpäinsuuntaava:
30 sekvenssin nro: 16, CC1G_07482.1 käänteissuuntaava: sekvenssin nro: 17, CC1G_05430.1 eteenpäinsuuntaava: sekvenssin nro: 18, CC1G_05430.1 käänteissuuntaava: sekvenssin nro: 19. PCR-reaktiot toteutettiin lämmönkestävällä Phusion-polymeraasilla (Finnzymes, Suomi) valmistajan suosittelu-
sa reaktioseoksessa. PCR-ohjelmassa oli 30 sekunnin alkudenaturaatiovaihe
35 98 °C:ssa, jonka jälkeen seurasi 25 10 sekunnin jaksoa 98 °C:ssa, 30 sekunnin jaksoa 64 °C:ssa ja 30 sekunnin jaksoa 72 °C:ssa, jossa lämpökäsittely-

lämpötilaa laskettiin 1 °C:lla jaksoa kohti, kunnes saavutettiin 50 °C:een lämpötila. Tämän jälkeen seurasi 10 minuutin loppupidennysvaihe 72 °C:ssa. Monistetut PCR-tuotteet rekombinoitiin Gateway donori-vektoriin pDONR221 (In-vitrogen) Gateway Recombination -pakkauksella ja sekvensoitiin. Saadut sekvenssit on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Kloonatut *Coprinus cinereus* -kutinaasisekvenssit

| Geeni | Kloonattu nukleotidisekvenssi | Johdettu aminohapposekvenssi |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| <i>C. cinereus</i> 09668 klooni 3.1 | sekvenssin nro: 1 | sekvenssin nro: 2 |
| <i>C. cinereus</i> 07482 klooni 4.2 | sekvenssin nro: 3 | sekvenssin nro: 4 |
| <i>C. cinereus</i> 05430 klooni 5.1 | sekvenssin nro: 5 | sekvenssin nro: 6 |

Kaksi 09668:n kloonina, 3.1 ja 3.5, sekvensoitiin. Kloonin 3.5 nukleotidisekvenssien ja genomisekvenssin välillä oli muutamia eroja, mutta kaikki kolme nukleotidisekvenssiä koodaavat samaa aminohapposekvenssiä (sekvenssin nro: 2).
 10 Julkaistu genomisekvenssi on saatu haploidigenomista, ja se perustuu automaattiseen genomiannotaatioon. Näin ollen kloonattujen geenien sekvenssit voivat erota julkaistujen geenien sekvensseistä. Eroja on voinut syntyä myös PCR:n aikana.

Sekvenssi nro 4 ja sekvenssi nro 6, vastaavasti, eroavat genomista johdetusta aminohapposekvenssistä yhden aminohapon verran. Tämä ero on osoitettu kuviossa 1, jossa kyseiset kaksi erilaista aminohappoa on varjostettu. Kolmen muun kutinaasi-tyyppisen proteiinin sekvenssit CC1G_03922, CC1G_11503, and CC1G_09365 sekvenssit ovat sekvenssilistauksessa, vastaavassa järjestyksessä, sekvenssin nro: 7, sekvenssin nro: 8 ja sekvenssin
 20 nro: 9.

Geenit siirrettiin LR-rekombinaatioreaktioilla pDONR221 vektorista *Trichoderma reesei* expressiovektoriin pMS186, mikä sai aikaan plasmidit pAWP26 (CC1G_09668.1), pAWP27 (CC1G_07482) ja pAWP28 (CC1G_05430.1). Vektori pMS186 sisältää Gateway-lukukehyskasetin C (RfC), joka on sijoitettu *cbh1*:n (sellobiohydraasi 1:n) promoottorin ja terminattorin väliin, ja hygromysiiniresistanssikasetin. LR-rekombinaatioreaktio suo-

ritettiin käyttämällä Gateway Recombination -pakkausta (Invitrogen) valmistajan ohjeita noudattaen.

Esimerkki 6. Uusien esteraasien kloonaus *Trichoderma reeseistä*

Trichoderma reeseistä eristettiin kutinaasi- (v1.2: tre17732, v2.0: tre60489, teline 7) ja suberinaasi- (v1.2: tre40871, v2.0: tre31227, teline 37) cDNA RT-PCR:llä *Trichoderma reesein* cDNA-ekspressiokirjastosta RutC-30 (Margolles-Clark E., *et al.*, 1996) alukkeilla, jotka oli suunniteltu luomaan C-terminaalin His₆-tagin ja joilla oli lambdafaagi-pohjaisia paikkakohtaisia rekombinaatiosekvenssejä; kutinaasi eteenpäinsuuntaava: (sekvenssin nro: 20),
 10 käänteissuuntaava kutinaasi: (sekvenssin nro: 21), suberinaasi eteenpäinsuuntaava (sekvenssin nro: 22), käänteissuuntaava suberinaasi: (sekvenssin nro: 23). Kutinaasin natiivisignaalisekvenssiä käytettiin, kun taas suberinaasikonstruktille käytettiin *cbh1*:n signaalisekvenssiä. PCR-reaktiot toteutettiin lämmönkestävällä Phusion-polymeraasilla (Finnzymes, Suomi) valmistajan suosittelussa reaktioseoksessa. PCR-ohjelmassa oli 30 sekunnin alkudenaturaatiovaihe 98 °C:ssa, jonka jälkeen seurasi 25 10 sekunnin jaksoa 98 °C:ssa, 30 sekunnin jaksoa 64 °C:ssa ja 30 sekunnin jaksoa 72 °C:ssa, jossa lämpökäsittelylämpötilaa laskettiin 1 °C:lla jaksoa kohti, kunnes saavutettiin 50 °C:een lämpötila. Tämän jälkeen seurasi 10 minuutin loppupidennysvaihe 72 °C:ssa.
 20 Vahvistetut PCR-tuotteet rekombinoitiin Gateway donori-vektoriin pDONR221 (Invitrogen) Gateway Recombination -pakkauksella ja sekvensoitiin. Saadut sekvenssit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Kloonattuja *Trichoderma reesei* -kutinaasi- ja suberinaasi-sekvenssejä

| Geeni | Kloonattu nukleotidisekvenssi | Johdettu aminohapposekvenssi |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <i>T. reesei</i> 17732 (kutinaasi) | sekvenssin nro: 10 | sekvenssin nro: 11 |
| <i>T. reesei</i> 40871 (suberinaasi) | sekvenssin nro: 12 | sekvenssin nro: 13 |

25

Kutinaasin kloonattu nukleotidisekvenssi ja sen johdettu aminohapposekvenssi olivat molemmat sekä 5'- että 3'-päissä pidempiä kuin *T. reesein* genomien laskenta-annotaation perusteella ennustettiin.

Kutinaasi- ja suberinaasigeenit siirrettiin LR-rekombinaatioreaktioilla pDONR221 vektorista *Trichoderma reesein* expressiovektoriin pMS186, mikä
 30 sai aikaan plasmidit pAWP24 (kutinaasi) ja pAWP25 (suberinaasi). Vektori

pMS186 sisältää Gateway-lukukehyskasetin C (RfC), joka on sijoitettu *cbh1*:n (sellobiohydraasi 1:n) promoottorin ja terminaattorin väliin, ja hygromysiini-resistanssikasetin. LR-rekombinaatioreaktio suoritettiin käyttämällä Gateway Recombination -pakkausta (Invitrogen) valmistajan ohjeita noudattaen.

5 **Esimerkki 7. Uusien polyesteraasien ekspressio *Trichoderma reesei*ssä**

Polyesteraasigeenit ekspressoitiin *T. reesei*ssä suuren sellulaasi-geenin *cbh1* vahvasti indusoivan promoottorin alaisena. Sirkulaarisia ekspresiovektoreita (5 µg) transformoitiin *T. reesei*n *cbh1*:n negatiiviseen kantaan VTT-D-04966 PEG-välitteisellä transformaatiolla, olennaisesti Penttilän M. et al., 1987, kuvaamalla tavalla, ja transformantit valittiin hydromysiiniresistanssiin maljoilla, jotka sisälsivät 125 µg/ml hygromysiiniä B. Kaksi peräkkäistä transformanttikierrosta siveltiin selektiiviselle kasvualustalle ja testattiin PCR:llä genomiin integroinnin osalta. Positiiviset transformantit puhdistettiin yksi-itiö viljelyillä ja niistä testattiin kutinaasiaktiivisuus nesteviljelyissä käyttämällä *p*-nitrofenyylibutyraattia (*p*-NPB) mallisubstraattina (esimerkki 1). 50 ml viljelyalustaa (TrMM + 4 % laktoosia, 2 % jäteviljaa, 100 mM PIPPS:ää, pH 5,5) inokuloitiin 1×10^7 itiöllä ja kasvatettiin enimmillään 10 vuorokautta 28 °C:ssa nopeudella 250 rpm ravistellen. Kaikissa kolmessa *Trichoderma* konstruktissa, eli niissä, jotka transformoitiin *Coprinus* geenillä 09668, 07482 ja vastaavasti 05430, ilmeni *p*-NPB aktiivisuutta. Kuusi transformanttia, joissa ilmeni kunkin geenin suurimpia aktiivisuuksia, viljeltiin uudelleen perusteellisemmän analyysin tekemiseksi. *C. cinereus* 09668 vaikutti lupaavimmalta ehdokkaalta, ja sitä viljeltiin laboratorio-mittakaavan käymislaitteessa. Myös kaikkein potentiaalisimmat transformantit (*p*-NPB:llä tehdyn aktiivisuustestin perusteella), jotka kantoivat *T. reesei*n kutinaasi- tai suberinaasigeeniä valittiin myös käymislaitteessa tapahtuvaan viljelyyn.

Esimerkki 8. Uusien esteraasien tuottaminen laboratoriomittakaavan käymislaitteessa

Kutinaasia tuottavaa transformanttia 09668 (CcCUT) viljeltiin Braun Biostat C -käymislaitteessa (B. Braun Biotech, Saksa), jonka työtilavuus oli 20 litraa. Kasvualusta sisälsi (grammoina l⁻¹): laktoosia (60), (NH₄)₂SO₄ (5) ja KH₂PO₄ (5). Kasvualustan nestefaasi oli tislajaan jäteviljasta tehty vesipitoinen uute, joka oli valmistettu kuumentamalla 60 g l⁻¹ jäteviljaa 115 °C:ssa 20 minuutin ajan autoklaavissa, jäädyttämällä ja sentrifugoimalla kiinteiden ainesosien poistamiseksi. Sentrifugointisupernatanttia, joka sisälsi sekä typpilähteen

että kiihdyttimiä, käytettiin kasvualustassa ainoana nesteenä. Viljelylämpötila oli 28 °C ja pH oli 5,0 - 5,5 (ohjattu lisäämällä ammoniumhydroksidia ja fosforihappoa). Liuotettu happi pidettiin arvossa >30 % sekoittamalla sitä nopeudella 300...700 rpm ja ilmastamalla jatkuvasti 8 l min⁻¹. Vaahtoamista kontrolloitiin
 5 lisäämällä automaattisesti Struktol J633-polyoleaattia vaahtoamisen estämiseksi (Schill & Seilacher, Saksa). Viljelyn jälkeen solut poistettiin sentrifugimalla ja viljelysupernatantti tiivistettiin ultrafiltraatiolla käyttämällä Millipore (Ranska) BioMax 10 -kalvoja, nimellinen halkaisija 10 kDa.

C. cinereus -kutinaasia (CcCUT) tuotettiin menestyksellisesti käymislaitteessa. Kutinaasin tuotanto lisääntyi maksimiin, joka oli yli 8000 nkat ml⁻¹
 10 96 tunnissa (kuvio 2). Kymmenkertaisella viljelysuodoksella oli esteraasiaktiivisuus (*p*-NPB:llä), joka oli 70 000 nkat ml⁻¹, kokonaisproteiinisältö 104 mg ml⁻¹ ja kutinaasimäärä, joka oli noin 23 mg ml⁻¹. Kutinolyyttisen aktiivisuuden läsnäolo viljelysupernatantissa vahvistettiin myös eristetyllä omenakutiinilla ennen
 15 lisätutkimuksia (taulukko 4). Kutiinia käsiteltiin viljelysupernatantilla (45 tunnin näyte, *p*-NPB-aktiivisuus 1780 nkat ml⁻¹) 0,1 % Triton X-100:a läsnäollessa käyttämällä 1000, 5000 ja 20 000 nkat g⁻¹ entsyymiannoksia substraattia (pH 7, 40 °C).

Taulukko 4. CcCUT:n kutinolyyttinen aktiivisuus

| Annos (nkat/g) | Vapautuneet rasvahapot* (% substraatista) |
|----------------|--|
| Viite | 0,71 |
| 1 000 | 2,31 |
| 5 000 | 3,59 |
| 20 000 | 3,78 |

20 * kokonaismäärä, sisältää mono- ja oligomeerejä

Trichoderma reesei -kutinaasia (TrCUT) ja -suberinaasia (TrSUB) tuottavia transformantteja viljeltiin käymislaitteessa laboratoriossa vastaavalla tavalla kuin edellä on kuvattu CcCUT:n osalta. Kuviossa 3 nähdään entsyymien aktiivisuudet ajan funktiona.
 25

Esimerkki 9. Rekombinanttientsyymien puhdistus

C-terminaalisen His(6)-tagin läsnäolo teki mahdolliseksi CcCUT:n ja TrCUT:n yksivaiheisen puhdistuksen käyttämällä immobilisoitua metalliaffiniteettikromatografiaa (IMAC). Tiivistetty viljelysupernatantti vietiin kelatoivaan

Sefaroosi FF kolonniin (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), joka oli etukäteen ladattu Ni^{2+} :lla ja tasapainotettu 50 mM:lla natriumfosfaattia, joka sisälsi 500 mM NaCl ja 5 mM imidatsolia, pH 7,2. Kolonni pestiin tasapainottavalla puskurilla, jossa oli supplementtina imidatsolia 50 mM (CcCUT:lle) tai 20
 5 mM (TrCUT:lle) sitoutumattoman materiaalin poistamiseksi. Rekombinanttiproteiini eluoiitiin tasapainottavalla puskurilla, jossa oli supplementtina 200 mM imidatsolia, ja fraktioita kerättiin ja seulottiin niiden p-NPB:n aktiivisuuden ja proteiinin läsnäolon suhteen SDS-PAGE:lla. SDS-PAGE (12 % Tris-HCl Ready Gel:iä, Bio-Rad) tehtiin Laemmliin (1970) mukaan käyttämällä Pre-stained
 10 SDS-PAGE Standards (Broad Range Cat. no. 161-0318, Bio-Rad tai LMW, Cat. No 17-0446-01, GE Healthcare) ja Coomassie Brilliant Blue:sta (R350; Pharmacia) proteiinien värjäämiseen.

Puhdistettu CcCUT osoitti homogeenisyyttä SDS-PAGE:n suhteen, ja noin 10 grammaa puhdistettua entsyymiä valmistettiin lisäkarakterisointia ja
 15 hydrolyysitutkimuksia varten. 3 grammaa TrCUT:a puhdistettiin siten, että valmisteen puhtaus oli noin 95 % (SDS-PAGE analyysin mukaan). TrSUB puhdistetaan samalla tavalla kuin CcCUT ja TrCUT karakterisointia varten.

Esimerkki 10. Uusien polyesteraasien karakterisointi

Puhdistetut *Coprinus cinereus* (CcCUT) ja *Trichoderma reesei*
 20 (TrCUT) -kutinaasit karakterisoitiin biokemiallisesti koon, aktiivisuuden, substraatin spesifisyyden, pH:n ja lämpötilaominaisuuksien osalta.

Substraatin spesifisyys

Substraatin spesifisyys määritettiin käyttämällä *p*-nitrofenoleja, jotka oli esteröity asetaatilla (C2), propionaatilla (C3), butyraatilla (C4), valeraatilla
 25 (C5), kaproaatilla (C6), kapraatilla (C10), lauraatilla (C12), myristaatilla (C14), palmitaatilla (C16) ja stearaatilla (C18). Substraattidispersioiden konsentraatiot olivat 5 mM. Alempaa *p*-nitrofenyylistearaatin konsentraatiota (2,5 mM) käytettiin sen heikomman liukenevuuden vuoksi. Aktiivisuustestejä tehtiin kuvatulla tavalla *p*-nitrofenyylibutyraatille (*p*-NPB) pH:ssa 7, 40 °C:ssa (esimerkki 1).
 30 Saadut spesifit aktiivisuudet on esitetty kuviossa 4. CcCUT:n ja TrCUT:n aktiivisuus oli korkeampi lyhyemmillä (C2 - C10) rasvahapoilla kuin pidemmällä (C16 ja C18). Yllättäen *p*-NP asetaattien (C2) ja propionaattien (C3) aktiivisuuksien havaittiin olevan selvästi korkeampia kuin *p*-NPB:llä (C4). CcCUT:n ja TrCUT:n C4/C16 -suhde oli 1,8 ja vastaavasti 3,1. Tyypillisesti kutinaasien
 35 aktiivisuus on korkeampi rasvahapoilla C2 - C8, ja suhde C4/C16 on välillä 1 -

4. C4/C16 -suhde, joka on noin 1 tai <1 indikoi, että kutinolyttistä aktiivisuutta ei ole (Kolattukudy, 1984).

Lipaasi- ja kolesteryyliesteraasiaktiivisuus

Lipaasiaktiivisuutta testattiin käyttämällä oliiviöljyemulsiota sub-
5 straaattina Kontkasan et al. (2004) mukaan. Taulukossa 5 on esitetty CcCUT:n ja TrCUT:n lipaasiaktiivisuus.

Kolesteryyliesteraasin (CE) aktiivisuuden määrittämiseen käytetty testi perustui vapautuneen kolesterolin spektrofotometriseen määrittämiseen Tenkasan et al. (2002) mukaan tehdyn 4,3 mM:n kolesteryylioleaatin hydrolyysin jälkeen. CcCUT-valmisteessa ei ilmennyt kolesteryyliesteraasiaktiivisuutta. TrCUT-valmisteen aktiivisuutta ei määritetty.

Proteiinikoe

Proteiinikonsentraatio määritettiin Bio-Rad DC -proteiinitestipakkauksella (Bio-Rad, Richmond, Kalifornia), jossa standardina käytettiin naudan
15 seerumin albumiinia.

Lämpötilan vakaus

CcCUT:n ja TrCUT:n lämpötilan vakaus tutkittiin inkuboimalla entsyymejä 30 - 80 °C:ssa 1, 3 ja 20 tuntia 5 mg/ml proteiinikonsentraatiossa ja pH:ssa 5 (20 mM natriumasetatipuskuria). Inkubaatioiden jälkeen jäännösaktiivisuus mitattiin käyttämällä *p*-NPB:tä substraattina (pH 7 ja 40 °C). CcCUT oli melko vakaa 50 °C:een lämpötiloihin asti, mutta jäännösaktiivisuus laski jyrkästi 60 °C:ssa. TrCUT oli jokseenkin vakaa ja säilytti 80 % aktiivisuudestaan, kun sitä inkuboitettiin 50 °C:ssa 20 tuntia tai 60 °C:ssa 1 tunti (taulukko 5).

pH:n vakaus

CcCUT:n ja TrCUT:n pH:n vakaus määritettiin inkuboimalla puhdistettuja entsyymiliuoksia eri pH-arvoissa huoneenlämpötilassa ja 50 °C:ssa 20 tuntia. Liuoksen pH säädettiin Mcllvainen puskurilla (0,2 M Na₂HPO₄:a ja 0,1 M sitruunahappoa) pH:ssa 2,2 - 8,0, 0,2 M Tris-HCl -puskuria pH:ssa 7,2 - 9,1 tai 0,2 M glysiini-NaOH-puskuria pH:ssa 8,6 - 10,6, jotta saatiin 5 mg ml⁻¹ proteiinikonsentraatio. Jäännösaktiivisuus mitattiin *p*-NPB:llä pH:ssa 7 ja 40 °C:ssa. Tulokset on esitetty taulukossa 5. Siitä voidaan nähdä, että molemmat entsyymit olivat aktiivisia laajalla pH-alueella, johon kuului myös hapan alue. CcCUT:n jäännösaktiivisuus oli noin 80 % pH:ssa 3 huoneenlämpötilassa, kun

taas jäännösaktiivisuus 50 °C:ssa oli noin 40 % pH:ssa 5 ja noin 100 % pH:ssa 6. Osoittautui, että TrCUT säilytti yli 90 % aktiivisuudestaan pH-alueella 4 - 7.

pH-optimi

Puhdistettujen kutinaasivalmisteiden esteraasiaktiivisuuksia mitattiin eri pH-arvoilla käyttämällä McIlvainen puskuria (0,2 M Na₂HPO₄:a ja 0,1 M sitruunahappoa) pH:ssa 2,3 - 8,0, 0,2 M Tris-HCl -puskuria pH:ssa 7,2 - 9,1 ja 0,2 M glysiini-NaOH -puskuria pH:ssa 8,6 - 10,6 käyttämällä p-NPB:tä substraattina. Reaktioaika oli 10 minuuttia 40 °C:ssa. Tulokset on esitetty taulukossa 5. CcCUT:n pH-optimi oli noin 7 - 8, kun taas TrCUT:lla ilmeni kaksi selvästi erilaista pH-optimia (noin 4 ja 8). TrCUT on siis sopiva happamammalla alueella tapahtuviin käsittelyihin.

Taulukko 5. *Coprinus cinereus* -kutinaasin 09668 (CcCUT) ja *Trichoderma reesei* -kutinaasin (TrCUT) biokemiallisia ominaisuuksia

| Ominaisuus | | CcCUT | TrCUT |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Molekyylipaino, kDa (SDS-PAGE) | | 22 (20,8 ^a) | 28 (25,9 ^a) |
| Kypsän proteiinin pituus (aa) | | 181 | 231 |
| Lämpövakaus (pH 5) | T _{1/2} 50°C | >20 h (70%) | >20 h (80%) |
| | T _{1/2} 55°C | 3 h | n.d. |
| | T _{1/2} 60°C | < 1h | 1,5 h |
| pH-vakaus (20h) | 50°C | 6-9 | 4-7 |
| | 23°C | 4-9 | n.d. |
| pH-optimi (p-NPB:lla) | | 7-8 | 4 ja 8 |
| Aktiivisuus (nkat mg ⁻¹) | Lipaasi | 234 | 88 |
| | CE | 0 | n.d. |

a) teoreettinen Mw

15 n.d. = ei määritetty (not determined)

Esimerkki 11. Eristetyn omenakutiinin hydrolyysi

Eristettyä omenakutiinia käsiteltiin CcCUT:lla ja TrCUT:lla. Substraatti käsiteltiin entsyymaattisesti ja kemiallisesti karbohydraattien ja pektiinin sekä ei-kovalenttisten lipidien poistamiseksi, tässä järjestyksessä. Kutiini suspendoitiin 0,2 M:ssa natriumfosfaattipuskuria, pH 8, 20 mg ml⁻¹:n konsentraatiossa ja käsiteltiin CcCUT:lla ja TrCUT:lla 45 °C:ssa 20 tunnin ajan. Entsyymiannokset olivat 1000 ja 10 000 nkat g⁻¹ substraattia (p-NPB-aktiivisuus), ja käsittelyt tehtiin Triton X-100 -lisäyksellä ja ilman sitä. Hydrolysaatit uutettiin

5 kahdesti 2 MTBE-volyymillä, jotta kaikki rasvahapot, sekä mono- että oligomeerit, saatiin talteen kiinteästä matriisista. MTBE-uutteessa olevia vapaita rasvahappoja analysoitiin suoraan sekä vapautuneiden oligomeerien alkalihydrolyysin jälkeen käyttämällä entsyymattista kolorimetristä menetelmää (Free fatty acids, Roche Diagnostics Ltd.) Vapautuneiden rasvahappojen määrä on esitetty taulukossa 6. Molemmat kutinaasit kykenivät hydrolysoimaan omenakutiinia.

Taulukko 6. Omenakutiinin käsittely CcCUT:lla ja TrCUT:lla

| Entsyymi | Annos (nkat/g) | Ei pesuainetta | | 0,1% Triton X-100 | |
|----------|-------------------|----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| | | Monomeerit* | Mono- ja oligomeerit* | Mono-meerit* | Mono- ja oligomeerit* |
| Viite | 0 | 0,23 | 0,51 | 0,22 | 0,63 |
| CcCut | 1000 | 3,30 | 2,61 | 1,53 | 1,68 |
| | 10 000 | 7,30 | 10,08 | 3,97 | 6,50 |
| TrCut | 1000 | 0,85 | 1,21 | 0,57 | 0,74 |

* % substraatista, steariinihappona laskettuna (284,5 g/mol)

Esimerkki 12. Koivuntuohen suberiinin hydrolyysi

10 Höyry-räjätettyä koivun ulomman tuohen suberiinia käsiteltiin CcCUT:lla ja TrCUT:lla vastaavalla tavalla kuin edellä kuvatuissa kutiinikäsittelyissä. Tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Koivun tuohen suberiinin käsittely CcCUT:lla ja TrCUT:lla

| Entsyymi | Annos (nkat/g) | Ei pesuainetta | | 0,1% Triton X-100 | |
|----------|-------------------|----------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| | | Monomeerit* | Mono- ja oligomeerit* | Mono-meerit* | Mono- ja oligomeerit* |
| Viite | 0 | 0,04 | 0,07 | 0,06 | 0,09 |
| CcCut | 1000 | 0,30 | 0,24 | 0,48 | 0,45 |
| | 10 000 | 1,91 | 1,75 | 2,70 | 2,67 |
| TrCut | 1000 | 0,31 | 0,33 | 0,41 | 0,40 |

* % substraatista, steariinihappona laskettuna (284,5 g/mol)

15 Esimerkki 13. Kuorittujen vehnäjiyvien käsittely

Kuorittuja vehnäjiyviä käsiteltiin kutinaasilla (CcCUT) kuorten poistamiseksi, koska ne koostuvat pääasiassa substituoitumattomasta lineaarisesta ksylaanista ja kutiinikerroksista. Jyviä (2 g) käsiteltiin vesisuspensioissa

20 %:n kuiva-ainepitoisuudella 30 °C:ssa 2 tuntia ravistellen (100 rpm). CcCUT testattiin entsyymiannoksista, joissa oli 500 ja 5000 nkat g⁻¹:n substraatti (*p*-NPB-aktiivisuutena). Kahden erilaisen ksylanaasin ja lipaasin vaikutus tutkittiin myös. Entsyymikäsittelyiden jälkeen tehtiin sentrifugointi (9700 g/10 min) neste- ja kiinteäfaasien erottamiseksi. Jyvät pestiin vedellä (10 ml) ja sentrifugointi toistettiin. Jyvät pakastekuivattiin ja punnittiin painonmenetyksen analysoimiseksi. Vertailukäsittelyt tehtiin identtisissä olosuhteissa, mutta ilman entsyymilisäyksiä. Vapautuneiden rasvahappojen määrä analysoitiin MTBE-uutoksen jälkeen, ja rasvahapot liuotettiin EtOH/Triton/vesi-liuokseen. Pelkistyvät sokerit analysoitiin nestenäytteistä DNS-menetelmällä (Bernfield, 1955).

Vapautuneiden rasvahappojen ja solubilisoitujen hiilihydraattien määrät entsyymikäsittelyjen jälkeen on esitetty taulukossa 8. Siitä voidaan nähdä, että CcCUT selvästi lisäsi käytetyissä olosuhteissa vapautuneiden rasvahappojen määrää. Käsittelyillä ei ollut mitään vaikutusta hiilihydraattien määrään. Jyvien ulkonäössä ei havaittu muutoksia kutiinoin kohdistuvaa selektiivistä toimintaa osoittavien käsittelyjen jälkeen.

Taulukko 8. Kuorittujen vehnäyriiden entsyymikäsittely

| Käsittely | Annos (nkat g ⁻¹) | Muut entsyymit | Rasvahapot (mg) | Hiilihydraatit (mg) |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------|---------------------|
| Viite | - | - | 0,40 | 4,7 |
| CcCUT | - | ksylanaasiA 100 nkat g ⁻¹ | 0,32 | 5,3 |
| CcCUT | - | ksylanaasiB 100 nkat g ⁻¹ | 0,45 | 5,9 |
| CcCUT | 500 | - | 0,53 | 4,4 |
| CcCUT | 5000 | - | 1,23 | 3,7 |
| CcCUT | 500 | ksylanaasiA 100 nkat g ⁻¹ | 0,88 | 5,0 |
| CcCUT | 5000 | ksylanaasiA 100 nkat g ⁻¹ | 1,02 | 4,2 |
| CcCUT | 500 | ksylanaasiB 100 nkat g ⁻¹ | 1,08 | 4,9 |
| CcCUT | 5000 | ksylanaasiB 100 nkat g ⁻¹ | 0,98 | 4,8 |
| CcCUT | - | lipaasiA 1000 nkat g ⁻¹ | 0,77 | 4,0 |
| CcCUT | 1000 | lipaasiA 1000 nkat g ⁻¹ | 1,42 | 3,7 |

Kirjallisuusviittet

- Bernfeld, P. (1955) Amylases, a and b. Teoksessa: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (toim.) Methods of enzymology, Vol 1, Academic press, NY, s. 149-158.
- Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. (1999) Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng.* 66:17-34.
- Coen, D.M. 2001. The polymerase chain reaction. Teoksessa: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., More, D.D., Seidman, J.G., Smith, K. and Struhl, K. (toim.) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, USA.
- Davies, K.A., de Lorono, I., Foster, S.J., Li, D., Johnstone, K., Ashby, A.M. (2000) Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:63-75.
- Fett, W.F., Gerard, H.C., Moreau, R.A., Osman, S.F., Jones, L.E. (1992) Cutinase production by *Streptomyces* spp. *Curr Microbiol.* 25:165-71.
- Garcia-Lepe, R., Nuero, O.M., Reyes, F. (1997) Lipases autolysed cultures of filamentous fungus, *Letters in Applied Microbiology.* 25(2):127-130
- Gindro, K., Pezet, R. (1999) Purification and characterization of a 40.8-kDa cutinase in ungerminated conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *FEMS Microbiol Letters* 171:239-243.
- Gellissen, G. (toim.) 2005. Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim, Saksa.
- Kolattukudy, P.E. (1984) Cutinases from fungi and pollen. Teoksessa: Lipases (Borgström, B., Brockman, T. Toim.). Elsevier, Amsterdam. 471-504.
- Kontkanen, H., Tenkanen, M., Fagerström, R., Reinikainen, T. (2004) Characterisation of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. *J Biotechnol.* 108:51–59.
- Köller, W., Allan, C.R., Kolattukudy, P.E. (1982) Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Physiol Plant Pathol.* 20:47-60.
- Köller, W., Parker, D.M. (1989) Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phys Biochem.* 79:278-83.

- Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K., Nakajima, T. (2005) Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67:778-88.
- 5 Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M. (1996) Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 62(10):3840-6.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., Knowles, J. K. C. (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Gene* 61:155-164
- 10 Raeder, U., Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol.* 1:17-20.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
- 15 Tenkanen, M., Kontkanen, H., Isoniemi, R., Spetz, P., Holmbom, B. (2002) Hydrolysis of steryl esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:120–127.
- 20 Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- 25 Trail, F., Köller, W. (1993) Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicola*. *Physiol Molec Plant Pathol.* 42:205-20.

Patenttivaatimukset

1. Polyesteraasiproteiini, joka sisältää aminohapposekvenssin, jolla on ainakin 50-prosenttinen identtisyys sekvenssin nro 2 tai 6 kanssa, tai sen variantin, jolla on polyesteraasiaktiivisuutta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, joka mainittu proteiini käsittää sekvenssin nro 4, 7, 8 tai 9 mukaisen aminohapposekvenssin, tai sen variantin, jolla on polyesteraasiaktiivisuutta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, jolla mainitulla proteiinilla on vähintään 80-, 90-, 95- tai 98-prosenttinen identtisyys sekvenssin nro 2, 4 tai 6 kanssa.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, jolla proteiinilla on vähintään kutinaasi- tai suberinaasiaktiivisuutta tai molempia.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen proteiini, jolla lisäksi on lipaasiaktiivisuutta.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen proteiini, joka proteiini on peräisin sienestä *Coprinus*, edullisesti *Coprinus cinereus*.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen proteiini, joka mainittu proteiini on peräisin sienestä *C. cinereus*, ja sisältää aminohapposekvenssin, joka vastaa sekvenssiä nro 2, 4, 6, 7, 8 tai 9, tai sen variantin, jolla on vähintään kutinaasi- tai suberinaasiaktiivisuutta tai molempia.

8. Eristetty polynukleotidi, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu:

a) polynukleotidista, joka sisältää sekvenssin nro 1, 3, tai 5, mukaisen nukleodisekvenssin, tai nukleotidisekvenssin, joka koodaa patenttivaatimuksen 1 mukaista proteiinia,

b) kohdan a) komplementaarisesta säikeestä, ja

c) sekvenssistä, joka on degeneroitunut geneettisen koodin suhteen jonkin kohdan a) tai b) mukaisesta sekvenssistä.

9. Vektori, joka sisältää patenttivaatimuksen 8 mukaisen polynukleotidin.

10. Geneettisesti modifioitu mikro-organismi, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 9 mukaisella vektorilla.

11. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen polyesteraasiproteiinin tuottamiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa transformoidaan mikro-organismi vektorilla, joka sisältää patenttivaatimuksen 8 mukaisen poly-

nukleotidin, viljellään transformoitu mikro-organismi olosuhteissa, jotka sallivat mainitun polynukleotidin ekspression, ja otetaan talteen ekpressoitu proteiini.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, jossa polynukleotidi saadaan sienestä *Coprinus cinereus*, ja ekpressoidaan isännässä, joka
5 valitaan ryhmästä, joka koostuu seuraavista: *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus* ja bakteerit, etenkin isäntä on *T. reesei*.

13. Entsyymivalmiste, joka sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaista proteiinia.

14. Menetelmä kutiin, suberiinin tai muun polyesterin hydrolysoi-
10 miseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa kutiinia, suberiinia tai muuta polyesteriä sisältävää materiaalia käsitellään patenttivaatimuksen 1 mukaisella proteiinilla olosuhteissa, jotka sallivat mainitun polyesterin osittaisen hydrolyysin tai kokonaishydrolyysin.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, joka menetelmä käsittää vaiheen, jossa maatalous- tai elintarvikeraaka-aineita tai vihanneksista, hedelmistä, marjoista tai viljoista saatuja sivutuotteita käsitellään mainitulla proteiinilla.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, joka menetelmä käsittää vaiheen, jossa puun raaka-aineita, massa- tai paperituotteita, prosessin jätteitä tai vesiä tai sivutuotteita käsitellään mainitulla proteiinilla.
20

17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, joka käsittää vaiheen, jossa modifioidaan synteettisiä tai muita ihmisen valmistamia polyesterikuituja tai -tekstiilejä mainitulla proteiinilla.

18. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, joka käsittää vai-
25 heen, jossa mainitulla proteiinilla poistetaan tahroja tai rasvaa pyykistä tai tiskistä.

19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, joka käsittää vaiheen, jossa depolymerisoidaan kutiinia tai suberiinia mainitulla proteiinilla.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen proteiinin tai patenttivaatimuksen 13 mukaisen entsyymivalmisteen käyttö elintarviketeollisuudessa, massa- ja paperiteollisuudessa, tekstiiliteollisuudessa, tai pyykki- ja astianpesusoveluksissa tai kemiallisessa synteessissä.
30

Patentkrav

1. Polyesterasprotein, som innehåller en aminosyrasekvens som har åtminstone 50-procents identitet med sekvens nr 2 eller 6, eller en variant därav med polyesterasaktivitet.

2. Protein enligt patentkrav 1, vilket protein innehåller en aminosyrasekvens enligt sekvens nr 4, 7, 8 eller 9, eller en variant därav med polyesterasaktivitet.

3. Protein enligt patentkrav 1, vilket protein har åtminstone 80-, 90-, 95- eller 98-procents identitet med sekvens nr 2, 4 eller 6.

4. Protein enligt patentkrav 1, vilket protein har minst kutinas- eller suberinasaktivitet eller båda.

5. Protein enligt patentkrav 4, vilket dessutom har lipasaktivitet.

6. Protein enligt patentkrav 1, vilket protein härstammar från svampen *Coprinus*, företrädesvis *Coprinus cinereus*.

7. Protein enligt patentkrav 6, vilket protein härstammar från svampen *C. cinereus*, och vilket innehåller en aminosyrasekvens som motsvarar sekvens nr 2, 4, 6, 7, 8 eller 9, eller en variant därav, med minst kutinas- eller suberinasaktivitet eller båda.

8. Isolerad polynukleotid, som valts ur gruppen som består av:

a) en polynukleotid som innehåller en nukleotidsekvens enligt sekvens nr 1, 3 eller 5, eller en nukleotidsekvens som kodar för ett protein enligt patentkrav 1,

b) en sekvens som är komplementär till sekvensen i punkt a), och

c) en sekvens, som är degenererad i förhållande till den genetiska koden till en sekvens enligt punkt a) eller b).

9. Vektor som innehåller en polynukleotid enligt patentkrav 8.

10. Genetiskt modifierad mikroorganism, som transformerats med en vektor enligt patentkrav 9.

11. Förfarande för att framställa ett polyesterasprotein enligt patentkrav 1, vilket förfarande omfattar steg där man transformerar en mikroorganism med en vektor som innehåller en polynukleotid enligt patentkrav 8, odlar den transformerade mikroorganismen under betingelser som tillåter expression av nämnda polynukleotid, och tar tillvara det uttryckta proteinet.

12. Förfarande enligt patentkrav 11, där polynukleotiden erhålls ur svampen *Coprinus cinereus*, och uttrycks i en värd, som väljs ur gruppen

som består av: *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus* och bakterier, företrädesvis är värden *T. reesei*.

13. Enzympreparat som innehåller ett protein enligt patentkrav 1.

14. Förfarande för att hydrolysera kutin, suberin eller någon annan polyester, vilket förfarande innehåller steg där man behandlar kutin, suberin eller något annat material som innehåller polyester med ett protein enligt patentkrav 1 under betingelser som tillåter partiell eller total hydrolys av nämnda polyester.

15. Förfarande enligt patentkrav 14, vilket omfattar ett steg där man behandlar råvaror för jordbruk eller livsmedel eller biprodukter som erhållits ur grönsaker, frukter, bär, eller säd med nämnda protein.

16. Förfarande enligt patentkrav 14, vilket omfattar ett steg där man behandlar träråvaror, massa- eller pappersprodukter, processavfall eller -vatten eller biprodukter med nämnda protein.

17. Förfarande enligt patentkrav 14, vilket omfattar ett steg där man modifierar syntetiska eller andra av människan framställda polyesterfiber eller -textiler med nämnda protein.

18. Förfarande enligt patentkrav 14, vilket omfattar ett steg där man med nämnda protein avlägsnar fläckar eller fett från byke eller disk.

19. Förfarande enligt patentkrav 14, vilket omfattar ett steg där man depolymeriserar kutin eller suberin med nämnda protein.

20. Användning av ett protein enligt patentkrav 1, eller ett enzympreparat enligt patentkrav 13 inom livsmedelsindustrin, massa- eller pappersindustrin, textilindustrin, eller inom tvätt- eller diskmedelstillämpningar eller i kemisk syntes.

SEQUENCE LISTING

<110> Valtion teknillinen tutkimuskeskus

<120> Novel Esterases and Their Use

<130> 2070737FI

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 714

<212> DNA

<213> Coprinus cinereus

<400> 1

```

atgaagttca ccaactctgc caccctcgcc ctcgggcgcc tctccgctct cgctgccccca    60
gtcacagagc tcgagtcccg ccagctcttc tgcagggagc tgtacgtctt cttcgctcgt    120
ggaaccggtg aagtcggcac cttgggtacc gtcggttggtc ctggcctcag tgcagcggtc    180
aagctcgtctg ttcgggactc tgtcgagttc gagggcattg actaccccgc cctcgtctcc    240
ggctacctcg ctggtggcga ccgtgggtgtt gcccgacca tggcaaaciaa ggtctcccaa    300
accgcgtccc gctgccccaa cgccaagatc ttcactctccg gctactcgta agttccgacg    360
ttccgtgact aaagctcagc gttccatggt gttgactcgc ctgtagaciaa ggtgcccagg    420
tcacccacct cgctgctcgc cagctctccg ctgcagacca ggcgagagtc actgggtgctg    480
tcaactttcgg tgaccatac agggatgatg ctctccccgg tggcctccaa agccgcagga    540
agacctactg caacgtcggg gacctcatct gtgccggcct tctaccctc cttgctcccc    600
actttacctt tggatcgggt agtgctacct gccacaatag ctgactctcc tcgctgacct    660
gcattgaaac aggacacccc cgacgctgct cgatggatcg ccgctcgcgt ttag          714
    
```

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

<213> Coprinus cinereus

<400> 2

```

Met Lys Phe Thr Thr Leu Ala Thr Leu Ala Leu Gly Ala Val Ser Ala
1           5           10          15
Leu Ala Ala Pro Val Thr Glu Leu Glu Ser Arg Gln Leu Phe Cys Arg
20          25          30
Asp Val Tyr Val Phe Phe Ala Arg Gly Thr Gly Glu Val Gly Thr Leu
35          40          45
Gly Thr Val Val Gly Pro Gly Leu Ser Ala Ala Val Lys Leu Ala Val
50          55          60
    
```

Arg Asp Ser Val Glu Phe Glu Gly Ile Asp Tyr Pro Ala Leu Val Ser
65 70 75 80

Gly Tyr Leu Ala Gly Gly Asp Arg Gly Gly Ala Arg Thr Met Ala Asn
85 90 95

Lys Val Ser Gln Thr Ala Ser Arg Cys Pro Asn Ala Lys Ile Phe Ile
100 105 110

Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Gln Val Thr His Leu Ala Ala Arg Gln
115 120 125

Leu Ser Ala Ala Asp Gln Ala Arg Val Thr Gly Val Val Thr Phe Gly
130 135 140

Asp Pro Tyr Arg Asp Asp Ala Leu Pro Gly Gly Leu Gln Ser Arg Arg
145 150 155 160

Lys Thr Tyr Cys Asn Val Gly Asp Leu Ile Cys Ala Gly Leu Pro Thr
165 170 175

Leu Leu Ala Pro His Phe Thr Tyr Gly Ser Asp Thr Pro Asp Ala Ala
180 185 190

Arg Trp Ile Ala Ala Arg Val
195

<210> 3

<211> 732

<212> DNA

<213> Coprinus cinereus

<400> 3

atgaagtgtt cgcacctgt cgcacctgcc ctggcgctg ccaccacctt cgccgcccc 60
attggtctcg aagcgcgaca aggcacctgc agcgatgtct atgtcttttt cgtgcgaggg 120
acgactgaga ctctgcacc cctagggcgac aggattgctc cgtttttcag ggatgcgctg 180
gtcaagctcg ttccagagaa atctgtggaa ttcactggcg tgcctatgc cgctggggtg 240
attggatata tcatcggggg tgaccctgag ggtgccaaa cgatggcgaa tatggttacg 300
acgactgtcc gccaatgttc gaatgcgaag attttcatgt ctgggtatag gtacgagttc 360
aaactacact tggttaaaac tgggtgctcga tgattggtgc tcaatgggtg tttcccgtct 420
tccagccaag gcgcccagg gaccacctt gctgctcgtc aactttcaga tgaggatctc 480
gaccgcgtca ctggggtagt cacctttggc gaccctgaca aggacactgc ccttcccgga 540
acacttgagc agagacggaa gactttctgt cgtaatgggg atttgatttg cgaacgcgtg 600
catcttccgc ttctctctca tttcgaatat cataacgtac gtccttcacg gtattgatta 660

taggtcctgt cggctaattgg gtacatctag gatgccgaag aggctgctcg ctgggtcgcct 720
gaccgcgttt ag 732

<210> 4
<211> 200
<212> PRT
<213> Coprinus cinereus

<400> 4

Met Lys Phe Ser Ala Leu Val Ala Leu Ala Leu Gly Ala Ala Thr Thr
1 5 10 15

Phe Ala Ala Pro Ile Gly Leu Glu Ala Arg Gln Gly Thr Cys Ser Asp
20 25 30

Val Tyr Val Phe Phe Val Arg Gly Thr Thr Glu Thr Pro Ala Pro Leu
35 40 45

Gly Asp Arg Ile Ala Pro Phe Phe Arg Asp Ala Leu Val Lys Leu Val
50 55 60

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

Ile Gly Tyr Leu Ile Gly Gly Asp Pro Glu Gly Ala Lys Thr Met Ala
85 90 95

Asn Met Val Thr Thr Thr Val Arg Gln Cys Ser Asn Ala Lys Ile Phe
100 105 110

Met Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Gln Val Thr His Leu Ala Ala Arg
115 120 125

Gln Leu Ser Asp Glu Asp Leu Asp Arg Val Thr Gly Val Val Thr Phe
130 135 140

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

Arg Lys Thr Phe Cys Arg Asn Gly Asp Leu Ile Cys Glu Arg Val His
165 170 175

Leu Pro Leu Pro Pro His Phe Glu Tyr His Asn Asp Ala Glu Glu Ala
180 185 190

Ala Arg Trp Val Ala Asp Arg Val
195 200

<210> 5

<211> 823
<212> DNA
<213> Coprinus cinereus

<400> 5
atggtctcca aatcaactcac ctccctcgtc ctctctcgct tcaccctcac cgggtgctgca 60
gctggccccg cccccaccac cccctgcgcc caagtgcaca tcatcgccgc ccgcgcatcg 120
actgagcccc cgggccccgg catcgctcgg caactcatca cccagatcca gaaccagagt 180
tctcaaaccg tttccaccga ctcggtcgat taccctgcta cgcttgagaa ctacaacgag 240
agctcgctcg cgggtactgc ggcctcaag acgcacttga caaaccaggc gaataggtgc 300
cctaatacaga agattgtgct tattgggtac tcgcaggtga ggatggattg ctagtactac 360
tagtgcacatc ggctaagttg ttgatgggct tgcgttttcg tatagggcgc tcatatcatc 420
ggtgacactc tcgccggtgg aggaggcggg ctcttgggca cccgaactcc cgctatcgac 480
tctagcatcg ccaaccgagg ttcgtctccc ttctctttc ttccaccccc acacccccact 540
caagggcctc tctcccccaa cagtcgctgc cgtagccaaa ttcggcgacc cccgccacgt 600
ctccggcaag tcttacaacg agggcacagc tcgcagggac ggcatgttcc cccgcggcct 660
gaccaggac tacagcctca ccttccgctc gcgcgtcaag agctggtgcy actttaacga 720
ttgtttctgt gcttcgggctc tttcgactat cgtccatttg acgtaccttg agaggtacca 780
gaacgatgct gcgaggtttg ttcttgataa gattggtggt taa 823

<210> 6
<211> 229
<212> PRT
<213> Coprinus cinereus

<400> 6
Met Val Ser Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Leu Leu Ala Phe Thr Leu
1 5 10 15
Thr Gly Val Ala Ala Ala Pro Ala Pro Thr Thr Pro Cys Ala Gln Val
20 25 30
His Ile Ile Ala Ala Arg Ala Ser Thr Glu Pro Pro Gly Pro Gly Ile
35 40 45
Val Gly Gln Leu Ile Thr Gln Ile Gln Asn Gln Ser Ser Gln Thr Val
50 55 60
Ser Thr Asp Ser Val Asp Tyr Pro Ala Thr Leu Glu Asn Tyr Asn Glu
65 70 75 80
Ser Ser Ser Ala Gly Thr Ala Ala Leu Lys Thr His Leu Thr Asn Gln
85 90 95

Ala Asn Arg Cys Pro Asn Gln Lys Ile Val Leu Ile Gly Tyr Ser Gln
100 105 110

Gly Ala His Ile Ile Gly Asp Thr Leu Ala Gly Gly Gly Gly Gly Leu
115 120 125

Leu Gly Thr Arg Thr Pro Ala Ile Asp Ser Ser Ile Ala Asn Arg Val
130 135 140

Val Ala Val Ala Lys Phe Gly Asp Pro Arg His Val Ser Gly Lys Ser
145 150 155 160

Tyr Asn Glu Gly Thr Ala Arg Arg Asp Gly Met Phe Pro Arg Gly Leu
165 170 175

Thr Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Phe Arg Ser Arg Val Lys Ser Trp Cys
180 185 190

Asp Phe Asn Asp Leu Phe Cys Ala Ser Gly Leu Ser Thr Ile Val His
195 200 205

Leu Thr Tyr Leu Glu Arg Tyr Gln Asn Asp Ala Ala Arg Phe Val Leu
210 215 220

Asp Lys Ile Gly Gly
225

<210> 7
<211> 199
<212> PRT
<213> Coprinus cinereus

<400> 7

Met Lys Phe Thr Thr Leu Val Thr Leu Ala Leu Gly Ala Val Ser Ala
1 5 10 15

Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Leu Glu Ser Arg Gln Leu Phe Cys Arg
20 25 30

Asp Val Tyr Val Phe Phe Ala Arg Gly Thr Gly Glu Ile Gly Thr Leu
35 40 45

Gly Thr Val Val Gly Pro Ser Phe Ser Ala Ala Val Ser Leu Ala Val
50 55 60

Arg Gly Ser Val Asp Phe Glu Gly Ile Asp Tyr Pro Ala Leu Val Thr
65 70 75 80

Gly Tyr Leu Ala Gly Gly Asp Arg Gly Gly Ala Arg Thr Met Ala Asp
85 90 95

Lys Val Ala Ser Thr Ala Ser Arg Cys Pro Asn Ala Lys Ile Phe Ile
100 105 110

Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Gln Val Thr His Leu Ala Ala Arg Gln
115 120 125

Leu Ser Ala Ala Asn Gln Ala Arg Val Thr Gly Val Val Thr Phe Gly
130 135 140

Asp Pro Tyr Arg Asp Asp Ala Leu Pro Gly Gly Leu Asp Ser Arg Arg
145 150 155 160

Lys Thr Tyr Cys Asn Phe Gly Asp Leu Ile Cys Asp Gly Leu Pro Thr
165 170 175

Ile Leu Ala Pro His Leu Thr Tyr Gly Ser Asp Ala Ser Asp Ala Ala
180 185 190

Arg Trp Val Ala Ala Arg Val
195

<210> 8
<211> 199
<212> PRT
<213> Coprinus cinereus

<400> 8

Met Lys Phe Phe Ala Leu Ala Thr Leu Ala Ile Gly Ala Leu Ser Ala
1 5 10 15

Leu Ala Ala Pro Val Ala Gln Ile Asp Thr Arg Gln Leu Arg Cys Asp
20 25 30

Asp Val Tyr Val Phe Phe Ala Arg Gly Thr Thr Glu Ile Gly Thr Leu
35 40 45

Gly Thr Val Ile Gly Pro Arg Leu Arg Thr Ala Val Ser Arg Ala Val
50 55 60

Arg Gly Ser Val Thr Phe Glu Gly Ile Asp Tyr Pro Ala Val Val Ala
65 70 75 80

Gly Phe Leu Ala Gly Gly Asp Arg Gly Gly Ala Arg Thr Met Ala Gln
85 90 95

Lys Val Ser Ser Ile Ala Ala Gln Cys Pro Asp Ala Lys Ile Phe Ile
100 105 110

Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Gln Val Thr His Leu Ala Ala Arg Gln
115 120 125

Leu Ser Ala Ala Asp Gln Ala Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Phe Gly
130 135 140

Asp Pro Asn Arg Asp Arg Ala Leu Pro Gly Gly Leu Glu Asn Arg Arg
145 150 155 160

Lys Thr Phe Cys Asn Ala Gly Asp Leu Ile Cys Ala Gly Arg Ser Thr
165 170 175

Ile Leu Leu Pro His Leu Thr Tyr Gly Ser Asp Ala Thr Glu Ala Ala
180 185 190

Ser Phe Ile Ala Gly Arg Val
195

<210> 9
<211> 216
<212> PRT
<213> Coprinus cinereus

<400> 9

Met Arg Leu Ser Pro Leu Leu Pro Leu Ile Thr Leu Ala Ser Leu Thr
1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Val Pro Ile Pro Asn Pro Ile Ile Glu His Asp Asp
20 25 30

Leu Asp Ile Arg Asp Leu Leu Glu Ala Arg Gln Val Thr Cys Arg Ser
35 40 45

Val His Val Leu Phe Ala Arg Gly Thr Ala Glu Thr Pro Thr Leu Gly
50 55 60

Glu Val Val Gly Pro Gly Phe Arg Asp Asn Leu Ile Lys Val Leu Pro
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Leu Ser Phe Ala Gly Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Tyr
85 90 95

Leu Gly Tyr Leu Gln Gly Gly Asp Lys Glu Gly Ala Lys Thr Met Ala
100 105 110

Thr Ala Ala Ala Asn Ile Ala Lys Ser Cys Pro Ser Ala Lys Ile Phe
115 120 125

Leu Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Gln Val Val His Leu Ala Ala Ala
130 135 140

Gln Leu Ala Ser Ser Val Gln Ser Arg Ile Asn Gly Val Ile Thr Phe
145 150 155 160

Gly Asp Pro Tyr Val Lys Arg Ala Leu Pro Gly Ala Met Glu Asn Arg
165 170 175

Arg Lys Thr Phe Cys Asn Asp Gly Asp Lys Ile Cys Glu Gly Leu Pro
180 185 190

Leu Val Thr Asp Pro His Met Asn Tyr Lys Ser Ser Trp Asp Pro Ala
195 200 205

Ala Arg Trp Val Ala Phe Arg Val
210 215

<210> 10
<211> 1120
<212> DNA
<213> *Trichoderma reesei*

<400> 10
caggacaggt gaggagtata taaagagtct ggattgactc cgagttctac ttctctcgg 60
ccattctctg gtgtctcttg gagcaaaagc agcccttcag cctctcagca tcttcaactcg 120
caaaaaaacc cacttacaag atgcggtcct tggccattct caccaccctc ctgcagggcc 180
atgcctttgc ataccccaag ccagccccc agtcagtcaa tcgcagggac tggccttcga 240
tcaacgagtt cctctctgag ttggccaagg tgatgccc atggcgacacc atcacggctg 300
cctgcgacct cattagcgat ggtgaagacg ccgctgcttc cctctttggc atctcggaga 360
cgaaaaacga tccttgccgc gacgtgacag tcttgcttgc tcgaggcact tgcgatcctg 420
gaaacgtcgg cgtgcttgtc ggcctttggt tctttgattc tctgcagacg gcgcttggtg 480
gcaggacctt gggcgtcaag ggagttccgt atctgcgag cgtgcaggac ttctgtcgg 540
gctccgttca gaatggcatc aacatgtaag tctctccat catgacggta cttatccatt 600
acaatgtcaa ccaagccaga tactgactct tgatgtttaa aaaagggcca accagatcaa 660
gtctgtcctc cagagctgcc ccaacaccaa gctcgtcctc ggcggtact cccaggggaag 720
catggtcgtc cacaacgcgg cgagcaacct cgacgccgag acaatgtcaa agatcagcgc 780
cgtggtgctc tttggcgacc cttactacgg caagcccgtg gctaactttg acgcggtctaa 840
gacgctggtt gtgtgccatg atggagacaa catttgccag ggtggtgaca ttatcttggt 900
gccgcatttg acgtatgccg aagatgcgga tacggctgct gcttttgtgg tgcctcttgt 960
ttcttgaagt cttggagagg gttacggaag aggttgtag agtcaaagta tggagaatgg 1020
gcgaacataa aaaaaagggg tcaatgattg tatatagcga aagccactga acatattgta 1080
tataagcaag cgttatgaga tacatcaatc atgttttgac 1120

<210> 11
<211> 248
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 11

Met Arg Ser Leu Ala Ile Leu Thr Thr Leu Leu Ala Gly His Ala Phe
1 5 10 15

Ala Tyr Pro Lys Pro Ala Pro Gln Ser Val Asn Arg Arg Asp Trp Pro
20 25 30

Ser Ile Asn Glu Phe Leu Ser Glu Leu Ala Lys Val Met Pro Ile Gly
35 40 45

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

Ala Ala Ser Leu Phe Gly Ile Ser Glu Thr Glu Asn Asp Pro Cys Gly
65 70 75 80

Asp Val Thr Val Leu Phe Ala Arg Gly Thr Cys Asp Pro Gly Asn Val
85 90 95

Gly Val Leu Val Gly Pro Trp Phe Phe Asp Ser Leu Gln Thr Ala Leu
100 105 110

Gly Ser Arg Thr Leu Gly Val Lys Gly Val Pro Tyr Pro Ala Ser Val
115 120 125

Gln Asp Phe Leu Ser Gly Ser Val Gln Asn Gly Ile Asn Met Ala Asn
130 135 140

Gln Ile Lys Ser Val Leu Gln Ser Cys Pro Asn Thr Lys Leu Val Leu
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ser Met Val Val His Asn Ala Ala Ser Asn
165 170 175

Leu Asp Ala Ala Thr Met Ser Lys Ile Ser Ala Val Val Leu Phe Gly
180 185 190

Asp Pro Tyr Tyr Gly Lys Pro Val Ala Asn Phe Asp Ala Ala Lys Thr
195 200 205

Leu Val Val Cys His Asp Gly Asp Asn Ile Cys Gln Gly Gly Asp Ile
210 215 220

Ile Leu Leu Pro His Leu Thr Tyr Ala Glu Asp Ala Asp Thr Ala Ala
 225 230 235 240

Ala Phe Val Val Pro Leu Val Ser
 245

<210> 12
 <211> 1332
 <212> DNA
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 12
 atgacgtgga atccagatat tgcgacctgg ttgctgctgt tggcgtggc tccaatccgc 60
 ggtctctgcc tggttgogca gggccgtgga tggcagccgt acgagcatcg ccctgaaaat 120
 gaacagctgg tgctacaacc tcctcctcca gactcgtccg cagccactcg accctccgct 180
 ccctacgcac cgcccttccc cagtcgacca ggcagccgtc cgtccggctt tattgcctc 240
 ggcgactcgt actcggccgg cataggcaca ggcctcatca atggcaccga agatgaatgt 300
 cgccgcggtg ccaacgccta cccgggtgctg gtgcagcgcg acctccaccg cagtctggac 360
 gggggccacg acccaacctt tcagtttctc tcctgcacgg gctctactgt tggtgacatg 420
 cttaccgggg ccgagcgcag ccagatcgat ggcttcaaca caacctcgac ggccgacttt 480
 gctctttctc ccattggcgg caacgacctg ggctttctcg acatcatgaa tagctgcac 540
 ttccgattct acagcttcta ctccggcacc tgcgagactg ctctccgcca cgccgacgag 600
 cagatggcca gttcggattt tgaaaaccgt cttcgacttg tcatcatgga gattctcgac 660
 cgcgtccgct gggagaagag gccgtggttc accattaccg tgacgggata tgcgcgcttc 720
 ttcaacgcgg atacggacga gtgcgacgac tactcctttg gcatgtggtg gcgcggcccc 780
 aagctggagc gcaagcttcg ccagcgcgatg aacgacatgg ttgtcgacgt caacaacaag 840
 atccggcgtt cagtcgacgc catcaacgcc gcctttgccg agccccgggt cctctttgtc 900
 gactacgacg aggcctttga ggggcatcgc ttctgcgagc caggcgtcgt tgagcccgac 960
 tacgcgagaa acgagacctg gttcttctct gtcggcggcc tggacaacaa cccgagcgcg 1020
 gagaagtccg tgctcgtggc agaagatgcc ctggtgcctc ccgactctcc actaatcgac 1080
 ccggagaact gcctcgaccc ggcacagacg tccggggact ggggggagct ggccttgtgt 1140
 atgatggcca tggccgctga gagggacccc atgcttcgaa aggcagacgg gcgggttgtg 1200
 gcggagaatt cgatgtggta tgtgcctaca tattacggca agacgtttca tccgcggagt 1260
 cttggccaca tggcaatgag agatcggatc tacaaggcat ggcgtgaaat gcacgttccg 1320
 acgatgagct ga 1332

<210> 13
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 13

Met Thr Trp Asn Pro Asp Ile Ala Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Pro Ile Arg Gly Leu Cys Leu Val Ala Gln Gly Arg Gly Trp Gln
20 25 30

Pro Tyr Glu His Arg Pro Glu Asn Glu Gln Leu Val Leu Gln Pro Pro
35 40 45

Pro Pro Asp Ser Ser Ala Ala Thr Arg Pro Ser Ala Pro Tyr Ala Pro
50 55 60

Pro Phe Pro Ser Arg Pro Gly Ser Arg Pro Ser Gly Phe Ile Ala Leu
65 70 75 80

Gly Asp Ser Tyr Ser Ala Gly Ile Gly Thr Gly Leu Ile Asn Gly Thr
85 90 95

Glu Asp Glu Cys Arg Arg Gly Ala Asn Ala Tyr Pro Val Leu Val Gln
100 105 110

Arg Asp Leu His Arg Ser Leu Asp Gly Gly His Asp Pro Thr Phe Gln
115 120 125

Phe Leu Ser Cys Thr Gly Ser Thr Val Gly Asp Met Leu Thr Gly Ala
130 135 140

Glu Arg Ser Gln Ile Asp Gly Phe Asn Thr Thr Ser Thr Ala Asp Phe
145 150 155 160

Ala Leu Leu Ser Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Phe Asp Ile Met
165 170 175

Asn Ser Cys Ile Phe Arg Phe Tyr Ser Phe Tyr Ser Gly Thr Cys Glu
180 185 190

Thr Ala Leu Arg His Ala Asp Glu Gln Met Ala Ser Ser Asp Phe Glu
195 200 205

Asn Arg Leu Arg Leu Val Ile Met Glu Ile Leu Asp Arg Val Arg Trp
210 215 220

Glu Lys Arg Pro Trp Phe Thr Ile Thr Val Thr Gly Tyr Ala Arg Phe
225 230 235 240

Phe Asn Ala Asp Thr Asp Glu Cys Asp Asp Tyr Ser Phe Gly Met Trp
245 250 255

Trp Arg Gly Pro Lys Leu Glu Arg Lys Leu Arg Gln Arg Met Asn Asp
260 265 270

Met Val Val Asp Val Asn Asn Lys Ile Arg Arg Ser Val Asp Ala Ile
275 280 285

Asn Ala Ala Phe Ala Glu Pro Arg Val Leu Phe Val Asp Tyr Asp Glu
290 295 300

Ala Phe Glu Gly His Arg Phe Cys Glu Pro Gly Val Val Glu Pro Asp
305 310 315 320

Tyr Ala Arg Asn Glu Thr Trp Phe Phe Leu Val Gly Gly Leu Asp Asn
325 330 335

Asn Pro Ser Ala Glu Lys Ser Val Leu Val Ala Glu Asp Ala Leu Leu
340 345 350

Pro Pro Asp Ser Pro Leu Ile Asp Pro Glu Asn Cys Leu Asp Pro Ala
355 360 365

Gln Thr Ser Gly Asp Trp Gly Glu Leu Ala Leu Cys Met Met Ala Met
370 375 380

Ala Ala Glu Arg Asp Pro Met Leu Arg Lys Ala Asp Gly Arg Val Val
385 390 395 400

Ala Glu Asn Ser Met Trp Tyr Val Pro Thr Tyr Tyr Gly Lys Thr Phe
405 410 415

His Pro Arg Ser Leu Gly His Met Ala Met Arg Asp Arg Ile Tyr Lys
420 425 430

Ala Trp Arg Glu Met His Val Pro Thr Met Ser
435 440

<210> 14
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 09668 eteenpäin suuntautuva aluke

<400> 14
gggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catgaagttc accactctcg cc

52

<210> 15
<211> 71
<212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> 09668 taaksepäin suuntautuva aluke
 <400> 15
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagtgggtg tggtggtggt gaacgcgagc 60
 ggcgatccat c 71
 <210> 16
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 07482 eteenpäin suuntautuva aluke
 <400> 16
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catgaagttt tccgccctcg tc 52
 <210> 17
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 07482 taaksepäin suuntautuva aluke
 <400> 17
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagtgggtg tggtggtggt gaacgcggtc 60
 agcgaccag 70
 <210> 18
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 05430 eteenpäin suuntautuva aluke
 <400> 18
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catggtctcc aatcactca cct 53
 <210> 19
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 05430 taaksepäin suuntautuva aluke
 <400> 19
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagtgggtg tggtggtggt gaccaccaat 60
 cttatcaaga acaaa 75
 <210> 20
 <211> 52

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 17732 eteenpäin suuntautuva aluke

 <400> 20
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catgcgggtcc ttggccattc tc 52

 <210> 21
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 17732 taaksepäin suuntautuva aluke

 <400> 21
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagtgggtg tggtggtggt gagaaacaag 60
 aggcaccaca aaag 74

 <210> 22
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Trichoderma reesei

 <400> 22
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catgtatcgg aagttggccg tcatctcggc 60
 cttcttggtc acagctcgtg ctctctgcct ggttgccgag g 101

 <210> 23
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Trichoderma reesei

 <400> 23
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctagtgggtg tggtggtggt gttgccatgt 60
 ggccaagact cc 72

Kuvio 1

```

CC1G_09668 MKFTTLATLALGAVSALAAPVTE-----LESRQLFCRDVYVFFARGTGEV 45
CC1G_03922 MKFTTLVTLALGAVSALAAPAAE-----LESRQLFCRDVYVFFARGTGEI 45
CC1G_11503 MKFFALATLALGALSALAAPVAQ-----IDTRQLCDDVYVFFARGTTEI 45
CC1G_07482 MKFSALVALALGATTTFAAPIG-----LEARQGTCSDVYVFFVVRGTET 44
CC1G_09365 MRLSPLLPLITLASLTLATFPVPIPNPIIEHDDLDIRDLLEARQVTCRSVHVLFARGTAEF 60
CC1G_05430 MVSKSLTSLVLLAFTLTGVAAAP-----APTTFCAQVHI I AARASTEP 43
* . * . * . . . . . : * . * : : . * : *
    
```

```

CC1G_09668 GT-LGTVVGPGLSAAVKLAVERD--SVEFEGIDYPALVSGYLAGGDRGGARTMANKVSQTA 102
CC1G_03922 GT-LGTVVGPSFSAAVSLAVRG--SVDVEGIDYPALVTGYLAGGDRGGARTMADKVASTA 102
CC1G_11503 GT-LGTVIGPRLRTAVSRAVRG--SVTFEGIDYPAVVAGFLAGGDRGGARTMAQKVSSIA 102
CC1G_07482 PAPLGDRIAPFFRDALVKLVPEK-SVEFTGVPYAAGLIGYLIIGDPEGAKTMANMVTITV 103
CC1G_09365 PT-LGEVVGPGFRDNLIKVLPSSRTL SFAGISYAASYLGYLQGGDKGAKTMATAAANIA 119
CC1G_05430 PG--PGIVGQLITQIQNQSSQT---VSTDSVDYPATLENYNESS-AGTAALKTHLTNQA 97
. . : : : . : * . * . : . . . * : : : .
    
```

Serine active site

```

CC1G_09668 SRCPNAKIFISGYSGAQVT-----HLAARQLSAADQARVTGVVTFGDP---- 146
CC1G_03922 SRCPNAKIFISGYSGAQVT-----HLAARQLSAANQARVTGVVTFGDP---- 146
CC1G_11503 ACPDARIKIFISGYSGAQVT-----HLAARQLSAADQARVTGVITFGDP---- 146
CC1G_07482 RQCSNAKIFMSGYSGAQVT-----HLAARQLSDELDLDRVTGVVTFGDP---- 147
CC1G_09365 KSCPNAKIFLSGYSGAQVV-----HLAAAQLASSVQSRINGVITFGDP---- 163
CC1G_05430 NRCPNQKIVLIGYSQGAHIIIGDTLAGGGGGLLGTTRTPAIDSSIANRVVAVAKFGDPRHV 157
* . . * . : * * * * * : : : * : * . * * * *
    
```

Aspartaatit ja Histidiini-aktiivinen kohta

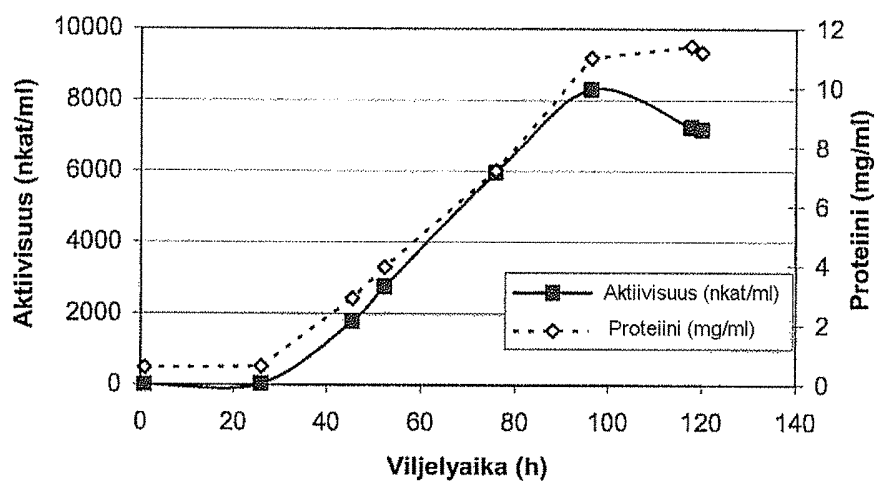
```

CC1G_09668 -----YRDDALPG-----GLQSRRTYQNVGDLTLAGLPTLLAPHTYGS DTP 189
CC1G_03922 -----YRDDALPG-----GLDSRRRTYQNFGLIADGLPTLLAPHTYGS DTS 189
CC1G_11503 -----NRDRALPG-----GLENRRRTYQNAGDLTLAGRSTLLPPLTYGS DAT 189
CC1G_07482 -----YKDTALPG-----TLEQRRRTYQNRNGDLTGERVHLPLPPEFYHND AE 190
CC1G_09365 -----YVKRALPG-----AMENRRRTYQNDGDKTGEGLPLVTPDFMNYKSS WD 206
CC1G_05430 GKSYNEGTARRDGMFPRGLTQDYSLTFRFRVKSWEQDFNGLFASGLST-IVELTYLERYQN 217
. : * : * * * * * : * * * * *
    
```

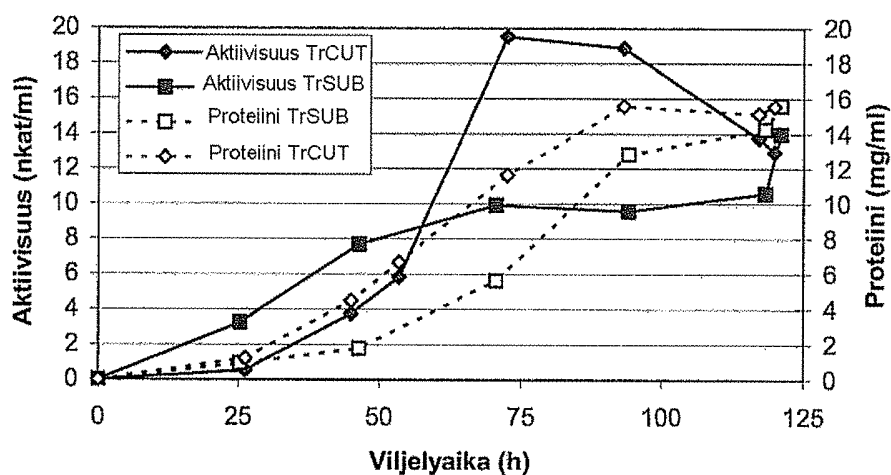
```

CC1G_09668 DAARWIAARV-- 199
CC1G_03922 DAARWVAARV-- 199
CC1G_11503 EAASFIAGRV-- 199
CC1G_07482 EAARWVADRV-- 200
CC1G_09365 PAARWVAFRV-- 216
CC1G_05430 DAARFVLDKIGG 229
* * : : :
    
```

Kuvio 2



Kuvio 3



Kuvio 4

