



(12) **PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT**



FI 000118010B

**SUOMI - FINLAND
(FI)**

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN**

(10) **FI 118010 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

31.05.2007

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

**C12N 9/24 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
D21C 9/10 (2006.01)**

(21) Patentihakemus - Patentansökning

953639

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

31.07.1995

(24) Alkupaivä - Löpdag

31.07.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

30.01.1996

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

29.07.1994 US 282001 P
06.06.1995 US 468812 P

31.10.1994 US 332412 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •AB Enzymes GmbH, Feldbergstrasse 78, 64293 Darmstadt, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

**1 •Vehmaanperä, Jarl, Lepsämäntie 359, 01800 Nummijärvi, SUOMI - FINLAND, (FI)
2 •Mäntylä, Arja Aino, Aino Acktén tie 10 A 2, 00400 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)
3 •Fagerström, Richard, Kielotie 18 A, 02260 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)
4 •Lantto, Raija, Jokitie 1, 01800 Klaukkala, SUOMI - FINLAND, (FI)
5 •Paloheimo, Marja, Riekkopolku 5, 01450 Vantaa, SUOMI - FINLAND, (FI)
6 •Suominen, Pirkko, 7801 Kingsview Lane, Maple Grove, MN 55311, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 •Lahtinen, Tarja, Laajaniityntie 12 E 63, 01620 Vantaa, SUOMI - FINLAND, (FI)
8 •Kristo, Paula, Jyrkäntie 3, 02360 Espoo, SUOMI - FINLAND, (FI)**

(74) Asiamies - Ombud: Borenus & Co Oy Ab
Tallberginkatu 2 A, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Actinomaduran ksylanaasisekvenssit ja käyttömenetelmät
Actinomaduras xylanassekvenser och förfaranden för dess användning**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: DSM9322 DSM, DSM9447 DSM, DSM9448 DSM, DSM9899 DSM
DSM9900 DSM, DSM9901 DSM, DSM9902 DSM, DSM9903 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI 964283 A, EP 0473545 A2, US 5298405 A,
Holtz et al. "Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes", *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 59, nro 1, p. 1-8, 1991, Ethier et al., Cloning of two xylanase genes from the newly isolated actinomycete *Actinomadura* sp. strain FC7 and characterization of the gene products, *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 40, nro 5 (toukokuu), p. 362-368, 1994, Harpin et al., A processed xylanase from the thermophilic *Actinomadura* sp. FC7 is overproduced in *Streptomyces lividans* from a cloned truncated gene. NCBI Nucleotide Accession: U08894. *Actinomadura* sp. FC7 xylanase II gene, partial cds. 4.5.1994. Ghangas et al. "Cloning of a Thermomonospora fusca xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*". *Journal of Bacteriology* 171 (6), 1989, p. 2963-2969. Irwing et al. "Characterization and sequence of a Thermomonospora fusca xylanase". NCBI Nucleotide, Accession: U01242; version G1:402357; 21.9.1993. Viikari et al. "Xylanases in bleaching: From idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews* 13, maaliskuu 1994, p. 335-350.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee *Actinomadura* spp.:n ksylanaasien eristystä ja kloonausta. Näiden ksylanaasien molekyylipainot ovat 35 kDa ja 50 kDa. Ne ovat termostabiileja ja siten edullisia käyttää puumassan bioteknisessä.

Uppfinningen avser isolering och kloning av xylanaser från *Actinomadura* spp. Molekylvikterna för dessa xylanaser är 35 kDa och 50 kDa. De är termostabila och sålunda förmånliga att använda vid bioblekning av pappersmassa.

Actinomaduran ksylanaasisekvenssit ja käyttömenetelmät
Actinomaduras xylanassekvenser och förfaranden för dess
användning

Keksinnön ala on termostabiilit entsyymit ja niiden käyttö. Erityisesti keksinnön ala on korkeassa lämpötilassa aktiiviset ksylanaasit. Keksinnön mukaiset koostumukset ovat käyttökelpoisia kasvibiomassan ominaisuuksien muuntamiseen, erityisesti ligniinipitoisuuden vähentämiseen. Keksintö kohdistuu myös entsyymivalkaisumenetelmään, jossa käytetään keksinnön mukaisia entsyymikoostumuksia.

Sulfaattimassan valkaisuun tarkoituksena on poistaa massasta keiton jälkeen massassa jäljellä oleva jäännösligniini. Tämä on perinteisesti tehty käyttämällä klooria sisältäviä kemikaaleja. Huoli ympäristöstä ja kuluttajien vaatimukset ovat herättäneet tarpeen kehittää vaihtoehtoisia valkaisu-tekniikoita.

Ensimmäinen biotekninen lähestymistapa tähän ongelmaan oli käydä käsiksi ligniiniin, suoraan ligniiniä hajottavilla entsyymeillä. Entsyymattisen ligniininhajotuksen kemia näyttää kuitenkin olevan hyvin monimutkaista ja vaikeata säädellä.

Ligniiniä voidaan hajottaa, käyttämällä ligninaaseja tuottavaa mikro-organismia sellaisenaan. Käsittelyajat ovat kuitenkin suhteellisen pitkiä. Käsittelyajat voivat olla esimerkiksi päiviä, ja mikro-organismit tarvitsevat lisäravinteita toimia-akseen. Myös muiden, ei-toivottujen mikrobien kontrollointi voi olla vaikeaa. Ligniinihajotuksen käyttö eristetyillä ligninaaseilla tai mikro-organismeilla on runsaan tutkimuksen kohteena. (Katso esimerkiksi Farrell, R.L., et al., *Lignocellulosics*, 305-315 (1992); Jurasek, L., *Lignocellulosics*, 317-325 (1992)).

Puumassa sisältää selluloosan ja ligniinin lisäksi hemiselluloosaa. Toinen lähestymistapa on käydä käsiksi hemiselluloosaan - puun kolmanteen pääaineosaan. Luontaisessa lehtipuussa hemiselluloosa on pääasiassa ksylaania, kun taas havupuussa

hemiselluloosa on pääosin glukomannaaneja ja jonkin verran ksylaania. Massan keiton aikana osa ksylaanista liukenee keittoliemeen. Keittoajan loppuvaiheessa alkalikonsentraation pienentyessä osa liuenneesta ja muuntuneesta ksylaanista saostuu uudelleen takaisin selluloosakuiduksi.

Vuonna 1986 havaittiin, että valkaisu- ja sulfaattimassan esikäsitteily ksylanaasilla johtaa vähentyneeseen kemikaalien tarpeeseen valkaisu- ja sulfaattimassassa (Viikari, L., et al., Proceedings of the 3rd Int. Conf. on Biotechnology in the Pulp Paper Ind., Tukholma (1986), s. 67-69). Sulfaattimassan ksylanaasiesikäsitteily hydrolysoi osittain sulfaattimassassa olevaa ksylaania. Tämä tekee massan rakenteesta huokoisempaa ja mahdollistaa tehokkaamman ligniinifragmenttien poiston myöhemmissä valkaisu- ja uuttovaiheissa. Useissa laboratorioissa selostettiin myöhemmin ksylanaasiesikäsitteilyyn olevan hyödyllinen yhdessä sellaisten peräkkäisten valkaisu- ja sulfaattimassojen kanssa, jotka koostuvat aineista Cl_2 , ClO_2 , H_2O_2 , O_2 ja O_3 . Katso katsaukset artikkeleissa Viikari, L., et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 13: (1994, painossa); Viikari, L., et al., teoksessa: Saddler, J.N., toim., *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*, C-A-B International (1993), s. 131-182; Grant, R., *Pulp and Paper Int.* (Syyskuu 1993), s. 56-57; Senior & Hamilton, J. *Pulp & Paper*: 111-114 (syyskuu 1992); Bajpai & Bajpai, *Process Biochem.* 27: 319-325 (1992); Onysko, A., *Biotech. Adv.* 11: 179-198 (1993); ja Viikari, L., et al., *J. Paper and Timber* 73: 384-389 (1991).

Tällaisen ksylanaasiesikäsitteilyyn jälkeen massan paremman valkaisu- ja sulfaattimassan suorana seurauksena on myöhempien valkaisu- ja sulfaattimassojen kulutuksen väheneminen, mikä kloridia sisältäviä kemikaaleja käytettäessä johtaa ympäristön kannalta ei-toivottujen orgaanisten klooriyhdisteiden vähentyneeseen muodostumiseen. Ksylanaasiesikäsitteilyyn jälkeen massan paremman valkaisu- ja sulfaattimassan suorana seurauksena on myös mahdollisuus valmistaa tuote, jolla on sellainen lopullinen valkoisuusaste, mikä valkoisuusaste muutoin olisi vaikea aikaansaada (kuten esimerkiksi kokonaan kloorivapaassa (TCF) peroksidi valkaisu- ja sulfaattimassassa). Ksylanaasiesikäsitteily-

min substraattispesifisyyden vuoksi selluloosakuidut eivät vahingoitu, ja tuotteen lujuusominaisuudet ovat reilusti hyväksyttävien rajojen sisäpuolella.

Asia ei kuitenkaan ole niin yksinkertainen kuin pelkästään ksylanaasikäsittelyvaiheen lisääminen. Useimmat massanvalkaisuun suunnitellut kaupalliset ksylanaasit eivät ole erityisen lämmönkestäviä, erityisesti käytettäessä neutraaleja tai emäksisiä pH-olosuhteita. Käytännössä ksylanaasit ovat tavallisesti tehottomia tai inaktiivisia lämpötiloissa, jotka ovat korkeampia kuin 60 °C.

Ksylanaasien kloonaus on selostettu *Actinomadura* sp. FC7:stä (Ethier, J.-F. et al., teoksessa: *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*, R. Baltz, et al., toim. (Proc. 5th ASM Conf. Gen. Mol. Biol. Indust. Microorg., 11-15. lokakuuta, 1992, Bloomington, Indiana, posterit C25); bakteereista (esim. Ghangas, G.S., et al., *J. Bacteriol.* 171: 2963-2969 (1989); Lin, L.-L., Thomson, J.A., *Mol. Gen. Genet.* 228: 55-61 (1991); Shareck, F., et al., *Gene* 107: 75-82 (1991); Scheirlinck, T., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 534-541 (1990); Whitehead, T.R., Lee, D.A., *Curr. Microbiol.* 23: 15-19 (1991); ja sienistä (Boucher, F. et al., *Nucleic Acids Res.* 16: 9874 (1988); Ito, K. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 906-912 (1992); Maat, J. et al., teoksessa Visser, J. et al., toim., *Xylans and Xylanases* (Elsevier Science, Amsterdam), s. 349-360 (1992); van den Broeck, H. et al., EP 463,706 A1 (1992), WO 93/25671 ja WO 93/25693). Eräät tutkijat ovat ehdottaneet, että entinen suku *Actinomadura* tulisi jakaa kahteen sukuun, *Actinomadura* ja *Microtetraspora*, joista jälkimmäinen sisältää esim. entisen *A. flexuosan* (Kroppenstedt, et al., *System. Appl. Microbiol.* 13: 148-160 (1990)).

Thermomonospora fusca-lajin tiedetään tuottavan termostabiileja ja alkalistabiileja ksylanaaseja (EP 473,545, Sandoz). Hemiselluloosaa hydrolysoivien entsyymien käyttö eri valkaisu-järjestelmissä kuvataan patenteissa WO 89/08738, EP 383,999, WO 91/02791, EP 395,792, EP 386,888, EP 473,545, EP 489,104 ja

WO 91/05908. Hemiselluloolyyttisten entsyymien käyttö parannettuun vedenpoistoon mekaanisesta massasta kuvataan patenteissa EP 262,040, EP 334,739 ja EP 351,655 sekä DE 4,000,558. Biomassan hydrolyysissä nestemäisiksi polttoaineiksi tai kemikaaleiksi on korkean saannon saamiseksi olennaista muuntaa sekä selluloosa että hemiselluloosa (Viikari et al., "Hemicellulases for Industrial Applications," teoksessa: *Bioconversion of Forest and Agricultural Wastes*, Saddler, J., toim., CAB International, USA (1993)). Myös rehuteollisuudessa esiintyy tarvetta käyttää sopivia entsyymiaktiivisuuksien yhdistelmiä runsaasti β -glukaania ja hemiselluloosaa sisältävän substraatin hajottamiseen.

Emäksisessä pH:ssa aktiivinen ksylanaasi vähentäisi massan happamaksi tekemisen tarvetta ennen ksylanaasikäsittelyä. Lisäksi monien nykyaikaisten massan keitto- ja valkaisuprosessien lämpötilat ovat suhteellisen korkeita, paljon korkeammat kuin 50 °C, mikä on sopiva lämpötila monille kaupallisille valkaisuentsyymeille. Näin ollen tarvitaan sellaisia puumassan valkaisuprosesseihin sopivia termostabiileja ksylanaasivalmisteita, jotka ovat stabiileja emäksisissä pH-arvoissa.

Kuvassa 1 esitetään pH:n vaikutus *A. flexuosan* (DSM43186) ksylanaasiaktiivisuuteen (viljelysupernatantti).

Kuvissa 2, 2A ja 2B esitetään lämpötilan vaikutus *A. flexuosan* (DSM43186) ksylanaasiaktiivisuuteen (viljelyssä saatu supernatantti). Jokaisessa kuvassa neljä pylvästä kussakin ajankohdassa tarkoittavat vastaavasti vasemmalta oikealle pH-arvoja pH 7, pH 8, pH 9 ja pH 9,5.

Kuvassa 3 esitetään *A. flexuosan* (DSM43186) ksylanaasien DEAE Sepharose CL-6B-kromatografian eluutiokäyrä.

Kuvassa 4 esitetään kuvan 3 DEAE:n pooli I:n Phenyl Sepharose CL-4B-kromatografian eluutiokäyrä. Osoitetaan fraktiot, jotka yhdistettiin näytteen DEPS I/1 saamiseksi.

Kuvassa 4A esitetään kuvan 3 DEAE:n pooli II:n Phenyl Sepharose CL-4B-kromatografian eluutiokäyrä. Esitetään fraktiot, jotka yhdistettiin näytteiden DEPS II/1 ja DEPS II/2 saamiseksi.

Kuvassa 4B esitetään kuvan 3 DEAE:n pooli III:n Phenyl Sepharose CL-4B-kromatografian eluutiokäyrä. Esitetään fraktiot, jotka yhdistettiin näytteiden DEPS III/1 ja DEPS III/2 saamiseksi.

Kuvassa 5 esitetään eri kromatografiapoolien Coomassie Brilliant Blue-proteiinivärjäyskuvio. Kaksi vasemmanpuoleisinta kaistaa: molekyylipainomarkkerit; kaista 1: kasvualusta; kaista 2: DEPS (pooli I/1); kaistat 3 ja 4: DEPS (poolit II/1 ja vastaavasti II/2); kaista 5: tyhjä; kaistat 6 ja 7: DEPS (poolit III/1 ja vastaavasti III/2); kaista 8: tyhjä. DEPS: kuvassa 3 esitetyn DEAE-kromatografian jälkeen saadut fraktiot ja kuvassa 4 esitetyn Phenyl Sepharose-kromatografian jälkeen saadut fraktiot.

Kuvassa 5A esitetään kuvassa 5 värjättyjen eri kromatografiapoolien Western blot-analyysi. Toteamiseen käytettiin *T. fuscum* TfxA-ksylanaasia vastaan muodostettua polyklonaalista antiseerumia. Vasemmanpuoleisin kaista: molekyylipainomarkkerit; kaista 1: kasvualusta (medium); kaista 2: DEPS (pooli I/1); kaistat 3 ja 4: DEPS (poolit II/1 ja vastaavasti II/2); kaista 5: tyhjä; kaistat 6 ja 7: DEPS (poolit III/1 ja vastaavasti III/2); kaista 8: tyhjä. DEPS: kuvassa 3 esitetyn DEAE-kromatografian jälkeen saadut fraktiot ja kuvassa 4 esitetyn Phenyl Sepharose-kromatografian jälkeen saadut fraktiot.

Kuvassa 6 esitetään DEAE-läpivirtausmenetelmän läpäisseen permeaatin Phenyl Sepharose FF-kromatografian eluutiokäyrää. Osoitetaan putket, jotka yhdistettiin näytteiden PF1 ja PF2 saamiseksi.

Kuvassa 6A esitetään DEAE-läpivirtausmenetelmässä saadun konsentraatin Phenyl Sepharose FF-kromatografian eluutiokäyrää.

Osoitetaan putket, jotka yhdistettiin näytteiden KF1, KF2 ja KF3 saamiseksi.

Kuvassa 7 esitetään eri kromatografiapoolien Coomassie Blue-proteiinivärjäyskuvio. Lyhenteet ovat kuten kuvissa 6 ja 6A. Vasemmanpuolimmaisat ja oikeanpuolimmaisat kaistat: molekyyli-painomarkkerit; kaista 1: kasvualusta (medium); kaista 2: PF1; kaista 3: PF2; kaista 4: KF1; kaista 5: KF2; kaista 6: KF3.

Kuvassa 7A esitetään kuvassa 7 proteiinivärjättyjen eri kromatografiapoolien Western blot-analyysi. Toteamiseen käytettiin *T. fusca*n TfxA-ksylanaasia vastaan muodostettua polyklonaalista antiseerumia. Lyhenteet ovat kuten kuvissa 6 ja 6A. Vasemmanpuolimmaisat ja oikeanpuolimmaisat kaistat: molekyyli-painomarkkerit; kaista 1: kasvualusta (medium); kaista 2: PF1; kaista 3: PF2; kaista 4: KF1; kaista 5: KF2; kaista 6: KF3.

Kuvassa 8 esitetään BSA:n vaikutus 35 kDa:n ksylanaasin termostabiilisuuteen. Umpinaiset neliöt: ei BSA:ta; avoimet neliöt: BSA:n kanssa.

Kuvassa 9 esitetään BSA:n vaikutus 50 kDa:n ksylanaasin termostabiilisuuteen. Umpinaiset neliöt: ei BSA:ta; avoimet neliöt: BSA:n kanssa.

Kuva 10 koostuu kuvista 10A-10C.

Kuvassa 10A esitetään pH:n vaikutus 35 kDa:n ksylanaasin aktiivisuuteen 80 °C:ssa.

Kuvassa 10B esitetään pH:n vaikutus 50 kDa:n ksylanaasin aktiivisuuteen 60 °C:ssa, (umpinaiset neliöt), 70 °C:ssa (avoimet neliöt) ja 80 °C:ssa (umpinaiset ympyrät).

Kuvassa 10C esitetään pH:n vaikutus 35 kDa:n ksylanaasin (umpinaiset neliöt) ja 50 kDa:n ksylanaasin (avoimet neliöt) aktiivisuuteen 60 °C:ssa 60 minuutin inkubaatioilla.

Kuvassa 11 esitetään lämpötilan vaikutus 35 kDa:n ksylanaasin (umpinaiset neliöt) ja 50 kDa:n ksylanaasin (avoimet neliöt) aktiivisuuteen pH-arvossa 7 60 minuutin inkubaatioilla.

Kuvassa 12 esitetään plasmidin pALK185 (4470 bp) kartta.

Kuvassa 13 esitetään *Actinomadura* sp. DSM43186:n 35 kDa:n ksylanaasin 1375 emäsparin DNA-sekvenssi ja aminohapposekvenssi.

Kuvassa 14 esitetään *Actinomadura* sp. DSM43186:n 50 kDa:n ksylanaasin 1864 emäsparin DNA-sekvenssi ja aminohapposekvenssi.

Kuvassa 15 esitetään homologiavertailu aminohappotasolla 1864 emäparin insertistä johdetun AM50-peptidin ja *Actinomadura* sp. FC7:n ksylanaasi II:n (talletusnumero U08894) geenin välillä. Kuva esittää sen, että 434 päällekkäisellä aminohapolla oli 70,7 %:n identtisyys.

Kuvassa 15A esitetään homologiavertailu aminohappotasolla 1864 emäsparin insertistä johdetun AM50-peptidin ja *Streptomyces lividansin* ksylanaasi A:n (xlnA) geenin (talletusnumero M64551) välillä. Kuva esittää sen, että 489 päällekkäisellä aminohapolla oli 70,3 %:n identtisyys.

Plasmidit pALK923, pALK938, pALK939, pALK940, pALK941 ja pALK1056 talletettiin talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Saksa ja niille annettiin vastaavasti talletusnumerot DSM 9322, DSM 9899, DSM 9900, DSM 9901, DSM 9902 ja DSM 9903. pALK 923 talletettiin 29. heinäkuuta, 1994, ja pALK 938-941 sekä pALK1056 talletettiin 3. huhtikuuta, 1995.

Plasmidit pALK927 ja pALK928 (jotka antoivat positiivisen signaalin *S. lividans* xlnA-oligomeerikoettimen kanssa ja sisälsivät *Actinomaduran* 50 kDa:n ksylanaasin geenin) talletettiin

DSM:ssä 27. syyskuuta, 1994, ja niille annettiin talletusnumerot DSM 9447 ja vastaavasti DSM 9448.

Seuraavassa kuvauksessa käytetään laajalti useita yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettyjä termejä. Seuraavat määritelmät annetaan selityksen ja patenttivaatimusten ymmärtämisen selventämiseksi ja johdonmukaistamiseksi, mukaan lukien ne puitteet, joissa termiä käytetään.

Ksylanaasi. Tässä käytettynä ksylanaasi on hemisellulaasi, joka pilkkoo ksylaenin ksyloosiketjussa olevia β -1,4-sidoksia (ksylaani on toisiinsa β -1,4-sidoksin liittyneiden D-ksyloositähteiden polymeeri). Ksylanaasiaktiivisuus tarkoittaa samaa kuin ksylanolyttinen aktiivisuus.

Aminohapposekvenssillä, joka on spesifisen aminohapposekvenssin "ekvivalentti", tarkoitetaan aminohapposekvenssiä, joka ei ole identtinen spesifisen aminohapposekvenssin kanssa, mutta joka pikemminkin sisältää ainakin joitakin aminohappomuutoksia (deleetioita, substituutioita, inversioita, insertioita, ym.), jotka eivät olennaisesti vaikuta proteiinin biologiseen aktiivisuuteen verrattuna spesifisen aminohapposekvenssin vastaavaan aktiivisuuteen kun aminohapposekvenssiä käytetään haluttuun tarkoitukseen. "Ekvivalentti" aminohapposekvenssi on edullisesti vähintään 85-99 %:sesti homologinen aminohappotasolla spesifiseen aminohapposekvenssiin nähden, edullisimmin vähintään 90 %:sesti ja erityisen edullisessa suoritustavassa vähintään 95 %:sesti homologinen aminohappotasolla.

Keksinnön mukaisen ksylanaasin aminohapposekvenssin "biologisella" aktiivisuudella tarkoitetaan sellaisen aminohapposekvenssin entsyymaattista, funktionaalista (kuten esimerkiksi erityssignaalia tai spesifisen domeenin sekvenssiä) tai immunologista aktiivisuutta.

Isännällä, joka on "olennaisilta osiltaan kykenemätön" syntetisoimaan yhtä tai useampaa entsyymiä, tarkoitetaan isäntää, jossa yhden tai useamman luetellun entsyymin aktiivisuus on

heikentynyt, vajavainen tai puuttuva villityyppiin verrattuna.

Entsyymivalmiste. "Entsyymivalmisteella" tarkoitetaan koostumusta, joka sisältää entsyymejä, jotka on uutettu (joko osittain tai kokonaan puhdistettu) mikrobista tai sellaisen mikrobin kasvatukseen käytetystä kasvualustasta. "Uutettu" tarkoittaa mitä tahansa menetelmää, jolla halutut entsyymit erotetaan solumassasta, ja siihen sisältyy solujen rikkominen ja myös pelkästään käytettyjen solujen poistamista kasvualustasta. Tämän vuoksi termi "entsyymivalmiste" käsittää koostumukset, jotka sisältävät kasvualustaa, jota on ensin käytetty halut(tu)je(n) mikrobi(e)n viljelyyn ja mitä tahansa entsyymejä, joita mikrobi(t) ovat erittäneet kyseiseen kasvualustaan viljelyn aikana.

Biovalkaisu. "Biovalkaisulla" tarkoitetaan ligniinin uutamista selluloosamassasta sen jälkeen, kun hemiselluloosaa hajottavat entsyymit ovat vaikuttaneet ligniiniä hajottavien entsyymien kanssa tai ilman niitä. Hemiselluloosat voivat rajoittaa ligniinin poistamista joko fysikaalisesti (saostamalla uudelleen kuidun pintaan keiton aikana) tai kemiallisesti (ligniini-hiilihydraattikomplekseilla). Hemisellulaasiaktiivisuus hajottaa osittain hemiselluloosaa, mikä voimistaa ligniinien uutettavuutta tavanomaisilla valkaisukemikaaleilla (kuten kloorilla, klooridioksidilla, peroksidilla, jne.) (Viikari et al., "Bleaching with Enzymes" teoksessa *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, Proc. 3rd Int. Conf., Tukholma, s.67-69 (1986); Viikari et al., "Applications of Enzymes in Bleaching" teoksessa *Proc. 4th Int. Symp. Wood and Pulping Chemistry*, Pariisi, Vol.1, s.151-154 (1987); Kantelinen et al., "Hemicellulases and their Potential Role in Bleaching" teoksessa *International Pulp Bleaching Conference, Tappi Proceedings*, s. 1-9 (1988)). Tämän parantuneen valkaistavuuden etuna on alempi valkaisukemikaalien kulutus ja pienempi ympäristökuormitus tai paremmat lopulliset valkoisuusarvot.

Homologinen. Entsyymillä, joka on "homologinen" keksinnön mukaisen isännän suhteen, tarkoitetaan sitä, että isäntälajina

olevan saman lajin transformoimaton kanta luontaisesti tuottaa jonkin verran natiivia proteiinia; keksinnön mukaisen isännän suhteen "homologisella" geenillä tarkoitetaan geeniä, jota esiintyy isäntälajina olevan saman lajin transformoimattoman kannan genomissa. Entsyymillä, joka on "heterologinen" keksinnön mukaisen isännän suhteen, tarkoitetaan sitä, että isäntälajina olevan saman lajin transformoimaton kanta ei luontaisesti tuota natiivia proteiinia; keksinnön mukaisen isännän suhteen "heterologisella" geenillä tarkoitetaan geeniä, jota ei esiinny isäntälajina olevan saman lajin transformoimattoman kannan genomissa.

Kloonausväline. Plasmidi- tai faagi-DNA tai muu DNA- sekvenssi (kuten esimerkiksi lineaarinen DNA), joka tarjoaa sopivan nukleinihappoympäristön halutun geenin siirtämiseksi isäntäsolun sisälle. Keksinnön mukaiset kloonausvälineet voidaan suunnitella replikoitumaan itsenäisesti prokaryootti- ja eukaryootti-isännissä. Sieni-isännissä, kuten *Trichoderma*, kloonausvälineet eivät tavallisesti replikoidu itsenäisesti, vaan sen sijaan ne tarjoavat ainoastaan välineen halutun geenin siirtämiseksi *Trichoderma*-isäntään josta se insertoituu *Trichoderman* genomiin. Kloonausvälineelle voidaan lisäksi karakterisoida yhdellä tai muutamalla endonukleaasin tunnistuskohdalla, jossa sellaiset DNA-sekvenssit voidaan pilkkoa määritettävällä tavalla ilman että väline menettää olennaisen biologisen funktionsa, ja johon DNA:ta voidaan liittää mainitun DNA:n replikaation ja kloonauksen aikaansaamiseksi. Kloonausväline voi lisäksi sisältää markkerin, joka sopii käytettäväksi kloonausvälineellä transformoitujen solujen tunnistamiseksi. Markkerit ovat esimerkiksi antibioottiresistenssi. Vaihtoehtoisesti sellaiset markkerit voidaan siirtää kloonausvälineellä, joka on eri kuin se, joka siirtää halutun geenin. Sanaa "vektori" käytetään joskus "kloonausvälineen" asemesta.

Ilmentymisväline. Väline tai vektori, joka on samanlainen kuin kloonausväline, mutta joka pystyy ilmentämään halutun geenin haluttuun isäntään transformoinnin jälkeen.

Sieni-isäntää käytettäessä haluttu geeni siirretään edullisesti sieni-isännälle osana kloonauk- tai ilmentymisvälinettä, joka integroituu sienien kromosomeihin. Kloonaukswälineestä tai ilmentymisvälineestä peräisin olevat sekvenssit voidaan myös integroida halutun geenin kanssa integraatioprosessin aikana. Esimerkiksi *T. reesei*ssä haluttu geeni voidaan ohjata *cbh1*-lokukseen.

Haluttu geeni voidaan edullisesti asettaa vektorissa (joka integroituu halutun geenin kanssa) tarjoamien tiettyjen säätelysekvenssien, kuten esimerkiksi promoottorisekvenssien, säätelyn alaisuuteen (so. kytketään niihin toiminnallisesti). Haluttaessa isännän kromosomi voi tarjota sellaiset säätelysekvenssit insertiolokuksessaan.

Ilmentymisvektorilla olevat ilmentymisen säätelysekvenssit vaihtelevat riippuen siitä, onko vektori suunniteltu ilmentämään tietyn geenin prokaryootti- tai eukaryootti-isännässä (esimerkiksi sukkulavektori voi toimia bakteeri-isännässä, ja se voi lisäksi sisältää transkriptioon liittyviä osasia, kuten vahvistajaosasia, terminaatiosekvenssejä ja/tai translaation initiaatio- ja terminaatiokohtia.

I. *Actinomadura flexuosan* ksylanaasien tunnistaminen ja eristäminen

Actinomadura flexuosasta on tunnistettu, puhdistettu ja kloonattu kaksi ksylanaasia. Molemmilla näistä ksylanaaseista on sellainen pH-optimi ja termostabiilisuus, joka on haluttu puumassan entsyymivalkaisussa. Näistä ksylanaaseista toisen molekyylipaino on noin 35 kDa (AM35) ja toisen molekyylipaino on noin 50 kDa (AM50).

Optimilämpötila-alue *Actinomadura flexuosan* ksylanaaseille on puhdistamattomissa valmisteissa 70-80 °C pH-arvossa 6-7. Tämän ksylanaasivalmisteen optimilämpötila-alue pH-arvossa 8 on 60-70 °C. Sulfaattimassan valkaisussa tämä on hyödyllistä, koska sellun keiton jälkeen massan pH on emäksinen.

Puhdistetuissa valmisteissa AM35 säilyttää 80 % aktiivisuudestaan ja AM50 säilyttää 90 % aktiivisuudestaan 24 tunnin jälkeen inkuboitessa BSA:n läsnäollessa. Lämpötilassa 80 °C sekä AM35 että AM50 ovat aktiivisimmillaan pH-arvossa 6, mutta molemmilla on pH 5:n ja pH 7:n välillä laaja aktiivisuustasanne, jossa noin 80 % aktiivisuudesta on säilynyt.

AM35 ja AM50 voidaan eristää preparaattista, joka on saatavissa *Actinomadura flexuosa*-isännästä, jonka talletusnumero on DSM-43186 ja joka on saatavissa talletuslaitoksesta Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Saksa. Molemmat ksylanaasimuodot voidaan puhdistaa ajamalla ne kromatografiapylvässarjojen läpi. Ensimmäinen puhdistusvaihe DEAE Sepharose CL-4B:llä pidättää noin puolet ksylanaasiaktiivisuudesta silloin, kun näyte lisätään pH-alueella 8,6-9 12,5 mM Na₂HPO₄:ssä; toinen puoli havaitaan läpivirtausnesteessä.

Sitoutuneen ksylanaasiaktiivisuuden eluointi suolagradienilla antaa terävän, ensin eluoituvan aktiivisuuspiikin ja leveän, myöhemmin eluoituvan aktiivisuuspiikin. Terävä, aikaisemmin eluoituva piikki säilyttää homogeenisuutensa, kun sille tehdään Phenyl Sepharose CL-4B-kromatografia. Myöhemmästä, leveästä aktiivisuuspiikistä otetut näytteet erottuvat vähintään kahdeksi piikiksi, kun niille tehdään Phenyl Sepharose CL-4B-kromatografia. Nämä myöhemmin eluoituvat ksylanaasit risti-reagoivat vain heikosti *Thermomonospora fusca* ksylanaasia vastaan valmistetun polyklonaalisen vasta-aineen kanssa.

SDS-PAGE:lla määritettynä DEAE-pidätyksestä saaduissa pooleissa ksylanaasin molekyylipaino oli noin 50 kDa, kun taas DEAE-läpivirtauksessa ksylanaasien molekyylipainot olivat 30, 35, 40 ja 50 kDa. *Actinomadura flexuosa* sisältää näin ollen kolme tai neljä ksylanaasiproteiiniväyhykettä.

II. Ksylanaasin biovalkaisu käyttäen *Actinomadura flexuosa* ksylanaaseja

Keksintö koskee menetelmää kasvibiomassan kemialliseksi käsittelemiseksi tunnin ajan olosuhteissa, joissa on korkea, 50-80 °C:n lämpötila ja pH 5-8, erityisesti 60-70 °C:n lämpötila ja pH 6-7, edullisimmin 60 °C:n lämpötila ja pH 6,5. Edullisessa suoritustavassa kasvibiomassa biovalkaistaan ksylanaaseilla, jotka pystyvät hydrolysoimaan ksylaaniketjua puumassassa neutraalissa tai kohtalaisen emäksisessä pH:ssa ja korkeassa lämpötilassa (60 °C).

Puumassa on yhdistelmäateriaali, joka koostuu pääasiassa selluloosa-, hemiselluloosa- ja ligniinimatriisista. Tavallinen puumassan tuotantomenetelmä on kemiallinen massanvalmistus (pulping). Eräs tyypillinen kemiallisen massanvalmistuksen tapa on emäksinen sulfaattikeitto, niin kutsuttu sellunkeitto. Prosessiolosuhteissa (korkeat lämpötilat ja korkea emäksisyys) keittokemikaalit uuttavat ligniinin eroon massasta. Kaikki ligniini ei kuitenkaan poistu keiton aikana, vaan osa siitä (noin 5 %) jää massaan. Tämä jäännösligniini on poistettava, jotta massa saadaan paperintuotantoon sopivaksi.

Ligniinin poistamiseksi on kehitetty monia menetelmiä. Tyypillisesti puumassa käsitellään kloorilla tai muilla myrkyllisillä kemikaaleilla ligniiniosan poistamiseksi ja valkaistun massan saamiseksi. Kemikaalikäsittelyn myrkyllisillä sivutuotteilla on kuitenkin negatiivinen vaikutus sen ympäristön terveyteen ja stabiilisuuteen, johon ne vapautetaan. Näin ollen on suuri tarve kehittää vaihtoehtoisia, enemmän ympäristöä suojelevia tekniikoita massan valkaisun suorittamiseksi. Keitetyn massan käsittely entsyymeillä, jotka hajottavat massassa hemiselluloosakomponentin, esim. ksylaanin, muuntaa massaa niin, että ligniinin poistettavuus helpottuu. Tämä johtaa parantuneeseen valkaistavuuteen, mikä puolestaan on edullista, koska siitä seuraa alhaisempi valkaisukemikaalikulutus ja pienempi ympäristökuormitus ja/tai korkeampi lopullinen valkaisuaste.

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä kehitetään biovalkaisu-
sumenetelmä, jonka avulla voidaan käyttää termostabiileja ja
neutraaleja ksylanaaseja sellaisissa olosuhteissa, että tarve
säätää pH:ta ja lämpötilaa keittovaiheen jälkeen vähenee tai
eliminoituu. Keksinnön mukaiset prosessointiolosuhteet voivat
lisäksi vaikuttaa vähentämällä sellulaasiaktiivisuutta entsyy-
mivalmisteessa tai kasvualustassa.

Edullisessa suoritustavassa keksinnön mukainen menetelmä suo-
ritetaan puumassassa *in vitro*. Menetelmään kuuluu entsyymi-
valmisteen, kasvualustan tai ksylanaasia sisältävän konsentroi-
dun seoksen saattaminen kosketukseen puumassan kanssa. Rutiini-
laskutoimitukset tekevät alan asiantuntijoille mahdolliseksi
optimikäsittelyajan määrittämisen riippuen halutusta tulok-
sesta, käytetyn ksylanaasientsyymin konsentraatiosta ja spesi-
fisestä aktiivisuudesta, käytetyn massan tyypistä ja konsen-
traatiosta, happaman keittoliemen pH:sta ja lämpötilasta sekä
muista parametrimuuttujista.

Keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää yksin tai lisänä
muihin käsittelyihin, jotka vähentävät puumassan ligniinipitoi-
suutta, parantavat sen vedenpoistokykyä ja/tai alentavat sen
vedensitomiskykyä. Edullisessa suoritustavassa keksintöä käy-
tetään vahvistamaan puumassan valkoisuusominaisuuksia kemial-
listen massojen käsittelyllä, so. niiden massojen, jotka si-
sältävät kemiallisella käsittelyllä kemiallisesti muunnettua
ligniiniä.

Edullisessa suoritustavassa keksinnön mukaisissa menetelmissä
käytetyt ksylanaasit ovat edullisesti *Actinomadura flexuosa*
ksylanaaseja, ja erityisesti *Actinomadura flexuosa* 35 kDa:n
ja/tai 50 kDa:n ksylanaaseja. Erityisesti kasvualustat, jotka
sisältävät yhdistelmäisäntien kasvatuksen seurauksena
eritettyjä entsyymejä, ovat edullisia keksinnön mukaisissa
menetelmissä, joka yhdistelmäisäntä on saatu transformoimalla
Trichoderma reesei-isäntäsolu keksinnön mukaisia *Actinomadura*
flexuosa 35 kDa ja/tai 50 kDa ksylanaasia koodaavilla
geeneillä.

III. Keksinnön mukaisten isäntien geenimuokkaus

Menetelmää keksinnön mukaisten isäntien geneettiseksi muokkamiseksi mahdollistetaan kloonaamalla halutut ksylanaasiaktiivisuutta koodaavat geenisekvenssit ja ilmentämällä sellaiset geenisekvenssit. Tässä käytettynä termillä "geenisekvenssit" tarkoitetaan nukleiinihappomolekyylia (edullisesti DNA). Haluttua ksylanaasia koodaavat geenisekvenssit saadaan monista eri lähteistä. Näihin lähteisiin kuuluvat *Actinomadura flexuosa* genomien DNA, cDNA, synteettinen DNA ja näiden yhdistelmät. Vektorisysteemejä voidaan käyttää valmistamaan sellaisia isäntiä, jotka tuottavat keksinnön mukaisia entsyymivalmisteita. Vektorikonstruktioon (a) voidaan edelleen tehdä erillinen vektorikonstruktio (b) joka koodaa vähintään yhtä isännän genomiin integroitavaa haluttua geeniä ja (c) kohtiin (a) tai (b) liitetyn selektiomarkkerin. Vaihtoehtoisesti markkerina voidaan käyttää erillistä vektoria.

Nukleiinihappomolekyylin, kuten esimerkiksi DNA:n, sanotaan "pystyvän ilmentämään" polypeptidin, mikäli se sisältää transkription säätelyinformaation sisältävät ilmentymisen säätelysekvenssit ja sellaiset sekvenssit ovat "toiminnallisesti kytketyt" polypeptidiä koodaavaan nukleotidisekvenssiin.

Toiminnallinen sidos on sidos, jossa sekvenssi yhdistetään säätelysekvenssiin (tai sekvensseihin) sellaisella tavalla, joka saattaa sekvenssin ilmentämisen säätelysekvenssin vaikutuksen tai kontrollin alaiseksi. Kahden DNA-sekvenssin (kuten esimerkiksi proteiinia koodaavan sekvenssin ja promoottorialuesekvenssin, joka on liittynyt koodaavan sekvenssin 5'-päähen) sanotaan olevan toiminnallisesti kytketyt, jos promoottoritoiminnan induktio johtaa sekvenssin mRNA:n koodaaman proteiinin transkriptioon, ja jos kahden DNA-sekvenssin välisen sidoksen luonne ei (1) johda lukukehys-mutaation esiintuloon, (2) estä ilmentymisen säätelysekvenssien kykyä ohjata mRNA:n, antisense-RNA:n tai proteiinin ilmentymistä tai (3) estä templaatin kykyä tulla promoottorialuesekvenssin tran-

skriboimaksi. Promoottorialue olisi näin ollen toiminnallisesti kytketty DNA-sekvenssiin, jos promoottori pystyisi vaikuttamaan sen DNA-sekvenssin transkriptioon.

Geenin ilmentymiseen tarvittavien säätelyalueiden täsmällinen luonne voi vaihdella lajien tai solutyyppeiden välillä, mutta tavallisesti niihin sisältyy välttämättöminä 5'-ei-transkriboidut ja 5'-ei-transloidut (ei-koodaavat) sekvenssit, jotka osallistuvat transkription ja vastaavasti translaation aloitukseen.

Proteiinin ilmentäminen transformoiduissa isännissä vaatii sellaista säätelyalueiden käytön, jotka toimivat kyseisissä isännissä. Voidaan käyttää laajaa valikoimaa transkription ja translaation säätelysekvenssejä. Eukaryooteilla, joilla transkriptio ei ole liittynyt translaatioon, sellaiset säätelyalueet voivat joko tarjota, tai sitten eivät tarjoa, initiaattorimetioniini (AUG)-kodonin, riippuen siitä, sisältääkö kloonattu sekvenssi sellaisen metioniinin. Sellaisiin alueisiin kuuluu tavallisesti promoottorialue, joka on riittävä ohjaamaan RNA-synteesin aloitusta isäntäsolussa.

Kuten yleisesti tiedetään, eukaryootti-mRNA:n translaatio aloitetaan kodonilla, joka koodaa ensimmäisen metioniinin. Tästä syystä on edullista varmistaa, että eukaryoottipromoottorin ja DNA-sekvenssin, joka koodaa proteiinia tai sen funktionaalista johdannaista, välinen sidos ei sisällä yhtään välikodonia, joka pystyy koodaamaan metioniinia. Sellaisten kodonien esiintyminen johtaa joko fuusioproteiinin muodostumiseen (jos AUG-kodoni on samassa lukukehyksessä kuin proteiinia koodaava DNA-sekvenssi) tai lukukehys-mutaatioon (jos AUG-kodoni ei ole samassa lukukehyksessä kuin proteiinia koodaava sekvenssi).

Edullisessa suoritustavassa haluttu proteiini eritetään ympäröivään kasvualustaan erityksen signaalisekvenssin läsnäolon vuoksi. Jos halutulla proteiinilla ei ole omaa signaalisekvenssiä tai jos sellainen signaalisekvenssi ei toimi hyvin isän-

nässä, silloin proteiinin koodaava sekvenssi voidaan kytkeä toiminnallisesti isännän kanssa homologiseen tai heterologiseen signaalisekvenssiin. Haluttu koodaava alue voidaan kytkeä mihin tahansa signaalisekvenssiin, joka mahdollistaa proteiinin erityksen isännästä. Sellaiset signaalisekvenssit voidaan suunnitella joko spesifisten proteaasikohtien kanssa tai ilman niitä, niin että signaalipeptidisekvenssi on myöhemmin helposti irroitettava. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää isäntää, joka erittää proteiinin kasvualustaan, esimerkiksi sellaista isäntää, jolla on membraanissaan mutaatio.

Ei-transkriboidut ja/tai ei-transloidut alueet 3'-suuntaan proteiinia koodaavasta sekvenssistä voidaan haluttaessa saada edellä kuvatuilla kloonausmenetelmillä. 3'-Ei-transkriboitu alue voidaan säilyttää sen transkription terminaation säätelysekvenssiosasten takia; 3'-ei-transloitu alue voidaan säilyttää sen translaation terminaation säätelysekvenssiosasten takia, tai sellaisten osasten takia, jotka ohjaavat polyadenylaatiota eukaryoottisoluissa.

Keksinnön mukaiset vektorit voivat edelleen sisältää muita toiminnallisesti kytkeytyneitä säätelyosia, kuten esimerkiksi vahvistajasekvenssejä.

Edullisessa suoritustavassa konstruoidaan geneettisesti stabiilit transformantit, joilla halutun proteiinin DNA integroidaan isännän kromosomiin. Haluttua proteiinia koodaava sekvenssi voi olla peräisin *Actinomadura flexuosasta*. Sellainen integraatio voi tapahtua *de novo* solun sisällä tai, edullisimmassa suoritustavassa sitä voidaan avustaa transformoimalla sellaisella vektorilla, joka insertoi itsensä toiminnallisesti isännän kromosomiin, esimerkiksi DNA-osilla, jotka edistävät DNA-sekvenssien integraatiota kromosomeihin.

Solut, jotka ovat stabiilisesti integroineet kromosomeihinsa niihin siirretyn DNA:n, valikoidaan siirtämällä niihin myös yhden tai useamman markkerin, joka mahdollistaa sellaisten isäntäsolujen valikoimisen, jotka sisältävät ilmentymisvek-

torin kromosomissaan, markkeri voi esimerkiksi antaa biosidi-resistenssin, esimerkiksi resistenssin antibiooteille tai raskasmetalleille, kuten esimerkiksi kuparille, tai vastaavalle. Valikoitava markkerigeeni voidaan liittää joko suoraan ilmennettäviin DNA-geenisekvensseihin tai se voidaan siirtää samaan soluun kotransfektioilla.

Tärkeitä tekijöitä tiettyä plasmidi- tai virusvektoria valittaessa ovat: helppous, jolla vektorin sisältävät resipienttisolut voidaan tunnistaa ja valikoida niistä resipienttisoluista, jotka eivät sisällä vektoria; tietyssä isännässä haluttujen vektorin kopioiden lukumäärä; ja se, halutaanko vektorin pystyvän "sukkuloimaan" eri lajisten isäntäsolujen välillä.

Kun yhden tai useamman konstruktion sisältävä vektori tai DNA-sekvenssi valmistetaan ilmentämistä varten, DNA-konstruktio(t) siirretään sopivaan isäntäsoluun millä tahansa monista sopivista keinoista, mukaan lukien transformatio kuten edellä on kuvattu. Vektorin siirtämisen jälkeen resipienttisoluja kasvatetaan selektiivisellä kasvualustalla, joka valikoi transformoituneet solut kasvun perusteella. Kloona(t)u(je)n geenisekvenssi(e)n ilmentäminen johtaa halutun proteiinin tuottoon tai tämän proteiinin fragmentin tuottoon. Tämä ilmentyminen voi tapahtua transformoiduissa soluissa jatkuvasti tai säädetysti.

Niinpä ksylanaasia koodaavat sekvenssit voidaan kytkeä toiminnallisesti mihin tahansa haluttuun vektoriin ja transformoida valikoituun isäntään niin, että sellaisten proteiinien ilmentyminen turvataan siinä isännässä.

Ksylanaasia koodaavat sekvenssit voidaan fuusoida muihin sekvensseihin lukukehyksessä niin, että konstruoidaan fuusio-proteiinia koodaava DNA. Ksylanaasigeeniä koodaava yhdistelmävektori voidaan esimerkiksi valmistaa kuten edellä, paitsi että ksylanaasia koodaava sekvenssi fuusioidaan *T. reesei*n sellulaasin, hemisellulaasin tai mannanaasin sekvenssin kanssa, tai mainitun sellulaasin, hemisellulaasin tai mannanaasin

vähintään yhden funktionaalisen domeenin kanssa, kuten on kuvattu patenteissa US 5,298,405 ja WO 93/24622 sekä GenBankin esityksessä (submission) L25310, jotka kukin sisällytetään tähän viitteellä. Erityisesti entsyymi on CBHI, CBHII, EGI, EGII, XYLI, XYLII tai mannanaasi (MANI), tai niiden domeeni, kuten esimerkiksi erityssignaali tai ydinsekvenssi (core sequence). Mannanaasilla on sama domeenirakenne kuin sellulaaseilla: aktiivisen kohdan sisältävä ydindomeeni, seriini-treoniinirunsaan alueen sisältävä saranadomeeni ja sitojadomeenin sisältävä häntä.

Voidaan konstruoida fuusiopeptidejä, jotka sisältävät N-terminaalisen mannanaasin tai sellobiohydrolaasin tai endoglukanaasin ydindomeenin tai niistä peräisin olevat ydin- ja saranadomeenit fuusioituneena *Actinomaduran* ksylanaasisekvenssiin. Tuloksena on proteiini, joka sisältää N-terminaalisen mannanaasin tai sellobiohydrolaasin tai endoglukanaasin ytimen tai ytimen ja saranadomeenit ja C-terminaalisen *Actinomaduran* ksylanaasin. Fuusioproteiini sisältää fuusiokonstruktiona eri domeenien sekä mannanaasin tai sellobiohydrolaasin tai endoglukanaasin että ksylanaasin aktiivisuudet.

Fuusioproteiinit voidaan konstruoida myös siten, että mannanaasi- tai sellobiohydrolaasi- tai endoglukanaasihäntä tai niiden haluttu fragmentti sisällytetään, sijoitettuna *Actinomaduran* ksylanaasisekvenssin eteen, erityisesti niin, että mahdollistetaan hännässä olevan ei-spesifisen proteaasikohdan käyttö proteaasikohtana ksylanaasisekvenssin talteenottamiseksi ilmennetystä fuusioproteiinista. Vaihtoehtoisesti fuusioproteiinit voidaan konstruoida siten, että saadaan proteaasikohta liittäjään (linker), joka sijoitetaan *Actinomaduran* ksylanaasin eteen, joko häntäsekvenssien kanssa tai ilman niitä.

IV. Keksinnön mukaiset entsyymivalmisteet

Keksinnössä kuvataan entsyymikoostumukset, jotka ovat hyödyllisiä entsyymivalkaisumenetelmässä ja sellun- ja paperinval-

mistuksessa. Kuvataan myös menetelmä sellaisen entsyymivalmisteiden tuottamiseksi, jolta puuttuu joko osittain tai kokonaan sellulolyttinen aktiivisuus (so. kyky hajottaa selluloosa täysin glukooksi) ja joka on rikastettu sellun- ja paperinvalmistuksessa toivottavilla ksylanaaseilla. "Sellulolyttisen aktiivisuuden puuttumisella" tarkoitetaan vähennettyä, alennettua, heikennettyä tai estettyä kykyä hajottaa selluloosa glukooksi. Valmisteet, joista puuttuu sellulolyttinen aktiivisuus, ja niiden valmistaminen yhdistelmä-DNA-menetelmillä kuvataan US-patentissa 5,298,405, joka sisällytetään tähän viitteellä. Kuten tässä kuvataan, ksylanaaseja voidaan saada keksinnön mukaisilla isännillä suoraan (isännät itse siirretään väliaineeseen jossa puunkäsittely tapahtuu). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää isäntien kasvatuksessa saatua kasvualustaa tai siitä puhdistettuja entsyymejä. Lisäksi jos haluttuja aktiivisuuksia on useammassa kuin yhdessä yhdistelmäisännässä, voidaan sellaiset valmisteet eristää sopivista isännistä ja yhdistää ennen käyttöä keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Keksinnön mukaiset entsyymivalmisteet tyydyttävät sellu- ja paperiteollisuuden eri sovellutuksissa vaadittavat erityistarpeet. Esimerkiksi jos aiottu sovellutus on sellun mekaanisen massan lujuuden parantaminen, keksinnön mukaiset entsyymivalmisteet voivat tarjota entsyymejä, jotka vahvistavat tai helpottavat selluloosakuitujen kykyä sitoutua toisiinsa. Samalla tavalla massan hiertämissovellutuksessa (pulp milling) keksinnön mukaiset entsyymivalmisteet voivat tarjota entsyymejä, jotka vahvistavat tai helpottavat edullista turpoamista.

Keksinnön mukaisten entsyymivalmisteiden saamiseksi viljellään sopivissa olosuhteissa edellä kuvattuja yhdistelmäisäntiä, joilla on halutut ominaisuudet (so. isäntiä, jotka pystyvät ilmentämään haluttuja *Actinomadura flexuosa*n 35 kDa ja/tai 50 kDa ksylanaasientsyymejä suurina määrinä ja valinnaisesti niitä, jotka eivät pysty olennaisesti ilmentämään yhtä tai useampaa sellulaasientsyymiä), halutut entsyymit eritetään isännistä kasvualustaan ja entsyymivalmiste otetaan talteen

mainitusta kasvualustasta alalla tunnetuilla menetelmillä.

Entsyymivalmiste voidaan tuottaa viljelemällä yhdistelmäisäntää kantaa fermentorissa. Keksinnön mukaista entsyymivalmistetta voidaan tuottaa esimerkiksi nestemäisessä kasvualustassa, joka sisältää päähiilenlähteenä kaurasta vapautettuja (oat spelt) ksylaaneita, kuten on kuvannut Morosoli (*Biochem J.*, 239: 587-592 (1986)).

Entsyymivalmiste on kasvualusta, jossa on tai ei ole transformoituja isäntäsoluja, tai se otetaan talteen kasvualustasta soveltaen alalla hyvin tunnettuja menetelmiä. Joka tapauksessa koska ksylanaasientsyymit erittyvät kasvualustaan ja niillä on aktiivisuutta sellaisissa ympäristöolosuhteissa, jotka vallitsevat hemisellulolyttisessä liuoksessa, keksinnön etuna on se, että keksinnön mukaisia entsyymivalmisteita voidaan käyttää suoraan kasvualustasta ilman myöhempää puhdistusta. Haluttaessa sellaiset valmisteet voidaan lyofilisoida tai entsyymiaktiivisuus voidaan muulla tavoin konsentroida ja/tai stabiloida säilytystä varten. Keksinnön mukaiset entsyymivalmisteet ovat hyvin taloudellisia hankkia ja käyttää, koska (1) entsyymejä voidaan käyttää puhdistamattomassa muodossa; spesifisen entsyymin eristäminen kasvuliuksesta on tarpeetonta ja (2) koska entsyymit erittyvät kasvualustaan, vain kasvualusta on otettava talteen halutun entsyymivalmisteen saamiseksi; entsyymiä ei tarvitse uuttaa isännistä.

Haluttaessa ilmennetty proteiini voidaan edelleen puhdistaa tavanomaisten olosuhteiden mukaisesti, kuten esim. uutolla, saostuksella, kromatografialla, affiniteettikromatografialla, elektroforeesilla tai vastaavalla.

Keksintö kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavissa esimerkeissä. Nämä esimerkit esittävät vain muutaman konkreettisen sovellutuksen keksinnöstä. Alan asiantuntijalle on itsestään selvää aikaansaada useita samanlaisia sovellutuksia. Esimerk-

kejä ei niin ollen pidä tulkita keksinnön piiriä kaventavina vaan keksinnön käyttöä selventävinä.

ESIMERKIT

Esimerkki 1

Actinomadura flexuosa DSM43186-kannan ravistelupullo- ja fermentoriviljelyt

Actinomadura flexuosa DSM43186-kantaa levitettiin kaurahiutale-kivennäisaine-alustamaljalle (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, *DSM Catalogue of strains*, 3. painos., Braunschweig, Saksa (1983)); 1 litra sisältää 20 g agaria, 20 g kaurahiutaleita, 1 ml hivenaineliuosta, joka sisältää 100 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 100 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ / 100 ml; pH 9,0) ja inkuboitiin 50 °C:ssa itiöiden muodostumiseen saakka. Itiöitä muodostava pesäke siirrotettiin 10 ml:aan XPYB-kasvualustaa (Greiner-Mai, E. et al., *System. Appl. Microbiol.* 9:97-109 (1987); Holtz, C. et al., *Antonie van Leeuwenhoek* 59:1-7 (1991)); 1 litra sisältää 5 g kaurasta erotettua ksylaania, 5 g peptonia kaseiinista, 5 g hiivauutetta, 5 g lihauutetta, 0,74 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; pH 9,0) ja inkuboitiin 55 °C:ssa pyörivässä ravistelijassa (rotary shaker) (250 rpm) kahdesta kolmeen päivää. Sen jälkeen 5 ml:n ymppe siirrettiin 250 ml:aan samaa kasvualustaa ja inkuboitiin samoissa olosuhteissa kolme päivää. Saatu ksykanaasiaktiivisuus oli 17 nkat/ml (mitattu pH-arvossa 6,0, 60 °C:ssa, 5 minuutin reaktio; Bailey, M.J. et al., *J. Biotechnol.* 23: 257-270 (1992)).

Menettely toistettiin kahta 1 l:n fermentaatiota varten (Biostat M, B. Braun, Melsungen, Saksa) kuten edellä. Fermentaatioihin käytettiin 10 % (v/v) ymppeä. pH pidettiin pH-arvossa $7,8 \pm 0,2$ lisäämällä ammoniakkia (12,5 % (v/v)) ja fosforihappoa (17 % (v/v)), fermentointilämpötila oli 50 °C. Fermentoria sekoitettiin nopeudella 400 rpm ja ilmavirran nopeus oli 1 l/min. Saadut ksykanaasiaktiivisuudet olivat 32 ja 58 nkat/ml (pH 6,0, 60 °C, 5 minuutin reaktio; Bailey, M.J. et al., *J. Biotechnol.* 23: 257-270 (1992)).

Esimerkki 2

Viljelysupernatantista saadun *Actinomadura flexuosan* ksylanaasiaktiivisuuden optimi-pH:n ja -lämpötilan määrittäminen

Ksylanaasiaktiivisuudet mitattiin kaikissa esimerkeissä M. J. Baileyn ym., *J. Biotechnol.* 23: 257-270 (1992), mukaisesti käyttämällä substraattina 1 %:ista (w/v) koivun ksylaania (Roth 7500). Määritysolosuhteet ovat, ellei toisin mainita, pH 5,3 ja lämpötila 50 °C 5 minuutin inkubaatioajalla. (Bailey, M. ym., *J. Biotechnol.* 23: 257-270 (1992)). Yksi ksylanaasiyksikkö (1 nkat) määritellään sellaisena entsyymimääränä, joka tuottaa pelkistäviä hiilihydraatteja, joiden pelkistyskyky vastaa yhden nmol:n ksyloosia muodostumista yhdessä sekunnissa koivun ksylaanista määritysolosuhteissa. Kansainvälinen yksikkö (International Unit) on sellaisen entsyymimäärän, joka tuottaa yhden mikromoolin mitattuja lopputuotteita yhdessä minuutissa polymeerisestä substraattista, jolloin 1 IU = 16,67 nkat.

Actinomaduran ksylanaasiaktiivisuuden optimi-pH:n määrittämiseksi ravistelupulloviljelmästä peräisin olevat näytteet (viljelysupernatantti) laimennettiin McIlvainin puskureihin (0,25 M sitruunahappoa - 0,5 M Na₂HPO₄), joiden pH-alue oli 3,0-11,0. Entsyymi-puskuriseosten lopulliset pH:t olivat 3,5, 4,5, 5,4, 6,4, 7,2, 8,0, 8,5, 9,7 ja 11,2. Ksylanaasiaktiivisuus mitattiin jokaisessa pH:ssa 50 °C:ssa, 5 minuutin reaktioaikaa käyttäen. Ksylanaasiaktiivisuus osoitti 80-100 % maksimiaktiivisuudestaan pH-alueella noin 5,4-8,0. Entsyymillä oli maksimiaktiivisuus noin pH-arvossa 6,4 (kuva 1).

Lämpöstabiiliuden määrittämiseksi näytteet viljelusupernatantista laimennettiin McIlvainin puskureihin. BSA:ta lisättiin konsentraatioon 100 µg/ml ja pepstatiini A:ta (10 µg/ml) samoin kuin fenyyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF, 174 µg/ml) lisättiin proteaasi-inhibiittoreina. Entsyymi-puskuriseosten lopulliset pH-arvot olivat 6,9, 7,8, 9,0 ja 9,4. Näytteitä inkuboitiin ilman substraattia 60 °C:ssa, 70 °C:ssa ja 80 °C:ssa. Näytteet otettiin 0, 30, 60 ja 120 minuutin väliajoin

ja jäädytettiin välittömästi jäällä ennen jäännösksylanaasiaktiivisuuden määrittämistä 50 °C:ssa (5 minuutin reaktio vastaavassa pH:ssa). Entsyymi oli hyvin stabiili, kun sitä inkuboitiin 60 °C:ssa ja 70 °C:ssa; yli 60 % ksylanaasiaktiivisuudesta oli säilynyt 120 minuutin inkubaation 70 °C:ssa pH-arvossa 9 jälkeen (kuvat 2, 2A ja 2B).

Esimerkki 3

Actinomaduran ksylanaasien puhdistus

Actinomaduran kasvatusalustasta peräisin olevien ksylanaasien puhdistus suoritettiin +4 °C:ssa FPLC-laitteistoon (Pharmacia) kytketyillä kromatografiapylväillä. Ksylanaasiaktiivisuustutkimukset suoritettiin 50 °C:ssa ja pH-arvossa 6,5. Proteiinia seurattiin 280 nm:ssä läpi koko puhdistuksen. Näytteet ajettiin 0,1 % SDS:ää sisältävällä polyakryyliamidi-slab-geeleillä Bio-Rad Mini Protean II-elektroforeesijärjestelmällä ja värjättiin Coomassie Brilliant Blue-värillä.

Thermomonospora fusca-lajin ksylanaasi A:ta (TfxA), saatu prof. David Wilsonilta, Cornellin yliopisto) vastaan valmistettua polyklonaalista vasta-ainetta käytettiin toteamaan *Actinomaduran* ksylanaasi(t) Western blot-analyseissä. Toteamisessa käytettiin Promegan ProtoBlot[®] AP System-järjestelmää.

Edellä kuvatun kahden 1 l:n fermentaation kasvatusalustat yhdistettiin ja sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 8000 g 30 minuutin ajan. Supernatantti (1500 ml) laimennettiin 1 + 2 12,5 mM Na₂HPO₄:llä pH 9,0 ja säädettiin pH-arvoon 8,6 1 M NaOH:lla. Tämä näyte pantiin kahdessa erässä DEAE Sepharose CL-6B (Pharmacia)-ioninvaihtopylväälle (2,5 x 29 cm), joka oli tasapainotettu 12,5 mM Na₂HPO₄:llä pH 9,0, virtausnopeudella 100 ml/h. Molempien ajojen läpivirtaukset yhdistettiin ja käsiteltiin erikseen, kuten myöhemmin kuvataan.

Sitoutuneiden proteiinien eluutio DEAE-pylvästä suoritettiin lineaarigradientilla (400 ml + 400 ml) 25 mM Na₂HPO₄:stä pH 9,0, 1 M NaCl:ää sisältävään 25 mM Na₂HPO₄:ään, pH 9,0, vir-

tausnopeudella 105 ml/tunti, ja 10 ml:n fraktiot otettiin talteen. Voitiin kerätä kaksi ksylanaasiaktiivisuutta sisältävää piikkiä (poolit I ja II), samoin kuin toisen piikin pitkä "hännänmuodostus" (pooli III).

Kolme poolia (jokainen yhdistetty molemmista DEAE-ajoista) säädettiin kukin sisältämään 2 M natriumkloridia ja siirrettiin erikseen Phenyl Sepharose CL-4B (Pharmacia)-pylväälle (2,5 x 15 cm), joka oli tasapainotettu 25 mM Na₂HPO₄:llä pH 9,0, joka sisälsi 2 M NaCl. Eluutio suoritettiin virtausnopeudella 100 ml/tunti kaksivaiheisella gradientilla 100%:isestä puskuri A:sta (25 mM Na₂HPO₄, pH 9) 35 %:iseen puskuri B:hen (25 mM Na₂HPO₄, joka sisälsi 60 % etyleeniglykolia) 60 minuutin aikana, mitä seurasi jyrkempi gradientti 35 %:isestä B:stä 100 %:iseen B:hen 60 minuutin aikana. Otettiin talteen 7 ml:n (pooli I) ja 5 ml:n (poolit II ja III) fraktiot. Saadun pooli I:n ksylanaasiaktiivisuutta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja nimettiin DEPS I:ksi. Kummatkin DEAE-poolit II ja III johtivat kahteen ksylanaasiaktiivisuutta sisältävään piikkiin, joille annettiin nimet DEPS II/1, DEPS II/2 ja vastaavasti DEPS III/1 ja DEPS III/2.

DEAE-ajojen läpivirtaukset (katso edellä) konsentroitiin kalvolla, jonka läpäisyraja oli 30 kDa, ja säädettiin sisältämään 2 M NaCl. Tämä näyte pantiin Phenyl Sepharose 6 FastFlow (matala sub; Pharmacia)-pylväälle (2,5 x 34 cm), joka oli tasapainotettu 25 mM Na₂HPO₄:llä pH 9,0, joka sisälsi 2 M NaCl. Eluutio suoritettiin virtausnopeudella 300 ml/h samanlaisella gradientilla kuin DEAE-pooleille käyttäen Phenyl Sepharose CL-6B:tä, ja 10 ml:n fraktiot otettiin talteen. Saadut ksylanaasiaktiivisuutta sisältävät piikit nimettiin KFI:ksi, KFII:ksi ja KFIII:ksi. Konsentraatiosta saadulle permeaatille tehtiin samanlainen Phenyl Sepharose 6 FastFlow (matala sub)-ajo, ja ksylanaasiaktiivisuutta sisältävät fraktiot nimettiin PFI:ksi ja PFII:ksi.

Kaikkia saatuja DEPS-, KF- ja PF-piikkejä dialysoitiin 25 mM Na₂HPO₄:ää vastaan yön yli.

Noin puolet ksylanaasiaktiivisuudesta sitoutui DEAE Sepharoseen ensimmäisessä puhdistusvaiheessa. DEAE-proteiinien eluutio tästä ioninvaihtajasta johti todella terävään piikkiin, jota seurasi leveä "piikki" (kuva 3). Tämä leveä "piikki" jaettiin kahteen eri pooliin. Kukin näistä pooleista puhdistettiin edelleen hydrofobisella interaktio-kromatografia(HIC)-pylväällä (kuvat 4, 4A ja 4B). Joitakin eroja voitiin nähdä siinä, että DEAE:n pooli I johti homogeeniseen piikkiin HIC:llä (kuva 4), mutta molemmat poolit II (kuva 4A) ja III (kuva 4B) johtivat vähintään kahteen piikkiin. Näytteet näistä pooleista ajettiin SDS-PAGE:lla ja proteiinivärjättiin Coomassie Blue-väriellä (kuva 5) samoin kuin analysoitiin Western blot-analyysillä *T. fusca*n vasta-aineen kanssa (kuva 5A). Vasta-aine reagoi vain kasvatusalustasta peräisin olevien kahden - kolmen pienemmän molekyyli-painon omaavan (35 kDa tai aiempi) vyöhykkeen kanssa ja heikosti näissä pooleissa olevien proteiinien kanssa. Näissä pooleissa olevien proteiinien näennäiset molekyyli-painot olivat 50 kDa arvioituna SDS-PAGE:sta molekyyli-painostandardien kanssa. Puhtaimpia olivat poolit DEPS II/2, DEPS III/1 ja DEPS III/2.

DEAE-ioninvaihtajan läpivirtaus konsentroidiin kalvolla, jonka läpäisyraja oli 30 kDa. Noin puolet ksylanaasiaktiivisuudesta havaittiin konsentraatissa ja puolet permeaatissa. Molemmat puhdistettiin edelleen hydrofobisella interaktio-kromatografialla, mikä johti kahteen ksylanaasiaktiivisuuspiikkiin permeaatilla (kuva 6) ja kolmeen konsentraatilla (kuva 6A). Nämä piikit analysoitiin SDS-PAGE:lla samoin kuin Western blot-analyysillä (kuva 7). Konsentraatista peräisin olevalla ensimmäisellä piikillä, KF1:llä, oli SDS-PAGE:lla vyöhyke, jonka näennäinen molekyyli-paino oli 40 kDa, muttei antanut reaktiota Western blot-analyysissä. Tällä piikillä oli kuitenkin korkein ksylanaasiaktiivisuus. KF2:lla oli SDS-PAGE:lla 50 kDa:n vyöhyke, joka reagoi heikosti vasta-aineen kanssa, mutta Western blot-analyysissä voitiin havaita selvä 30 kDa:n vyöhyke. Kolmannella piikillä, KF3:lla, oli Western blot-analyysissä 35 kDa:n vyöhyke. Konsentraatti sisälsi ksylanaaseja, joiden

näennäiset molekyylipainot olivat 50, 40, 35 sekä 30 kDa. Ensimmäinen permeaatista saatu piikki, PF1, reagoi *T. fusca* vasta-aineen kanssa osoittaen kaksi vyöhykettä, joiden molekyylipainot olivat 35 kDa ja vastaavasti 30 kDa. Toisaalta PF2:lla oli Western blot-analyysissä vain yksi 35 kDa:n vyöhyke.

Yhteenvedona *Actinomadura* sp. DSM43186:n kasvualusta sisältää ksylanaaseja, joiden molekyylipainot ovat noin 50, 40, 35 ja 30 kDa. Näistä 35 kDa:n ja 50 kDa:n proteiinit tulevat esiin molekyylipainon päävyöhykkeinä (SDS-PAGE:lla). On mahdollista, että SDS-PAGE:lla havaittu 40 kDa:n ksylanaasivyöhyke on SDS-PAGE:lla havaitun 50 kDa:n hajoamistuote ja että SDS-PAGE:lla havaittu 30 kDa:n ksylanaasivyöhyke on SDS-PAGE:lla havaitun 35 kDa:n ksylanaasivyöhykkeen hajoamistuote.

Esimerkki 4

Peptidien tuotanto ja sekvensointi

DEAE Sepharose CL-6B-ajosta (kuva 3) peräisin olevalle pooli I-näytteelle (12 ml) tehtiin geeliexsklusiokromatografia HighLoad 26/60 Superdex G75-pylväällä (Pharmacia), joka oli tasapainotettu 25 mM Na_2HPO_4 :llä pH 9, virtausnopeudella 120 ml/tunti. Ksylanaasiaktiivisuutta sisältävän piikin fraktiosta saatu näyte (25ml) laimennettiin (1 + 1) vedellä ja asetettiin mono Q (Pharmacia)-ioninvaihtajalle, joka oli tasapainotettu 25 mM Na_2HPO_4 :llä pH 9. Eluutio suoritettiin virtausnopeudella 30 ml/tunti lineaarigradientilla 12,5 mM Na_2HPO_4 :stä, pH 9, 12,5 mM Na_2HPO_4 :ään, pH 9, joka sisälsi 0,5 M NaCl, 50 minuutin aikana. Ksylanaasiaktiivisuutta sisältävä piikki (1 ml) konsentroitiin Centricon mikro-rikastuslaitteella (läpäisyraja 30 kDa) ja eluoitiin 1%:isella ammoniumbikarbonaatilla. Tämä konsentroitunut näyte haihdutettiin ja alkyloitiin vinyylipyridiinillä. Alkyloitu näyte pilkottiin trypsiinillä (modifioitu trypsiini, sequenal-luokka, Promega V5111). Pilkottu tuote pantiin HPLC:hen kytketylle käänteisfaasipylväälle, ja piikit, jotka absorboivat aallonpituudella 214 nm, otettiin käsin

talteen. Jokaiselle kerätylle fraktiolle tehtiin Edmanin de-
gradaatio kaasupulssi-nestefaasisekvenssoijassa (gas-pulsed-
liquid-phase sequencer) (Kalkkinen ja Tilgman, *J. Protein*
Chem. 7: 242- 243 (1988)) ja vapautuneet PTH-aminohapot ana-
lysoitiin on-line käyttämällä kapean läpimitan (narrow bore)
käänteisfaasi-HPLC:tä.

Puhdistetusta 50 kDa:n ksylanaasista saadut peptidit luetel-
laan taulukossa 1.

Taulukko 1: Peptidit puhdistetusta 50 kDa:n ksylanaasista

Peptidi	Sekvenssi
# 1696	Ala-Ala-Ser-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Ala-Ala-Gln-His-Asn-Arg
# 1697	Tyr-Phe-Gly-Val-Ala-Ile-Ala-Ala-Asn-Arg
# 1698	Leu-Asn-Asp-Ser-Val-Tyr-Thr-Asn-Ile-Ala-Asn-Arg
# 1699	Asn/Gly/X-Thr-Gly-Ile-Thr-Val-X-Gly-Val
# 1703	His/Glu/Thr-Glu/Phe-Leu/Asn-Val/Ser-Tyr/Val-Asn/Thr- Met/Ala-Val/Glu-Asn/X-Glu/X-Met/X
# 1704	Glu-Phe-Asn-Ser-Val-Thr-Ala-Glu-Asn-Glu-Met-(Lys)

Peptidisekvenssien #1696, 1697, 1698 ja 1704 yhdistelmä sopii
yhteen 75 %:n yhtäläisyydellä *Streptomyces lividansin* ksyla-
naasi A:n aminohappojen 42-89 kanssa. Lisäksi peptidi #1699
osoittaa 78 %:n yhtäläisyyttä *S. lividansin* XlnA:n aminohappo-
jen 301-309 kanssa:

<i>Actinomadura</i> 50 kDa	#1696	#1697	#1698	#1704	
	1 AASTLAEGAAQHNR	YFGVAIAANR	LNDSVYTNIANR	EFNSVTAENEMK	48
	. :..: 		
<i>S. lividans</i> XlnA	42 AESTLGAAAQSGR	YFGTAIASGR	LSDSTYTSIAGR	EFNMVTAENEMK	89
<i>Actinomadura</i> 50 kDa	#1699				
	G				
	NTGITVXGV				
	:				
<i>S. lividans</i> XlnA	SRCLGITVWGVRD				
	300	310			

Esimerkki 5

Puhdistettujen 35 kDa:n ja 50 kDa:n ksylanaasien pH-ominaisuudet ja lämpötilastabiilius

Puhdistettujen 35 kDa:n ja 50 kDa:n entsyymien (± 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA:ta) lämpötilastabiilius määritettiin inkuboimalla entsyyminäytteitä 70 °C:ssa, pH 6,0:ssa, 0,2, 6 ja 24 tuntia kestävinä ajanjaksoina, minkä jälkeen näytteiden ksylanaasiaktiivisuus määritettiin (pH-arvossa 6,5, 60 °C, 20 minuutin reaktio). Niissä näytteissä, joihin oli lisätty BSA:ta, voitiin mitata yli 80 % alkuperäisestä aktiivisuudesta jopa 24 tunnin inkuboinnin jälkeen (kuvat 8 ja 9 35 kDa:n ja vastaavasti 50 kDa:n ksylanaasille). Kun BSA:ta ei lisätty, voitiin alkuperäisestä aktiivisuudesta silti mitata noin 60 % (35 kDa) tai 70 % (50 kDa) 24 tunnin inkuboinnin jälkeen (kuvat 8 ja 9).

pH-riippuvuus määritettiin inkuboimalla entsyyminäytteitä eri pH-arvoissa (pH 4-8) ja 80 °C:n (35 kDa) sekä 60, 70 ja 80 °C:n (50 kDa) lämpötiloissa 20 minuutin ajan (35 kDa) tai 10 minuutin ajan (50 kDa). Lämpötilassa 80 °C 35 kDa:n ksylanaasin pH-optimi oli noin pH-arvossa 6, ja sen aktiivisuudesta miltei 90 % oli noin pH-arvosta 5 pH-arvoon 7 (kuva 10A). Lämpötiloissa 60 °C ja 70 °C 50 kDa:n ksylanaasin pH-optimi oli pH-alueella 5-7 ja 80 °C:ssa pH-optimi oli pH-alueella 6-7. Näissä olosuhteissa entsyymi oli hyvin stabiili pH-välillä 5-7 (kuva 10B). Sekä 35 kDa:n että 50 kDa:n ksylanaasin inkubointi 60 °C:ssa 60 minuutin ajan pH-arvoissa 4,2-8,7 osoitti samanlaisen stabiilisuuden kuin edellä olevassa koeksessa havaittiin, paitsi että 50 kDa:n ksylanaasi näyttää olevan vähemmän stabiili pH-arvossa 4,2 näissä olosuhteissa (kuva 10C). Lämpötilariippuvuuskokeet pH-arvossa 7 35 kDa:n ja 50 kDa:n ksylanaasin 60 minuuttia kestäväillä inkubaatioilla substraatin kanssa lämpötiloissa 50, 60, 70 ja 80 °C osoitti molemmille entsyymeille maksimiaktiivisuuden 70 °C:ssa (kuva 11). Näiden tulosten perusteella 50 kDa:n ksylanaasi näytti olevan hieman stabiilimpi 80 °C:ssa ja pH-arvossa 7 kuin 35 kDa:n ksylanaasi. Toisaalta 35 kDa:n ksylanaasi oli aktiivisempi ja stabiilimpi pH-alueella 4-5.

Esimerkki 6

Valkaisukokeet käyttäen *Actinomaduran* viljelysupernatanttia

Toisinaan seuraavia valkaisukoesarjoja tehtiin *Actinomadura flexuosan* ksylanaasin hyödyllisyyden määrittämiseksi sekä sulfaattisellun ECF (kloorikaasuvapaa) että TCF (täysin kloorivapaa)-valkaisussa.

ECF-valkaisu

Actinomadura flexuosan ksylanaasia sisältäviä kasvualustoja (katso esimerkki 1) lisättiin suomalaiseen happidelignifioituun havupuusulfaattiselluun (kappaluku = 15) määränä 50 tai 100 nkat/g massan kuiva-ainetta pH-arvossa 7 ja lämpötilassa 70 °C 1 tunnin ajaksi. Tässä kasvualustassa on hyvin vähän endoglukanaaseja ja sellulaaseja. Vertailumassaa pidettiin samoissa olosuhteissa ilman entsyymilisäystä.

Kaikki massat valkaistiin sitten samalla tavalla kahdessa vaiheessa: klooridioksidi ja alkalinen uutto. Hajonneen ligniinin mittana määritettiin suodoksen absorbanssi 280 nm:ssä.

Taulukko 2

	0 nkat/g	50 nkat/g	100 nkat/g
Entsyymivaihe			
Konsistenssi, %	3	3	3
Lämpötila, °C	70	70	70
pH alussa/lopussa	7,0/7,1	7,0/7,2	7,2/7,4
Retentioaika, min	60	60	60
A280 (laim. 1/10)	0,22	0,49	0,65
ClO₂-vaihe			
Konsistenssi, %	3	3	3
ClO ₂ -annos	2,3	2,3	2,3
Lämpötila, °C	60	60	60
pH lopussa	2,4	2,5	2,5
Retentioaika, min	60	60	60
Uuttovaihe			
Konsistenssi, %	10	10	10
NaOH-annos, %	1,5	1,5	1,5
Lämpötila, °C	70	70	70
pH lopussa	10,9	10,9	10,9
Retentioaika, min	60	60	60
Lopullinen massa			
Valkoisuusaste, % ISO	56,7	59,9	60,6
Kappaluku	6,6	5,6	5,4
Viskositeetti dm ³ /kg	920	910	900

Kuten taulukosta 2 voidaan nähdä, ligniiniä poistui enemmän (mitä todistaa muutos A²⁸⁰:ssa) ksylanaasilla tehdyn esikäsitteilyn jälkeen. Lopullisilla massoilla oli 3-4 yksikköä korkeampi valkoisuusaste massan lujisuuden häviämättä (viskositeetin muutos 20 yksikköä on menetelmän normaalin vaihtelun rajoissa).

TCF-valkaisu

Suomalaista happidelignifioitua havupuusulfaattimassaa, jonka kappaluku oli 15, käsiteltiin *Actinomadura flexuosan* ksylanaasilla käyttäen entsyymiannoksia 50 ja 100 nkat/g massan kiviainetta. Käsitteily tehtiin pH-arvossa 7 70 °C:ssa 1 tunnin ajan. Vertailumassaa pidettiin samoissa olosuhteissa ilman entsyymilisäystä.

Tämän jälkeen kaikki massat valkaistiin samalla tavalla kahdessa vaiheessa: metallinpoistokäsittely kelatoimalla EDTA:n kanssa ja vetyperoksidikäsittely. Hajonneen ligniinin mittana määritettiin suodoksen absorbanssi 280 nm:ssä.

Taulukko 3

	0 nkat/g	50 nkat/g	100 nkat/g
Entsyyminen vaihe			
Konsistenssi, %	3	3	3
Lämpötila, °C	70	70	70
pH alussa/lopussa	7,0/7,4	7,0/7,3	7,0/7,3
Retentioaika, min	60	60	60
Abs 280 nm (laim. 1/10)	0,27	0,43	0,57
Kelatointivaihe			
Konsistenssi, %	3	3	3
EDTA, %	0,2	0,2	0,2
Lämpötila, °C	70	70	70
pH lopussa	5,5	5,6	5,8
Retentioaika, min	60	60	60
Abs 280 nm (laim. 1/10)	0,24	0,44	0,64
Konsistenssi, %	10	10	10
H ₂ O ₂ -annos, %	3,0	3,0	3,0
H ₂ O ₂ -kulutus, %	0,87	0,85	0,91
DTPA, %	0,2	0,2	0,2
MgSO ₄ , %	0,5	0,5	0,5
NaOH, %	3,0	3,0	3,0
Lämpötila, °C	80	80	80
pH lopussa	10,6	10,6	10,6
Retentioaika, min	180	180	180
Lopullinen massa			
Valkoisuusaste, % ISO	71,9	72,9	73,0
Kappaluku	9,0	8,3	7,9
Viskositeetti dm ³ /kg	870	890	890

Taulukko 3 osoittaa, että A₂₈₀-mittauksen ja kappaluvun mukaan ksylanaasiesikäsittelyn jälkeen poistui merkittävästi enemmän ligniiniä samalla kun massan lujuus (viskositeetin mukaan) säilyi hyvänä.

Esimerkki 7

Valkaisukokeet käyttäen puhdistettuja 35 kDa:n ja 50 kDa:n ksylanaaseja

Puhdistettua suurempaa 50 kDa:n (AM50) ksylanaasia ja pienempää 35 kDa:n (AM35) ksylanaasia (mukaan lukien myös 30 kDa:n ksylanaasi) käytettiin valkaisukokeisiin kolmivaiheisessa peroksidivalkaisussa. Puhdistetut entsyymivalmisteet olivat samat kuin ne jotka käytettiin puhdistettujen entsyymien pH:n ja lämpötilaominaisuuksien määrittämisessä.

Mukaan otettiin myös kontrollinäyte ilman entsyymikäsittelyä. Raaka-aineena käytetyn havupuumassan (V 541-18 (2129)) kuivapainopitoisuus ja kappaluku olivat 28,8 % ja vastaavasti 13,5. Massan alkuvalkoisuusaste oli 37,1.

Entsyymikäsittely ja -annos

Entsyymin aktiivisuus mitattiin 60 °C:ssa, pH-arvossa 6,5 käyttäen koivupuun ksylaania (Roth no. 7500) substraattina. Entsyymiannos oli 100 nkat/g kuivamassaa. *Actinomaduran* ksylanaasit liuotettiin 25 mM dinatriumfosfaattipuskuriin, joka sisälsi 50 mM NaCl, ja kontrollinäytteeseen lisättiin sama määrä tätä puskuria. Massan pH säädettiin rikkihapolla.

Kelatointi

Kelatointi suoritettiin lisäämällä EDTA:ta 0,2 %:iin kuivapainosta ja se tehtiin 3,0 %:n konsistenssilla 50 °C:ssa yhden tunnin aikana.

Peroksidivalkaisu

Kolme peroksidivalkaisuvaihetta (80 °C, 180 min) suoritettiin samalla tavalla, paitsi että jokaisen vaiheen jälkeen kolmannes massasta otettiin pois testausta varten. Olosuhteet olivat seuraavat:

Konsistenssi	10 %
H ₂ O ₂	3 %
NaOH	3 %
DTPA	0,2 %
MgSO ₄	0,5 %

Tulokset

Tulokset Ecopulp X-200-entsyymivalmisteella (Primalco Ltd. Biotec., Rajamäki, Suomi), joka sisältää *T. reesei* ksylanaasi II:ta on sisällytetty seuraavaan tarkasteluun. Raaka-ainemassa ja kaikki muut käsittelyt ovat samoja, paitsi että entsyymikäsittely (100 nkat/g kuivapainoa) suoritettiin vedessä, pH-arvossa 5,0 50 °C:ssa, mikä on lähellä *T. reesei* xyl II:n optimia. Entsyymin aktiivisuus mitattiin 60 °C:ssa, pH-arvossa 6,5 käyttäen koivupuun ksylaania (Roth no. 7500) substraattina. Kontrollinäytettä käsiteltiin samalla tavalla, mutta ilman entsyymiä.

Pelkistävät sokerit (% kuivapainosta) analysoitiin entsyymikäsittelyn jälkeen, ja ne olivat seuraavanlaiset:

	%
Kontrolli	0,19
AM50	1,18
AM35	1,64
<i>Kontrolli</i>	<i>0,20</i>
<i>Ecopulp X-200</i>	<i>1,32</i>

Valkaisujen tulokset esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4

	ISO-valkoi- suusaste	Kappa	Käytetty peroksidi (%)
P1-vaihe			
Kontrolli	59,6	5,9	2,7
AM50	62,3	6,3	2,7
AM35	63,7	5,3	2,6
Kontrolli	62,2	5,9	2,2
<i>Ecopulp X-200[®]</i>	64,1	7,2	2,3
P2-vaihe			
Kontrolli	67,2	6,8	2,2
AM50	69,7	4,8	2,4
AM35	70,7	4,9	2,2
Kontrolli	68,8	7,7	2,2
<i>Ecopulp X-200[®]</i>	70,6	5,5	2,
P3-vaihe			
Kontrolli	71,3	5,2	2,2
AM50	74,0	4,1	2,2
AM35	74,4	2,2	2,0
Kontrolli	73,3	6,8	2,2
<i>Ecopulp X-200[®]</i>	74,9	4,2	2,1

AM50:n ja AM35:n käyttö nosti selvästi valkoisuusastetta nostamatta käytetyn peroksidin määrää.

Esimerkki 8

Kromosomaalisen DNA:n eristys ja genomikirjaston konstruointi

Actinomadura flexuosa sp. DSM43186-kantaa viljeltiin 50 ml:ssa kasvualustaa, jonka koostumus oli 10 % (w/v) sakkaroosia, 0,5 % (w/v) kaurasta eristettyä ksylaania, 0,5 % (w/v) peptonia kaseiinista, 0,5 % (w/v) hiivauutetta, 0,5 % (w/v) lihauutetta, 0,074 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4-7,5, väliseinin varustetussa ravistelupullossa 2,5 päivän ajan 52 °C:ssa ravistelemalla nopeudella 200 rpm. 2,5 ml tätä viljelmää siirrettiin 50 ml:aan tuoretta kasvualustaa, johon oli lisätty 0,8 % glysiiniä, ja kasvatettiin 2 päivää 50 °C:ssa, 200 rpm. Solut pelletoitettiin sentrifugoimalla ja pestiin seoksella 10 % sakkaroosia - 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) - 25 mM EDTA.

Kromosomaalinen DNA eristettiin Hopwoodin ym., Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich, Yhdistynyt Kuningaskunta (1985), mukaisesti. Lyhyesti sanottuna myseeli hajoitettiin lysotsyymillä ja 2 x Kirbyn seoksella (2 g natriumtri-isopropyyli-naftaleeni-sulfonaattia, 12 g natrium-4-aminosalisyalaattia, 5 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,0), 6 ml Tris-HCl:llä kyllästettyä fenolia, mikä täydennetään vedellä 100 ml:aan). DNA saostettiin isopropanolilla ja liuotettiin TE:hen (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). RNA pilkottiin RNAasilla.

Kromosomaalinen DNA pilkottiin osittain *Sau3A*:lla (Boehringer) ja fraktioitiin koon mukaan sakkaroosigradientissa (10-40 % (w/v) sakkaroosia seoksessa 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA), jota ajettiin nopeudella 55 000 rpm 6 tunnin ajan 22 °C:ssa Beckman TL-100-ultrasentrifugissa TLS-55-roottorissa. Gradientti jaettiin fraktioihin ja niitä, jotka sisälsivät kooltaan pääosin 7-10 kb:n DNA:ta, käytettiin genomisen *Actinomadura*-kirjaston konstruoimiseen.

Esipilkottua ZAP Express™ *Bam*HI/CIAP Vector Cloning Kit -pakkausta (Stratagene) käytettiin kirjaston konstruoimiseen ja kaikissa seuraavissa vaiheissa noudatettiin valmistajan ohjeita. Lyhyesti sanottuna noin 200 ng kokofraktioitua DNA:ta liitettiin 1 µg:aan ZAP Express valmisteesia käsivarsia ja pakattiin käyttämällä Gigapack II pakkausutetta (Stratagene). Kirjaston tiitteri määritettiin infektoimalla *E. coli* XL1-Blue MRF'-solut pakkausfaagin sarjalaimennoksilla ja maljaamalla NZY-maljoille. Ligaatioseoksen kokonaistiitteri oli noin 3×10^7 pfu/ml, yli 96 %:n inserttifrekvenssillä. Kirjastoa käytettiin seulontaan ilman monistusta.

Esimerkki 9A

35 kDa:n ksylanaasia koodaavan geenin eristäminen RBB-ksylaanimaljojen hydrolysointiaktiivisuuden perusteella

ZAP Express™-vektorissa olevaa *Actinomadura flexuosa* sp. DSM43186:n DNA:n genomikirjastoa seulottiin ksylanolyttisen

aktiivisuuden suhteen seuraavalla tavalla. Isäntää, Strata-
genen *E. coli* XL-Blue MRF'-soluja, kasvatettiin LB-elatusai-
neessa + 0,2 % (w/v) maltoosia + 10 mM MgSO₄ ja säädettiin
tiheyteen OD₆₀₀=0,5. Soluja infektoitiin yhdistelmäkirjastolla
15 minuuttia 37 °C:ssa ja maljattiin NZY-topagarin kanssa
NZY-maljoille. Maljoja inkuboitiin 4 tunnin ajan 42 °C:ssa,
päälystettiin nitroselluloosasuodattimilla, jotka oli kyl-
lästetty 10 mM IPTG:llä *lacZ*-fuusioproteiinin ilmentämisen
indusoimiseksi, ja inkuboitiin yli yön huoneenlämpötilassa.

Suodattimet pestiin 50 mM K-fosfaattipuskurilla (pH 6,8) ja
siirrettiin RBB-ksylaani + Km-maljoille. Maljassa on kaksi
kerrosta; alempi 15 ml:n kerros varsinaista LB:tä + Km:ää (40
µg/ml) ja 5 ml:n ylemmpi kerros RBB-ksylaania (0,5 % (w/v)
RBB-ksylaania, 1 % (w/v) kaurasta vapautettua ksylaania LB +
Km -seoksessa, joka on puskuroitu 50 mM K-fosfaatilla, pH
6,8). Maljat siirrettiin 50 °C:seen toiseksi yöksi ksylanolyyt-
tisen aktiivisuuden määrittämiseksi. Suodattimet otettiin pois
ja selvä kehä RBB-ksylaani + Km-maljoilla paljasti ne klooneja,
joilla oli ksylanaasiaktiivisuutta. Alkuperäisistä NZY-mal-
joista poimittiin 22 positiivista plakkia SM-puskuri/kloro-
formi-seokseen.

ZAP Express-vektori on suunniteltu mahdollistamaan minkä ta-
hansa lambdavektorin sisältävän kloonausinsertin yksinker-
tainen, tehokas *in vivo*-irrotus ja saattaminen uudestaan reng-
asmuotoon kloonausinsertin sisältävän fagemidin muodosta-
miseksi. Lyhyesti sanottuna positiivisia klooneja inkuboitiin
XL1 Blue MRF'-solujen kanssa ExAssist-auttajajafaagin kanssa.
Lämpödenaturoinnin (70 °C, 15 min) ja sentrifugoinnin jälkeen
irrotettu fagemidi pBK-CMV pakataan rihmamaisina faagipartik-
keleina supernatantissa. Vapautettu fagemidi sekoitettiin
XL0LR-solujen kanssa ja maljattiin LB/kanamysiinille (50 µg-
/ml) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Vapautetun fagemidin DNA-molekyyleillä transformoidut *E. coli*
XL0LR-solut testattiin uudelleen RBB-ksylaanilla + Km:llä.
Alkuperäisistä 22 positiivisesta kloonausta 12 kloonia säilytti

ksylanaasiaktiivisuutensa. Fagemidi-DNA:t pilkottiin *EcoRI*-/*PstI*:llä, niille tehtiin elektroforeesi, blotattiin nailonkalvolle ja hybridisoitiin digoksigeniini-leimatun pALK185:stä peräisin olevan 1,15 kb:n *T. fuscan* ksylanaasifragmentin kanssa (kuva 12). Plasmidi pALK185 sisältää *T. fuscan xynA*-geenin pTX101:stä (Ghangas, G.S. et al., *J. Bact.* 171: 2963-2969 (1994)). Neljä fagemidiä hybridisoitui *T. fuscan* DNA-koettimen kanssa, mikä osoittaa, että ne kantoivat yhtä tai useampaa geeniä, jolla on jonkin verran homologiaa *T. fuscan* fragmentin kanssa. Näille fagemideille annettiin nimet pALK938, pALK939, pALK940 ja pALK941.

Esimerkki 9B

35 kDa:n ksylanaasia koodaavan geenin eristäminen *T. fuscan xynA*-geeniin hybridisoitumisen perusteella

ZAP Express™-vektorissa olevaa *Actinomadura flexuosa* sp. DSM43186:n DNA:n genomikirjastoa seulottiin pALK185:stä peräisin olevalla digoksigeniini-leimatulla 1,15 kb:n *T. fuscan* ksylanaasifragmentilla (kuva 12) toimittajan ohjeiden mukaisesti. Poimittiin 17 positiivista kloonia. Fagemidit irrotettiin *in vivo*, kuten edellä esimerkissä 9A kuvataan. *E. coli*-kloonit, jotka sisälsivät positiivisia fagemideja, testattiin ksylanolyyttisen aktiivisuuden suhteen RBB-ksytaanilla, kuten edellä esimerkissä 9A kuvataan. Yksitoista kloonia osoitti ksylanolyyttistä aktiivisuutta. Valittiin yksi klooneista ja plasmidille annettiin nimi pALK1056.

Esimerkki 10

35 kDa:n ksylanaasia koodaavan geenin eristäminen *T. fuscan* TfxA-vasta-aineen tunnistaman polypeptidin tuotannon perusteella

Actinomaduran genomikirjaston seulontaan käytettiin polykloonaalista vasta-ainetta *Thermomonospora fusca* 32 kDa:n ksylanaasia, TfxA:ta, vastaan. Stratagenen XL-Blue MRF'-soluja kasvatettiin LB-elatusaineessa + 0,2 % maltoosia + 10 mM MgSO₄

ja laimennettiin tiheyteen $OD_{600}=0,5$. Soluja infektoitiin yhdistelmäkirjastolla 15 minuuttia 37 °C:ssa ja maljattiin NZY-top-agarin kanssa NZY-maljoille. Maljoja inkuboitiin 3,5 tunnin ajan 42 °C:ssa, päällystettiin nitroselluloosasuodattimilla, jotka oli kyllästetty 10 mM IPTG:llä, ja inkuboitiin yli yön huoneenlämpötilassa. Toteaminen suoritettiin 1:1500 laimennetulla *T. fusca* TfxA-vasta-aineella käyttämällä Promegan ProtoBlot[®] AP-systeemiä. Kaksitoista positiivista kloonina, joista klooni 1.1 antoi selvästi voimakkaimman signaalin, otettiin talteen SM-puskuri/kloroformi-seokseen ja puhdistettiin toisella seulontakerralla.

Fagemidit irrotettiin *in vivo*, kuten edellä olevassa esimerkissä 9A on kuvattu. Sitten fagemidit pilkottiin *EcoRI*:llä ja *PstI*:llä, niille tehtiin elektroforeesi, blotattiin nailonkalvolle ja hybridisoitiin digoksigeniini-leimatun pALK185:stä peräisin olevan 1,15 kb:n *T. fusca* ksylanaasifragmentin kanssa (kuva 12). *Actinomadura flexuosa* sp. DSM43186-kannan kromosomaalisesta DNA:sta *T. fusca xynA*-koetin hybridisoitui noin 4 kb:n *EcoRI*-*PstI*-fragmenttiin. Kloonit testattiin myös ksylanolyttisen aktiivisuuden suhteen RBB-ksylyaanilla, kuten edellä olevassa esimerkissä 9A on kuvattu. Yksi klooni (klooni 1.1) oli positiivinen molemmissa seulonnoissa. Tätä kloonia kantavalle fagemidille annettiin nimi pALK923.

Esimerkki 11

35 kDa:n proteiinia koodaavan ksylanaasigeenin restriktioentsyymianalyysi ja sekvensointi

Plasmidit pALK938, pALK939, pALK940, pALK941, pALK1056 ja pALK923 analysoitiin restriktioentsyymianalyysillä ja käytettiin ksylanaasigeenin sekvensointiin. DNA sekvensoitiin käyttämällä ABI (Applied Biosystems)-pakkauksia, jotka perustuvat fluoreseiini-leimattuihin T3- ja T7-alukkeisiin tai sekvenssispesifisiin alukkeisiin fluoreseiini-leimatuilla dideoksinukleotideilla, Taq dye-alukesykli-sekvensointiprotokollalla toimittajan ohjeiden mukaan. Koska *Actinomaduran* DNA:ssa on korkea GC-pitoisuus, sekvensointireaktiot suoritettiin 10 %:i-

sella (v/v) DMSO:lla emäspariutuslämpötilassa 58-60 °C. Sekvensointireaktiot analysoitiin ABI 373A-sekvensoijalla ja saadut sekvenssit karakterisoitiin käyttämällä Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package-systeemiä, versiota 7.2. Kuvassa 13 esitetään 35 kDa:n ksylanaasia koodaava DNA-sekvenssi. Sekvenssillä on 1035 bp:n ORF (avoin lukukehys), mikä viittaa 344 aminohapon polypeptidiin ja vastaa molekyyllipainoltaan noin 37,5 kDa:n proteiinia. Oletettu signaalinprosessointikohta havaitaan alaniini 43:n jälkeen, ja ennustetulla kypsällä proteiinilla on noin 32,9 kDa:n laskennallinen molekyyllipaino. Sekvenssiaineisto on näin ollen hyvässä sovussa 35 kDa:n ksylanaasin puhdistustulosten kanssa, jotka kuvattiin esimerkissä 3. 35 kDa:n geenisekvenssi ilmeni samanlaisena kaikissa tutkituissa klooneissa, paitsi pALK923:n DNA:ssa. pALK923 sisälsi 93 emäsparin tuntemattoman sekvenssin insertin N-terminaalissa, minkä jälkeen *Actinomaduran* 35 kDa:n ksylanaasigeenin sekvenssi alkoi kohdassa, joka vastaa emäsparia 411 kuvassa 13.

Sekvenssillä on korkea homologia eri organismeista peräisin olevia ksylanaaseja kohtaan. Aminohappotasolla geenillä on 76 %:n homologia *T. fuscan* XynA:ta kohtaan.

Esimerkki 12

Actinomaduran 50 kDa:n ksylanaasigeenin eristäminen

ZAP ExpressTM-vektorissa olevaa *Actinomadura flexuosa* sp. DSM43186:n DNA:n genomikirjastoa seulottiin käyttämällä DNA-koetinta.

Puhdistetusta 50 kDa:n proteiinista peräisin olevien peptidisekvenssien perusteella suunniteltiin oligonukleotidialukkeet. Alukesekvenssit esitetään taulukossa 5. Koska peptidisekvenssien #1696, #1697, #1698 ja #1704 yhdistelmä vastaa 75 %:n samankaltaisuudella *Streptomyces lividansin* ksylanaasi A:ssa olevia aminohappoja 42-89, syntetisoitiin 39 emäsparin antisense-oligonukleotidi *S. lividansin xlnA*-sekvenssin emäksistä 331-369. *S. lividansin xlnA* 331-369as-koetin ja alukkeet #-

1704as, #1703as, #1696s leimattiin digoksigeniinillä ja terminaalisisällä transferaasilla, ja käytettiin koettimina hybridisaatiossa 50 °C:ssa teoksen Boehringer, DIG DNA Labeling and Detection Nonradioactive, Applications Manual, mukaan.

Aluke #1704as ja *S. lividansin xlnA*-koetin tunnistivat saman 1,0 kb:n *EcoRI-PstI*-fragmentin *Actinomaduran* DNA:ssa. Fragmentti on erilainen kuin *T. fuscan xynA*-koettimen tunnistama 4 kb:n fragmentti. Näiden tulosten perusteella käytettiin 39-meeristä *S. lividansin xlnA*-koetinta seulomaan *Actinomadura*-kirjasto 50 kDa:n ksylanaasia koodaavan geenin suhteen.

Kolme positiivista plakkia otettiin talteen yli yön detektion jälkeen. Näille klooneille annettiin nimet Act.xyl.50/13, Act.xyl.50/14 ja Act.xyl.50/15.

Kloonatun *Actinomaduran* insertin sisältävät fagemidit irrotettiin, kuten esimerkissä 9A on kuvattu. Ksylanaasiaktiivisuuden määrittämiseksi *E. coli*-kloonit levitettiin RBB-ksylaani + Km-maljoille, kuten esimerkissä 9A on kuvattu, käyttämällä positiivisena kontrollina kantaa, joka tuottaa *Actinomaduran* 35 kDa:n ksylanaasia (plasmidista pALK923). Kloonit Act.xyl.50/13 ja Act.xyl.50/14 osoittivat ksylanaasiaktiivisuutta muodostaen selvän kehän pesäkkeen ympärille.

Taulukko 5. Oligonukleotidialukkeet, joita käytettiin *Actinomaduran* 50 kDa:n ksylanaasia koodaavan geenin toteamisessa.

Aluke	DNA-sekvenssi
<i>Actinomadura</i> sp. DSM43186	
#1696s	GCA/C/G/TGCA/C/G/TCAA/G/CAC/TAAC/TA/CG
#1703as	ACCATA/GTTA/GTAA/C/G/TACA/C/G/TA
#1704as	TTCATC/TTCA/GTTC/TTCA/C/G/TGC
<i>S. lividans xlnA</i> 331-369as	
	CGTGAGTTCAACATGGTGACGGCCGAGAACGAGATGAAG
<i>S. lividans xlnA</i> 257-284s	
	AGAGCGGCCGCTACTTCGGCACCGCCAT
<i>S. lividans xlnA</i> 530-561as	
	CACGCCGTTGATGTGGTCGATCATCGCCTGGC

s = sense; as = antisense

Esimerkki 13

50 kDa:n ksylanaasiproteiinin geenin sekvensointi

Fagemidi-DNA:t klooneista *Act. xyl.* 50/13 ja *Act. xyl.* 50/14 nimettiin pALK927:ksi ja vastaavasti pALK928:ksi. *S. lividansin xlnA* 331-369as -oligomeeriä käytettiin *Actinomaduran* insertin sekvensointiin. Lisäksi syntetisoitiin kaksi oligomeeriä, jotka vastaavat nukleotideja 257-284 ja 530-561 *S. lividansin xlnA*-sekvenssissä, samoin kuin sekvenssispesifiset alukkeet kloonatun insertin sekvenssin saamiseksi. Sekvensointireaktiot suoritettiin 10 %:isella (v/v) DMSO:lla emäspariutuslämpötilassa 58 °C. Sekvensointi suoritettiin kuten esimerkissä 11 on kuvattu. Kuvassa 14 esitetään *Actinomadura* sp. DSM43186:n 50 kDa:n ksylanaasigeenin 1864 emäsparin sekvenssi. Puhdistetusta 50 kDa:n proteiinista saadut peptidisekvenssit osoitetaan johdetun aminohapposekvenssin alleviivauksella. Johdetulla peptidisekvenssillä on 70-71 %:n samanlaisuus *Actinomadura* sp. FC7:n ksylanaasi II-proteiinia (kuva 15) ja *S. lividansin* ksylanaasi A-proteiinia (kuva 15A) kohtaan. Sekvenssillä on 1479 emäsparin antisense avoin lukukehys, mikä viittaa 492

aminohapon polypeptidiin, joka vastaa molekyylipainoltaan noin 53,5 kDa:n proteiinia.

Esimerkki 14

Fuusioproteiinit

Ksylanaasigeeniä koodaava yhdistelmävektori valmistetaan fuusioimalla ksylanaasia koodaava sekvenssi *T. reesei*n sellulaasin tai hemisellulaasin sekvenssin tai vähintään yhden mainitun sellulaasin tai hemisellulaasin funktionaalisen domeenin kanssa, kuten on kuvattu US-patentissa 5,298,405, patentissa WO 93/24621 ja Genbankin esityksessä (submission) L25310, jotka sisällytetään tähän viitteellä. Erityisesti entsyymi on CBHI, CBHII, EGI, EGII, XYLI, XYLII tai mannanaasi (MANI) tai niiden domeeni, kuten esimerkiksi erityssignaali tai ydinsekvenssi.

Voidaan konstruoida fuusioproteiineja, jotka sisältävät N-terminaalisen mannanaasin tai sellobiohydrolaasin tai endoglukanaasin ydindomeenin tai samasta lähteestä peräisin olevat ydin- ja saranadomeenit *Actinomaduran* ksylanaasisekvenssiin fuusioituneena. Tuloksena on proteiini, joka sisältää N-terminaalisen mannanaasin tai sellobiohydrolaasin tai endoglukanaasin ytimen tai ydin- ja sarana-alueet sekä C-terminaalisen *Actinomaduran* ksylanaasin. Fuusioproteiini sisältää mannanaasi- tai sellobiohydrolaasi- tai endoglukanaasi- että ksylanaasiaktiivisuutta eri domeenien fuusiokonstrukteina.

Fuusioproteiinit voidaan konstruoida myös siten, että sisällytetään mannanaasi- tai sellobiohydrolaasi- tai endoglukanaasi-häntä tai niiden haluttu fragmentti asetettuna ennen *Actinomaduran* ksylanaasisekvenssin eteen, erityisesti niin, että hännässä olevan ei-spesifisen proteaasikohdan käyttö mahdollistuu proteaasikohtana ksylanaasisekvenssin talteen ottamiseksi ilmennetystä fuusioproteiinista. Vaihtoehtoisesti voidaan konstruoida fuusioproteiineja, joilla on proteaasikohta liitoskohdassa (linker), joka sijoitetaan ennen *Actinomaduran* ksylanaasia joko häntäsekvenssien kanssa tai ilman niitä.

Esimerkki 15

Isännät

Haluttua ksylanaasia tai fuusioproteiinia koodaava yhdistelmäkonstruktio valmistetaan kuten edellä ja transformoidaan *Trichoderma* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp. tai *Streptomyces* spp. -isäntään.

Kaikki tässä siteeratut viitteet sisällytetään tähän viitteellä. Vaikka tämä keksintö on kuvattu yksityiskohtaisesti ja sen yksityiskohtaisiin suoritustapoihin viitaten, alan asiantuntijalle on selvää, että siihen voidaan tehdä eri muutoksia ja modifikaatioita keksinnön hengestä ja piiristä poikkeamatta.

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISTÄ INFORMAATIOTA:

(i) HAKIJA:

- (A) NIMI: AB Enzymes GmbH
- (B) KATU: Feldbergstrasse 78
- (C) KAUPUNKI: D-64293 Darmstadt
- (D) MAA: GERMANY

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: *Actinomaduran* ksylanaasisekvenssit ja käyttömenetelmät

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 25

(iv) OSOITE KIRJEENVAIHTOA VARTEN:

- (A) ASIAMIES: Oy Borenius & Co Ab
- (B) POSTIOSOITE: Tallberginkatu 2 A
- (C) KAUPUNKI: Helsinki
- (D) MAA: Suomi.
- (E) POSTINUMERO: FI-00180

(v) MUUT YHTEYSTIEDOT:

- (A) PUHELIN: 358-9-6866840
- (B) TELEFAX: 358-0-68668444

(vi) PRIORITEETTIHAKEMUSTEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUKSEN NUMERO: US 08/468,812
- (B) HAKEMISPÄIVÄ: 06-06-1995

(vi) PRIORITEETTIHAKEMUSTEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUKSEN NUMERO: US 08/332,412
- (B) HAKEMISPÄIVÄ: 31-10-1994

(vi) PRIORITEETTIHAKEMUSTEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUKSEN NUMERO: US 08/282,001
- (B) HAKEMISPÄIVÄ: 29-07-1994

(2) INFORMAATIO SEQ ID NO:1:STÄ:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 1375 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: lineaarien

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: CDS

(B) SIJAINTI: 303..1334

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK ID NO: 1:

CCCCGGTATT CATGTGAATG ATTAGCAACA GTTATGTTAC GGAGATATTT CTGAGAGTGT	60
TGACAGGTCG TGAAGTCGGT CCGATACTTT CGAGCTAGCT CCGATAGTTT TCGATACGCC	120
GGCACATCGA GCACGTCGGA CGAGTCACGC GCCACGTCGG TTTTCCGCCG CACGCCGCGC	180
AGAGCGGCCG GAGAACCCCC GCGTGTCCGC GGCATCGGTG CCGGTCCGTC GTTCGCCGCC	240
GACCGCGCGC CGGGTCGCGA CACGCCAGCC CCCATCGGCC CTTCTTCACG AGGAAGCCGT	300
AC ATG AAC GAA CCC CTC ACC ATC ACG CAG GCC AGG CGC CGC AGA CGC	347
Met Asn Glu Pro Leu Thr Ile Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg Arg	
1 5 10 15	
CTC GGC CTC CGG CGC ATC GTC ACC AGT GCC TTC GCC CTG GCA CTC GCC	395
Leu Gly Leu Arg Arg Ile Val Thr Ser Ala Phe Ala Leu Ala Leu Ala	
20 25 30	
ATC GCC GGT GCG CTG CTG CCC GGC ACG GCC CAC GCC GAC ACC ACC ATC	443
Ile Ala Gly Ala Leu Leu Pro Gly Thr Ala His Ala Asp Thr Thr Ile	
35 40 45	
ACC CAG AAC CAG ACC GGG TAC GAC AAC GGC TAC TTC TAC TCG TTC TGG	491
Thr Gln Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Phe Trp	
50 55 60	
ACC GAC GCG CCC GGG ACC GTC TCC ATG ACC CTC CAC TCG GGC GGC AGC	539
Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Thr Leu His Ser Gly Gly Ser	
65 70 75	
TAC AGC ACC TCG TGG CGG AAC ACC GGG AAC TTC GTC GCC GGC AAG GGC	587
Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly	
80 85 90 95	
TGG TCC ACC GGG GGA CGG CGG ACC GTG ACC TAC AAC GCC TCC TTC AAC	635
Trp Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn Ala Ser Phe Asn	
100 105 110	
CCG TCG GGT AAC GGC TAC CTC ACG CTC TAC GGC TGG ACC AGG AAC CCG	683
Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro	
115 120 125	
CTC GTC GAG TAC TAC ATC GTC GAG AGC TGG GGC ACC TAC CGG CCC ACC	731
Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr	
130 135 140	
GGC ACC TAC AAG GGC ACC GTC ACC ACC GAC GGG GGA ACG TAC GAC ATC	779
Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile	
145 150 155	
TAC GAG ACC TGG CGG TAC AAC GCG CCG TCC ATC GAG GGC ACC CGG ACC	827
Tyr Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Arg Thr	
160 165 170 175	
TTC CAG CAG TTC TGG AGC GTC CGG CAG CAG AAG CGG ACC AGC GGC ACC	875
Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg Thr Ser Gly Thr	
180 185 190	
ATC ACC ATC GGC AAC CAC TTC GAC GCC TGG GCC CGC GCC GGC ATG AAC	923

Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	His	Phe	Asp	Ala	Trp	Ala	Arg	Ala	Gly	Met	Asn		
			195					200					205				
CTG	GGC	AGC	CAC	GAC	TAC	CAG	ATC	ATG	GCG	ACC	GAG	GGC	TAC	CAG	AGC		971
Leu	Gly	Ser	His	Asp	Tyr	Gln	Ile	Met	Ala	Thr	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser		
		210					215					220					
AGC	GGT	AGC	TCC	ACC	GTC	TCC	ATC	AGC	GAG	GGT	GGC	AAC	CCC	GGC	AAC		1019
Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Ser	Ile	Ser	Glu	Gly	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn		
	225					230					235						
CCG	GGT	AAC	CCC	GGC	AAC	CCC	GGC	AAC	CCC	GGT	AAC	CCG	GGT	AAC	CCC		1067
Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Pro		
240					245					250					255		
GGC	GGT	GGC	TGC	GTC	GCG	ACC	CTC	TCC	GCC	GGC	CAG	CAG	TGG	AGC	GAC		1115
Gly	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Gln	Trp	Ser	Asp		
				260					265					270			
CGC	TAC	AAC	CTC	AAC	GTC	TCG	GTC	AGC	GGC	TCG	AAC	AAC	TGG	ACG	GTC		1163
Arg	Tyr	Asn	Leu	Asn	Val	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Asn	Asn	Trp	Thr	Val		
			275					280						285			
CGG	ATG	GAC	GTG	CCC	TAC	CCG	GCC	CGC	ATC	ATC	GCC	ACC	TGG	AAC	ATC		1211
Arg	Met	Asp	Val	Pro	Tyr	Pro	Ala	Arg	Ile	Ile	Ala	Thr	Trp	Asn	Ile		
		290					295					300					
CAC	GCC	CAG	TGG	CCC	GAG	TCC	CAG	GTG	CTC	ATC	GCC	AGA	CCC	AAC	GGC		1259
His	Ala	Gln	Trp	Pro	Glu	Ser	Gln	Val	Leu	Ile	Ala	Arg	Pro	Asn	Gly		
	305					310					315						
AAC	GGC	AAC	AAC	TGG	GGC	GTG	ACG	ATC	CAG	CAC	AAC	GGC	AAC	TGG	ACC		1307
Asn	Gly	Asn	Asn	Trp	Gly	Val	Thr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Asn	Trp	Thr		
320					325					330					335		
TGG	CCG	ACG	GTC	ACC	TGT	ACC	GCG	AAC	TGAGTTCCCG	CCCCCAAAGG							1354
Trp	Pro	Thr	Val	Thr	Cys	Thr	Ala	Asn									
					340												
TGGCGCGGCG	GCTCCCGGCC	G															1375

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 2: STA:

(i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 344 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEK ID NO: 2:

Met	Asn	Glu	Pro	Leu	Thr	Ile	Thr	Gln	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu		
1				5					10						15		
Gly	Leu	Arg	Arg	Ile	Val	Thr	Ser	Ala	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile		
			20					25					30				
Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	His	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Thr		
		35				40						45					
Gln	Asn	Gln	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Ser	Phe	Trp	Thr		
	50					55					60						
Asp	Ala	Pro	Gly	Thr	Val	Ser	Met	Thr	Leu	His	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr		
65					70					75					80		

Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp
85 90 95

Ser Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Asn Ala Ser Phe Asn Pro
100 105 110

Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu
115 120 125

Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly
130 135 140

Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr
145 150 155 160

Glu Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe
165 170 175

Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Gln Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile
180 185 190

Thr Ile Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly Met Asn Leu
195 200 205

Gly Ser His Asp Tyr Gln Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser
210 215 220

Gly Ser Ser Thr Val Ser Ile Ser Glu Gly Gly Asn Pro Gly Asn Pro
225 230 235 240

Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly Asn Pro Gly
245 250 255

Gly Gly Cys Val Ala Thr Leu Ser Ala Gly Gln Gln Trp Ser Asp Arg
260 265 270

Tyr Asn Leu Asn Val Ser Val Ser Gly Ser Asn Asn Trp Thr Val Arg
275 280 285

Met Asp Val Pro Tyr Pro Ala Arg Ile Ile Ala Thr Trp Asn Ile His
290 295 300

Ala Gln Trp Pro Glu Ser Gln Val Leu Ile Ala Arg Pro Asn Gly Asn
305 310 315 320

Gly Asn Asn Trp Gly Val Thr Ile Gln His Asn Gly Asn Trp Thr Trp
325 330 335

Pro Thr Val Thr Cys Thr Ala Asn
340

(2) INFORMAATIO SEQ ID NO: 3: STA:

(i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 1864 emäsparia
- (B) TYYPPI: nucleinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLI TYYPPI: DNA (genominen)

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:

- (A) ORGANISM: Actinomadura
- (B) KANTA: DSM43186

(ix) PIIRRE:

- (A) NIMI/AVAIN: CDS

(B) SIJAINTI: 194..1669

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK ID NO: 3:

TTCGGCAGCC TATTGACAAA TTTCGTGAAT GTTTCCCACA CTTGCTCTGC AGACGGCCCC	60
GCCGATCATG GGTGCACCGG TCGGCGGGAC CGTGCTCCGA CGCCATTCGG GGGTGTGCGC	120
CTGCGGGGCGC GGCCTCGATC CCGCGGGGAC TCCCGCGGTT CCCTTCCGT GTCCCTCTAA	180
TGGAGGCTCA GGC ATG GGC GTG AAC GCC TTC CCC AGA CCC GGA GCT CGG	229
Met Gly Val Asn Ala Phe Pro Arg Pro Gly Ala Arg	
345 350 355	
CGG TTC ACC GGC GGG CTG TAC CGG GCC CTG GCC GCG GCC ACG GTG AGC	277
Arg Phe Thr Gly Gly Leu Tyr Arg Ala Leu Ala Ala Ala Thr Val Ser	
360 365 370	
GTG GTC GGC GTG GTC ACG GCC CTG ACG GTG ACC CAG CCC GCC AGC GCC	325
Val Val Gly Val Val Thr Ala Leu Thr Val Thr Gln Pro Ala Ser Ala	
375 380 385	
GCG GCG AGC ACG CTC GCC GAG GGT GCC GCG CAG CAC AAC CGG TAC TTC	373
Ala Ala Ser Thr Leu Ala Glu Gly Ala Ala Gln His Asn Arg Tyr Phe	
390 395 400	
GGC GTG GCC ATC GCC GCG AAC AGG CTC ACC GAC TCG GTC TAC ACC AAC	421
Gly Val Ala Ile Ala Ala Asn Arg Leu Thr Asp Ser Val Tyr Thr Asn	
405 410 415 420	
ATC GCG AAC CGC GAG TTC AAC TCG GTG ACG GCC GAG AAC GAG ATG AAG	469
Ile Ala Asn Arg Glu Phe Asn Ser Val Thr Ala Glu Asn Glu Met Lys	
425 430 435	
ATC GAC GCC ACC GAG CCG CAG CAG GGG CGG TTC GAC TTC ACC CAG GCC	517
Ile Asp Ala Thr Glu Pro Gln Gln Gly Arg Phe Asp Phe Thr Gln Ala	
440 445 450	
GAC CGG ATC TAC AAC TGG GCG CGC CAG AAC GGC AAG CAG GTC CGC GGC	565
Asp Arg Ile Tyr Asn Trp Ala Arg Gln Asn Gly Lys Gln Val Arg Gly	
455 460 465	
CAC ACC CTG GCC TGG CAC TCG CAG CAG CCG CAG TGG ATG CAG AAC CTC	613
His Thr Leu Ala Trp His Ser Gln Gln Pro Gln Trp Met Gln Asn Leu	
470 475 480	
AGC GGC CAG GCG CTG CGC CAG GCG ATG ATC AAC CAC ATC CAG GGG GTC	661
Ser Gly Gln Ala Leu Arg Gln Ala Met Ile Asn His Ile Gln Gly Val	
485 490 495 500	
ATG TCC TAC TAC CGG GGC AAG ATC CCG ATC TGG GAC GTG GTG AAC GAG	709
Met Ser Tyr Tyr Arg Gly Lys Ile Pro Ile Trp Asp Val Val Asn Glu	
505 510 515	
GCG TTC GAG GAC GGA AAC TCC GGC CGC CGG TGC GAC TCC AAC CTC CAG	757
Ala Phe Glu Asp Gly Asn Ser Gly Arg Arg Cys Asp Ser Asn Leu Gln	
520 525 530	
CGC ACC GGT AAC GAT TGG ATC GAG GTC GCG TTC CGC ACC GCC CGC CAG	805
Arg Thr Gly Asn Asp Trp Ile Glu Val Ala Phe Arg Thr Ala Arg Gln	
535 540 545	
GGG GAC CCC TCG GCC AAG CTC TGC TAC AAC GAC TAC AAC ATC GAG AAC	853
Gly Asp Pro Ser Ala Lys Leu Cys Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Asn	
550 555 560	

TGG AAC GCG GCC AAG ACC CAG GCG GTC TAC AAC ATG GTG CCG GAC TTC	901
Trp Asn Ala Ala Lys Thr Gln Ala Val Tyr Asn Met Val Arg Asp Phe	
565 570 575 580	
AAG TCC CGC GGC GTG CCC ATC GAC TGC GTG GGC TTC CAG TCG CAC TTC	949
Lys Ser Arg Gly Val Pro Ile Asp Cys Val Gly Phe Gln Ser His Phe	
585 590 595	
AAC AGC GGT AAC CCG TAC AAC CCG AAC TTC CGC ACC ACC CTG CAG CAG	997
Asn Ser Gly Asn Pro Tyr Asn Pro Asn Phe Arg Thr Thr Leu Gln Gln	
600 605 610	
TTC GCG GCC CTC GGC GTG GAC GTC GAG GTC ACC GAG CTG GAC ATC GAG	1045
Phe Ala Ala Leu Gly Val Asp Val Glu Val Thr Glu Leu Asp Ile Glu	
615 620 625	
AAC GCC CCG GCC CAG ACC TAC GCC AGC GTG ATC CGG GAC TGC CTG GCC	1093
Asn Ala Pro Ala Gln Thr Tyr Ala Ser Val Ile Arg Asp Cys Leu Ala	
630 635 640	
GTG GAC CGC TGC ACC GGC ATC ACC GTC TGG GGT GTC CGC GAC AGC GAC	1141
Val Asp Arg Cys Thr Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Arg Asp Ser Asp	
645 650 655 660	
TCC TGG CGC TCG TAC CAG AAC CCG CTG CTG TTC GAC AAC AAC GGC AAC	1189
Ser Trp Arg Ser Tyr Gln Asn Pro Leu Leu Phe Asp Asn Asn Gly Asn	
665 670 675	
AAG AAG CAG GCC TAC TAC GCG GTG CTC GAC GCC CTG AAC GAG GGC TCC	1237
Lys Lys Gln Ala Tyr Tyr Ala Val Leu Asp Ala Leu Asn Glu Gly Ser	
680 685 690	
GAC GAC GGT GGC GGC CCG TCC AAC CCG CCG GTC TCG CCG CCG CCG GGT	1285
Asp Asp Gly Gly Gly Pro Ser Asn Pro Pro Val Ser Pro Pro Pro Gly	
695 700 705	
GGC GGT TCC GGG CAG ATC CCG GGC GTG GCC TCC AAC CCG TGC ATC GAC	1333
Gly Gly Ser Gly Gln Ile Arg Gly Val Ala Ser Asn Arg Cys Ile Asp	
710 715 720	
GTG CCG AAC GGC AAC ACC GCC GAC GGC ACC CAG GTC CAG CTG TAC GAC	1381
Val Pro Asn Gly Asn Thr Ala Asp Gly Thr Gln Val Gln Leu Tyr Asp	
725 730 735 740	
TGC CAC AGC GGT TCC AAC CAG CAG TGG ACC TAC ACC TCG TCC GGT GAG	1429
Cys His Ser Gly Ser Asn Gln Gln Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Gly Glu	
745 750 755	
TTC CGC ATC TTC GGC AAC AAG TGC CTG GAC GCG GGC GGC TCC AGC AAC	1477
Phe Arg Ile Phe Gly Asn Lys Cys Leu Asp Ala Gly Gly Ser Ser Asn	
760 765 770	
GGT GCG GTG GTC CAG ATC TAC AGC TGC TGG GGC GGC GCC AAC CAG AAG	1525
Gly Ala Val Val Gln Ile Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Ala Asn Gln Lys	
775 780 785	
TGG GAG CTC CGG GCC GAC GGC ACC ATC GTG GGC GTG CAG TCC GGG CTG	1573
Trp Glu Leu Arg Ala Asp Gly Thr Ile Val Gly Val Gln Ser Gly Leu	
790 795 800	
TGC CTC GAC GCG GTG GGT GGC GGC ACC GGC AAC GGC ACG CGG CTG CAG	1621
Cys Leu Asp Ala Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Gln	
805 810 815 820	
CTC TAC TCC TGC TGG GGC GGC AAC AAC CAG AAG TGG TCC TAC AAC GCC	1669
Leu Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Asn Asn Gln Lys Trp Ser Tyr Asn Ala	
825 830 835	

20				25				30							
Val	Thr	Ala	Leu	Thr	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ser	Thr
		35					40							45	
Leu	Ala	Glu	Gly	Ala	Ala	Gln	His	Asn	Arg	Tyr	Phe	Gly	Val	Ala	Ile
		50				55					60				
Ala	Ala	Asn	Arg	Leu	Thr	Asp	Ser	Val	Tyr	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Arg
		65				70					75				80
Glu	Phe	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Glu	Asn	Glu	Met	Lys	Ile	Asp	Ala	Thr
						85				90				95	
Glu	Pro	Gln	Gln	Gly	Arg	Phe	Asp	Phe	Thr	Gln	Ala	Asp	Arg	Ile	Tyr
			100							105				110	
Asn	Trp	Ala	Arg	Gln	Asn	Gly	Lys	Gln	Val	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Ala
		115					120							125	
Trp	His	Ser	Gln	Gln	Pro	Gln	Trp	Met	Gln	Asn	Leu	Ser	Gly	Gln	Ala
		130				135					140				
Leu	Arg	Gln	Ala	Met	Ile	Asn	His	Ile	Gln	Gly	Val	Met	Ser	Tyr	Tyr
		145				150				155					160
Arg	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Trp	Asp	Val	Val	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Asp
						165				170				175	
Gly	Asn	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Asp	Ser	Asn	Leu	Gln	Arg	Thr	Gly	Asn
			180							185				190	
Asp	Trp	Ile	Glu	Val	Ala	Phe	Arg	Thr	Ala	Arg	Gln	Gly	Asp	Pro	Ser
		195					200						205		
Ala	Lys	Leu	Cys	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Asn	Ile	Glu	Asn	Trp	Asn	Ala	Ala
		210				215					220				
Lys	Thr	Gln	Ala	Val	Tyr	Asn	Met	Val	Arg	Asp	Phe	Lys	Ser	Arg	Gly
		225				230				235					240
Val	Pro	Ile	Asp	Cys	Val	Gly	Phe	Gln	Ser	His	Phe	Asn	Ser	Gly	Asn
						245				250				255	
Pro	Tyr	Asn	Pro	Asn	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Gln	Phe	Ala	Ala	Leu
			260							265				270	
Gly	Val	Asp	Val	Glu	Val	Thr	Glu	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ala	Pro	Ala
		275					280							285	
Gln	Thr	Tyr	Ala	Ser	Val	Ile	Arg	Asp	Cys	Leu	Ala	Val	Asp	Arg	Cys
		290				295					300				
Thr	Gly	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	Val	Arg	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Arg	Ser
					310					315					320
Tyr	Gln	Asn	Pro	Leu	Leu	Phe	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Lys	Lys	Gln	Ala
						325				330				335	
Tyr	Tyr	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Asp	Asp	Gly	Gly
			340							345				350	
Gly	Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			355				360							365	
Gln	Ile	Arg	Gly	Val	Ala	Ser	Asn	Arg	Cys	Ile	Asp	Val	Pro	Asn	Gly
						375					380				

Asn Thr Ala Asp Gly Thr Gln Val Gln Leu Tyr Asp Cys His Ser Gly
 385 390 395 400

Ser Asn Gln Gln Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Gly Glu Phe Arg Ile Phe
 405 410 415

Gly Asn Lys Cys Leu Asp Ala Gly Gly Ser Ser Asn Gly Ala Val Val
 420 425 430

Gln Ile Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Ala Asn Gln Lys Trp Glu Leu Arg
 435 440 445

Ala Asp Gly Thr Ile Val Gly Val Gln Ser Gly Leu Cys Leu Asp Ala
 450 455 460

Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Gln Leu Tyr Ser Cys
 465 470 475 480

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 6: STÄ:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 434 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: UO8894

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK ID NO: 6:

Met Pro Ile Asn Val Met Pro Arg Pro Gly Ala Arg Lys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Arg Ala Leu Leu Ala Gly Ala Val Gly Leu Leu Thr Ala
 20 25 30

Ala Ala Ala Leu Val Ala Pro Ser Pro Ala Val Ala Ala Glu Ser Thr
 35 40 45

Leu Gly Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly Arg Tyr Phe Gly Thr Ala Ile
 50 55 60

Ala Ser Gly Arg Leu Asn Asp Ser Thr Tyr Thr Thr Ile Ala Asn Arg
 65 70 75 80

Glu Phe Asn Met Val Thr Ala Glu Asn Glu Met Lys Ile Asp Ala Thr
 85 90 95

Glu Pro Asn Arg Gly Gln Phe Asn Phe Ser Ser Ala Asp Arg Ile Tyr
 100 105 110

Asn Trp Ala Val Gln Asn Gly Lys Gln Val Arg Gly His Thr Leu Ala
 115 120 125

Trp His Ser Gln Gln Pro Gly Trp Met Gln Ser Leu Ser Gly Ser Ser
 130 135 140

Leu Arg Gln Ala Met Ile Asp His Ile Asn Gly Val Met Ala His Tyr
 145 150 155 160

Lys Gly Lys Ile Val Gln Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe Ala Asp
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gly Gly Arg Arg Asp Ser Asn Leu Gln Arg Thr Gly Asn
 180 185 190
 Asp Trp Ile Glu Val Ala Phe Arg Thr Ala Arg Asn Ala Asp Pro Asn
 195 200 205
 Ala Lys Leu Cys Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Asn Trp Asn Trp Ala
 210 215 220
 Lys Thr Gln Gly Val Tyr Met Asn Val Arg Asp Phe Lys Gln Arg Gly
 225 230 235 240
 Val Pro Ile Asp Cys Val Gly Phe Gln Ser His Phe Asn Ser Gly Ser
 245 250 255
 Pro Tyr Asn Ser Asn Phe Arg Thr Thr Leu Gln Asn Phe Ala Ala Leu
 260 265 270
 Gly Val Asp Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala Ser Pro
 275 280 285
 Thr Thr Tyr Ala Asn Val Val Asn Asp Cys Leu Ala Val Ser Arg Cys
 290 295 300
 Leu Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Arg Asp Thr Asp Ser Trp Arg Ser
 305 310 315 320
 Asp Gln Thr Pro Leu Leu Phe Asp Gly Asn Gly Asn Lys Lys Ala Ala
 325 330 335
 Tyr Ser Ala Val Leu Asn Ala Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Gly Gly
 340 345 350
 Gly Thr Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Pro Pro Ala Ser Asp Ala Gly
 355 360 365
 Thr Ile Lys Gly Val Gly Ser Gly Arg Cys Leu Asp Val Pro Asn Ala
 370 375 380
 Ser Thr Ser Asp Gly Val Gln Leu Gln Leu Trp Asp Cys His Gly Gly
 385 390 395 400
 Thr Asn Gln Gln Trp Thr Tyr Thr Asp Ser Gln Glu Leu Arg Val Tyr
 405 410 415
 Gly Asn Lys Cys Leu Asp Ala Ala Gly Thr Gly Asn Gly Thr Lys Val
 420 425 430
 Gln Ile

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 7: STÄ:

(i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 492 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: AM50

(xi) SEKVENSSEIKUVAUS: SEK ID NO: 7:

Met Gly Val Asn Ala Phe Pro Arg Pro Gly Ala Arg Arg Phe Thr Gly
 1 5 10 15
 Gly Leu Tyr Arg Ala Leu Ala Ala Ala Thr Val Ser Val Val Gly Val
 20 25 30
 Val Thr Ala Leu Thr Val Thr Gln Pro Ala Ser Ala Ala Ala Ser Thr
 35 40 45
 Leu Ala Glu Gly Ala Ala Gln His Asn Arg Tyr Phe Gly Val Ala Ile
 50 55 60
 Ala Ala Asn Arg Leu Thr Asp Ser Val Tyr Thr Asn Ile Ala Asn Arg
 65 70 75 80
 Glu Phe Asn Ser Val Thr Ala Glu Asn Glu Met Lys Ile Asp Ala Thr
 85 90 95
 Glu Pro Gln Gln Gly Arg Phe Asp Phe Thr Gln Ala Asp Arg Ile Tyr
 100 105 110
 Asn Trp Ala Arg Gln Asn Gly Lys Gln Val Arg Gly His Thr Leu Ala
 115 120 125
 Trp His Ser Gln Gln Pro Gln Trp Met Gln Asn Leu Ser Gly Gln Ala
 130 135 140
 Leu Arg Gln Ala Met Ile Asn His Ile Gln Gly Val Met Ser Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gly Lys Ile Pro Ile Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe Glu Asp
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gly Arg Arg Cys Asp Ser Asn Leu Gln Arg Thr Gly Asn
 180 185 190
 Asp Trp Ile Glu Val Ala Phe Arg Thr Ala Arg Gln Gly Asp Pro Ser
 195 200 205
 Ala Lys Leu Cys Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Asn Trp Asn Ala Ala
 210 215 220
 Lys Thr Gln Ala Val Tyr Asn Met Val Arg Asp Phe Lys Ser Arg Gly
 225 230 235 240
 Val Pro Ile Asp Cys Val Gly Phe Gln Ser His Phe Asn Ser Gly Asn
 245 250 255
 Pro Tyr Asn Pro Asn Phe Arg Thr Thr Leu Gln Gln Phe Ala Ala Leu
 260 265 270
 Gly Val Asp Val Glu Val Thr Glu Leu Asp Ile Glu Asn Ala Pro Ala
 275 280 285
 Gln Thr Tyr Ala Ser Val Ile Arg Asp Cys Leu Ala Val Asp Arg Cys
 290 295 300
 Thr Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Arg Asp Ser Asp Ser Trp Arg Ser
 305 310 315 320
 Tyr Gln Asn Pro Leu Leu Phe Asp Asn Asn Gly Asn Lys Lys Gln Ala
 325 330 335

Tyr Tyr Ala Val Leu Asp Ala Leu Asn Glu Gly Ser Asp Asp Gly Gly
 340 345 350
 Gly Pro Ser Asn Pro Pro Val Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Ser Gly
 355 360 365
 Gln Ile Arg Gly Val Ala Ser Asn Arg Cys Ile Asp Val Pro Asn Gly
 370 375 380
 Asn Thr Ala Asp Gly Thr Gln Val Gln Leu Tyr Asp Cys His Ser Gly
 385 390 395 400
 Ser Asn Gln Gln Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Gly Glu Phe Arg Ile Phe
 405 410 415
 Gly Asn Lys Cys Leu Asp Ala Gly Gly Ser Ser Asn Gly Ala Val Val
 420 425 430
 Gln Ile Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Ala Asn Gln Lys Trp Glu Leu Arg
 435 440 445
 Ala Asp Gly Thr Ile Val Gly Val Gln Ser Gly Leu Cys Leu Asp Ala
 450 455 460
 Val Gly Gly Gly Thr Gly Asn Gly Thr Arg Leu Gln Leu Tyr Ser Cys
 465 470 475 480
 Trp Gly Gly Asn Asn Gln Lys Trp Ser Tyr Asn Ala
 485 490

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 8: STA:

(i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 491 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: M64551

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEK ID NO: 8:

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

Glu Pro Gln Arg Gly Gln Phe Asn Phe Ser Ser Ala Asp Arg Val Tyr
 100 105 110
 Asn Trp Ala Val Gln Asn Gly Lys Gln Val Arg Gly His Thr Leu Ala
 115 120 125
 Trp His Ser Gln Gln Pro Gly Trp Met Gln Ser Leu Ser Gly Arg Pro
 130 135 140
 Leu Arg Gln Ala Met Ile Asp His Ile Asn Gly Val Met Ala His Tyr
 145 150 155 160
 Lys Gly Lys Ile Val Gln Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe Ala Asp
 165 170 175
 Gly Ser Ser Gly Ala Arg Arg Asp Ser Asn Leu Gln Arg Ser Gly Asn
 180 185 190
 Asp Trp Ile Glu Val Ala Phe Arg Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Ser
 195 200 205
 Ala Lys Leu Cys Tyr Asn Asp Tyr Asn Val Glu Asn Trp Thr Trp Ala
 210 215 220
 Lys Thr Gln Ala Met Tyr Asn Met Val Arg Asp Phe Lys Gln Arg Gly
 225 230 235 240
 Val Pro Ile Asp Cys Val Gly Phe Gln Ser His Phe Asn Ser Gly Ser
 245 250 255
 Pro Tyr Asn Ser Asn Phe Arg Thr Thr Leu Gln Asn Phe Ala Ala Leu
 260 265 270
 Gly Val Asp Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala Pro Ala
 275 280 285
 Ser Thr Tyr Ala Asn Val Thr Asn Asp Cys Leu Ala Val Ser Arg Cys
 290 295 300
 Leu Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Arg Asp Ser Asp Ser Trp Arg Ser
 305 310 315 320
 Glu Gln Thr Pro Leu Leu Phe Asn Asn Asp Gly Ser Lys Lys Ala Ala
 325 330 335
 Tyr Thr Ala Val Leu Asp Ala Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Gly Gly
 340 345 350
 Asp Ser Ser Glu Pro Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Gly Gly
 355 360 365
 Gln Ile Lys Gly Val Gly Ser Gly Arg Cys Leu Asp Val Pro Asp Ala
 370 375 380
 Ser Thr Ser Asp Gly Thr Gln Leu Gln Leu Trp Asp Cys His Ser Gly
 385 390 395 400
 Thr Asn Gln Gln Trp Ala Ala Thr Asp Ala Gly Glu Leu Arg Val Tyr
 405 410 415
 Gly Asp Lys Cys Leu Asp Ala Ala Gly Thr Ser Asn Gly Ser Lys Val
 420 425 430
 Gln Ile Tyr Ser Cys Trp Gly Gly Asp Asn Gln Lys Trp Arg Leu Asn
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Val Val Gly Val Gln Ser Gly Leu Cys Leu Asp Ala

	450		455		460														
Val	Gly	Asn	Gly	Thr	Ala	Asn	Gly	Thr	Leu	Ile	Gln	Leu	Tyr	Thr	Cys				
465					470					475					480				
Ser	Asn	Gly	Ser	Asn	Gln	Arg	Trp	Thr	Arg	Thr									
				485					490										

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 9: STÄ:

- (i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:
 (A) PITUUS: 14 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
 (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: #1696

(xi) SEKVENSIIKUVAUS: SEK ID NO: 9:

Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Ala	Ala	Gln	His	Asn	Arg
1				5						10			

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 10: STA:

- (i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:
 (A) PITUUS: 10 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
 (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: #1697

(xi) SEKVENSIIKUVAUS: SEK ID NO: 10:

Tyr	Phe	Gly	Val	Ala	Ile	Ala	Ala	Asn	Arg
1			5					10	

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 11: STA:

- (i) SEKVENSIN TUNNUSMERKIT:
 (A) PITUUS: 12 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
 (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: #1698

- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 3
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 3 voi olla Leu tai Asn"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 4
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 4 voi olla Val tai Ser"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 5
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 5 voi olla Tyr tai Val"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 6
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 6 voi olla Asn tai Thr"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 7
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 7 voi olla Met tai Ala"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 8
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 8 voi olla Val tai Glu"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 9
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 9 voi olla Asn tai Xaa"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 10
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 10 voi olla Glu tai Xaa"
- (ix) PIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Peptidi
(B) PAIKKA: 11
(D) MUU INFORMAATIO: /huom= "Paikka 11 voi olla Met tai Xaa"

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEK ID NO: 13:

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 14: STA:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 12 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: #1704

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEK ID NO: 14:

Glu Phe Asn Ser Val Thr Ala Glu Asn Glu Met Lys
 1 5 10

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 15: STA:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 14 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:

- (A) ORGANISMI: S. lividans

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

- (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: XlnA

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEK ID NO: 15:

Ala Glu Ser Thr Leu Gly Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly Arg
 1 5 10

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 16: STA:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 10 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) SÄIKEISYYS: ei relevantti
- (D) TOPOLOGIA: ei relevantti

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:

(A) ORGANISMI: Actinomadura sp. DSM43186

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: #1703as

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEK ID NO: 21:

ACCATRTRT ANACNA

16

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 22: STA:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 17 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:

(A) ORGANISMI: Actinomadura sp. DSM43186

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: #1704as

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEK ID NO: 22:

TTCATYTCRT TYTCNGC

17

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 23: STA:

(i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 39 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iv) ANTI-SENSE: KYLLÄ

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE

(A) ORGANISMI: S. lividans

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:

(A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: xlnA 331-369as

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK ID NO: 23:

CGTGAGTTCA ACATGGTGAC GGCCGAGAAC GAGATGAAG

39

(2) INFORMAATIO SEQ ID NO: 24: STÄ:

- (i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:
 (A) PITUUS: 28 emäsparia
 (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

- (vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
 (A) ORGANISMI: S. lividans

(viii) SIJAINTI GENOMISSA
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: xlnA 257-284s

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK ID NO: 24:

AGAGCGGCCG CTACTTCGGC ACCGCCAT

28

(2) INFORMAATIO SEK ID NO: 25: STÄ:

- (i) SEKVENSSIN TUNNUSMERKIT:
 (A) PITUUS: 32 emäsparia
 (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genominen)

(iv) ANTI-SENSE: KYLLÄ

- (vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
 (A) ORGANISMI: S. lividans

(viii) SIJAINTI GENOMISSA:
 (A) KROMOSOMI/SEGMENTTI: xlnA 530-561as

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEK ID NO: 25:

CACGCCGTTG ATGTGGTCGA TCATCGCCTG GC

32

Patenttivaatimukset

1. Eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että se koodaa *Actinomadura flexuosan* (DSM 43186) ksylanaasin aminohapposekvenssiä, joka sisältää kuvan 13 mukaisen aminohapposekvenssin tai aminohapposekvenssin, joka on vähintään 85 %:sti homologinen mainitun kuvan 13 mukaisen aminohapposekvenssin kanssa ja jolla on ksylanolyttinen aktiivisuus.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että se sisältää kuvan 13 mukaisen nukleinihapposekvenssin.
3. Eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että se koodaa *Actinomadura flexuosan* (DSM 43186) ksylanaasin aminohapposekvenssiä, joka sisältää kuvan 14 mukaisen aminohapposekvenssin tai aminohapposekvenssin, joka on vähintään 85 %:sti homologinen mainitun kuvan 14 mukaisen aminohapposekvenssin kanssa ja jolla on ksylanolyttinen aktiivisuus.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että se sisältää kuvan 14 mukaisen nukleinihapposekvenssin.
5. Eristetty DNA-fragmentti, **tunnettu** siitä, että se on peräisin plasmidista pALK923 (DSM 9322), pALK938 (DSM 9899), pALK939 (DSM 9900), pALK940 (DSM 9901), pALK941 (DSM 9902) tai pALK1056 (DSM 9903), joka koodaa *Actinomadura flexuosan* (DSM 43186) 35 kDa ksylanaasia.
6. Eristetty DNA-fragmentti **tunnettu** siitä, että se on peräisin plasmidista pALK927 (DSM 9447) tai plasmidista pALK928 (DSM 9448), joka koodaa *Actinomadura flexuosan* (DSM 43186) 50 kDa ksylanaasia.
7. Yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa *Actinomadura flexuosan* (DSM 43186) ksylanaasin aminohapposekvenssiä ja mainittu

aminohapposekvenssi sisältää kuvan 13 mukaisen aminohapposekvenssin tai kuvan 13 mukaisen aminohapposekvenssin kanssa vähintään 85 %:sti homologisen aminohapposekvenssin, jolla on ksylanolyttinen aktiivisuus.

8. Yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186) ksylanaasin aminohapposekvenssiä ja mainittu aminohapposekvenssi sisältää kuvan 14 mukaisen aminohapposekvenssin tai kuvan 14 mukaisen aminohapposekvenssin kanssa vähintään 85 %:sti homologinen aminohapposekvenssin, jolla on ksylanolyttinen aktiivisuus.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa kuvan 13 mukaista aminohapposekvenssiä.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää DNA-sekvenssin, joka koodaa kuvan 14 mukaista aminohapposekvenssiä.

11. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että mainittu DNA-sekvenssi on kuvan 13 mukainen.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että mainittu DNA-sekvenssi on kuvan 14 mukainen.

13. Patenttivaatimuksen 7 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää DNA-fragmentin plasmidista pALK923 (DSM 9322), pALK938 (DSM 9899), pALK939 (DSM 9900), pALK940 (DSM 9901), pALK941 (DSM 9902) tai pALK1056 (DSM 9903), joka koodaa *Actinomadura flexuosa* (DSM43186) 35 kDa ksylanaasia.

14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää sellaisen fragmentin plasmidista pALK927 (DSM 9447) tai plasmidista pALK928 (DSM 9448), joka koodaa *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186) 50 kDa ksylanaasia.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 7-14 mukainen yhdistelmävektori, joka sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-6 mukaisen eristetyn DNA-sekvenssin, **tunnettu** siitä, että mainittu eristetty DNA-sekvenssi kytketään toiminnallisesti homologiseen ksylanaasipromoottoriin tai *Trichoderma reesei* *cbhl*-promoottoriin.
16. Yhdistelmäisäntä, **tunnettu** siitä, että mainittu isäntä on *Trichoderma spp.* ja se on transformoitu minkä tahansa patenttivaatimuksen 7-15 mukaisella yhdistelmävektorilla.
17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdistelmäisäntä, **tunnettu** siitä, että mainittu isäntä on *Trichoderma reesei*.
18. Kasvualusta, **tunnettu** siitä, että se sisältää *Trichoderma*-yhdistelmäisännän viljelyssä eritettyjä 35 kDa tai 50 kDa ksylanaasientsyymejä, joka yhdistelmäisäntä on saatu transformoimalla minkä tahansa patenttivaatimuksen 7-15 mukaisella yhdistelmävektorilla.
19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen kasvualusta, **tunnettu** siitä, että mainittu isäntä on *T. reesei*.
20. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 18-19 mukainen kasvualusta, **tunnettu** siitä, että 35 kDa tai 50 kDa ksylanaasin aminohapposekvenssiä koodaava DNA kytketään toiminnallisesti homologiseen ksylanaasipromoottoriin tai *T. reesei* *cbhl*-promoottoriin.
21. Entsyymivalmiste, **tunnettu** siitä, että se on saatu kasvualustasta ultrasuodatuksella, kuivauksella, haihdutuksella, saostuksella, immobilisaatiolla tai millä tahansa "downstream"-käsittelymenetelmällä, mainitun kasvualustan sisältäessä *Trichoderma*-yhdistelmäisännän viljelyn aikana eritettyjä 35 kDa tai 50 kDa ksylanaasientsyymejä, joka yhdistelmäisäntä on saatu transformoimalla minkä tahansa patenttivaatimuksen 7-15 mukaisella yhdistelmävektorilla.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen entsyymivalmiste, **tunnettu** siitä, että mainittu yhdistelmäisäntä on *T. reesei*.
23. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 21-22 mukainen entsyymivalmiste, **tunnettu** siitä, että 35 kDa tai 50 kDa ksylanaasin aminohapposekvenssiä koodaava DNA on toiminnallisesti kytketty homologiseen ksylanaasipromoottoriin tai *T. reesein cbhl*-promoottoriin.
24. Biovalkaisumenetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitussa menetelmässä massaan lisätään kasvualustaa, mikä sisältää *Trichoderma*-yhdistelmäisännän viljelyn aikana eritettäviä 35 kDa tai 50 kDa ksylanaasientsyymejä, joka yhdistelmäisäntä on saatu transformoimalla minkä tahansa patenttivaatimuksen 7-15 mukaisella yhdistelmävektorilla.
25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lämpötila on 50-80 °C, edullisesti 70 °C.
26. Menetelmä kasvibiomassan kemialliseksi käsittelemiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmässä mainittu biomassa saatetaan kosketukseen kasvualustan kanssa yli 50 °C:n lämpötilassa ja yli 6,0:n pH-arvossa ja mainittu kasvualusta sisältää *Trichoderma*-yhdistelmäisännän viljelyn aikana eritettyjä 35 kDa tai 50 kDa ksylanaasientsyymejä, joka yhdistelmäisäntä on saatu transformoimalla minkä tahansa patenttivaatimuksen 7-15 mukaisella yhdistelmävektorilla.
27. Biovalkaisumenetelmä, **tunnettu** siitä, että massaan lisätään minkä tahansa patenttivaatimuksen 18-23 mukaista kasvualustaa tai entsyymivalmistetta.
28. Menetelmä kasvibiomassan kemialliseksi käsittelemiseksi, **tunnettu** siitä, että mainittu biomassa saatetaan kosketukseen minkä tahansa patenttivaatimuksen 18-23 mukaisen kasvualustan tai entsyymivalmisteen kanssa yli 50 °C:n lämpötilassa, edullisesti 70 °C:n lämpötilassa.

Patentkrav

1. Ett isolerat DNA, **kännetecknat** av, att det kodar en aminosyresekvens för xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186), vilken sekvens innehåller en aminosyresekvens enligt figur 13 eller en aminosyresekvens, som till minst 85 % är homolog med den nämnda aminosyresekvensen enligt figur 13, och som är xylanolytiskt aktiv.
2. Isolerat DNA enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av, att den innehåller en nukleinsyresekvens enligt figur 13.
3. Ett isolerat DNA, **kännetecknat** av, att det kodar en aminosyresekvens för xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186), vilken sekvens innehåller en aminosyresekvens enligt figur 14 eller en aminosyresekvens, som till minst 85 % är homolog med den nämnda aminosyresekvensen enligt figur 14, och som är xylanolytiskt aktiv.
4. Isolerat DNA enligt patentkrav 3, **kännetecknat** av, att den innehåller en nukleinsyresekvens enligt figur 14.
5. Ett isolerat DNA-fragment, **kännetecknat** av, att det härstammar från en plasmid pALK923 (DSM9322), pALK938 (DSM 9899), pALK939 (DSM 9900), pALK940 (DSM 9901), pALK941 (DSM 9902) eller pALK1056 (DSM9903), som kodar 35 kDa xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186).
6. Ett isolerat DNA-fragment, **kännetecknat** av, att det härstammar från en plasmid pALK927 (DSM 9447) eller en plasmid pALK928 (DSM 9448), som kodar 50 kDa xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186).
7. En rekombinantvector, **kännetecknad** av, att den innehåller en DNA-sekvens, som kodar en aminosyresekvens för xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186),

vilken nämnda aminosyresekvensen innehåller en aminosyresekvens enligt figur 13 eller en aminosyresekvens, som till minst 85 % är homolog med aminosyresekvensen enligt figur 13, och som är xylanolytiskt aktiv.

8. En rekombinantvektor, **kännetecknad** av, att den innehåller en DNA-sekvens, som kodar en aminosyresekvens för xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186), vilken nämnda aminosyresekvensen innehåller en aminosyresekvens enligt figur 14 eller en aminosyresekvens, som till minst 85 % är homolog med aminosyresekvensen enligt figur 14, och som är xylanolytiskt aktiv.

9. Rekombinantvektor enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av, att den innehåller en DNA-sekvens, som kodar en aminosyresekvens enligt figur 13.

10. Rekombinantvektor enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av, att den innehåller en DNA-sekvens, som kodar en aminosyresekvens enligt figur 14.

11. Rekombinantvektor enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av, att den nämnda DNA-sekvensen är förenlig med figur 13.

12. Rekombinantvektor enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av, att den nämnda DNA-sekvensen är förenlig med figur 14.

13. Rekombinantvektor enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av, att den innehåller ett DNA-fragment ur en plasmid pALK923 (DSM9322), pALK938 (DSM 9899), pALK939 (DSM 9900), pALK940 (DSM 9901), pALK941 (DSM 9902) eller pALK1056 (DSM9903), vilket kodar 35 kDa xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186).

14. Rekombinantvektor enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av, att den innehåller ett sådant fragment ur en plasmid pALK927 (DSM 9447) eller en plasmid pALK928 (DSM 9448), vilket kodar 50 kDa xylanas hos *Actinomadura flexuosa* (DSM 43186).

15. Rekombinantvektor enligt något av patentkraven 7 till 14, som innehåller en isolerad DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1 till 6, **kännetecknad** av, att den nämnda isolerade DNA-sekvensen funktionsdugligt kopplas till en homolog xylanaspromotor eller till en *Trichoderma reesei cbh1*-promotor.

16. En rekombinantvärd, **kännetecknad** av, att nämnda värd är *Trichoderma spp.* och att den har transformerats med en rekombinantvektor enligt något av patentkraven 7 till 15.

17. Rekombinantvärd enligt patentkrav 16, **kännetecknad** av, att den nämnda värden är *Trichoderma reesei*.

18. Ett odlingsmedium, **kännetecknat** av, att det innehåller i en kultur av en *Trichoderma*-rekombinantvärd utsöndrat 35kDa eller 50 kDa xylanasenzym, där rekombinantvärden erhållits genom transformation med en rekombinantvektor enligt något av patentkraven 7 till 15.

19. Odlingsmediet enligt patentkrav 18, **kännetecknat** av, att den nämnda värden är *T. reesei*.

20. Odlingsmediet enligt något av patentkraven 18 till 19, **kännetecknat** av, att det DNA som kodar aminosyresekvensen för 35 kDa eller 50 kDa xylanas är funktionsdugligt kopplat till en homolog xylanaspromotor eller till en *Trichoderma reesei cbh1*-promotor.

21. Ett enzympreparat, **kännetecknat** av, att det erhållits ur ett odlingsmedium genom ultrafiltrering, torkning, indunstning, utfällning, immobilisering eller genom vilket som helst "downstream"-behandlingsförfarande, varvid odlingsmediet innehåller 35 kDa eller 50 kDa xylanasenzym som utsöndrats i en kultur av en *Trichoderma*-rekombinantvärd, vilken rekombinantvärd erhållits genom transformation med en rekombinantvektor enligt något av patentkraven 7 till 15.

22. Enzympreparat enligt patentkrav 21, **kännetecknat av**, att den nämnda rekombinantvärdet är *T. reesei*.
23. Enzympreparat enligt något av patentkraven 21 till 22, **kännetecknat av**, att det DNA som kodar aminosyresekvensen för 35 kDa eller 50 kDa xylanas är funktionsdugligt kopplat till en homolog xylanaspromotor eller till en *T. reesei cbh1*-promotor.
24. Ett biologiskt blekningsförfarande, **kännetecknat av**, att man i massa tillför ett odlingsmedium som innehåller 35 kDa eller 50 kDa xylanasenzym, som utsöndrats i en kultur av en *Trichoderma*-rekombinantvärd, vilken rekombinantvärd erhållits genom transformation med en rekombinantvektor enligt något av patentkraven 7 till 15.
25. Förfarande enligt patentkrav 24, **kännetecknat av**, att temperaturen är 50 till 80 °C, fördelaktigt 70 °C.
26. Ett förfarande för kemisk behandling av växtbiomassa, **kännetecknat av**, att man vid förfarandet sammanför biomassan med ett odlingsmedium vid en temperatur högre än 50 °C och vid ett pH-värde högre än 6,0 och nämnda odlingsmediet innehåller 35 kDa eller 50 kDa xylanasenzym, som utsöndrats i en kultur av en *Trichoderma*-rekombinantvärd, vilken rekombinantvärd erhållits genom transformation med en rekombinantvektor enligt något av patentkraven 7 till 15.
27. Ett biologiskt blekningsförfarande, **kännetecknat av**, att man i massa tillför ett odlingsmedium eller ett enzympreparat enligt något av patentkraven 18 till 23.
28. Ett förfarande för kemisk behandling av växtbiomassa, **kännetecknat av**, att man sammanför nämnda biomassa med ett odlingsmedium eller enzympreparat enligt något av patentkraven 18 till 23 vid en temperatur högre än 50 °C, fördelaktigt vid en temperatur om 70 °C.

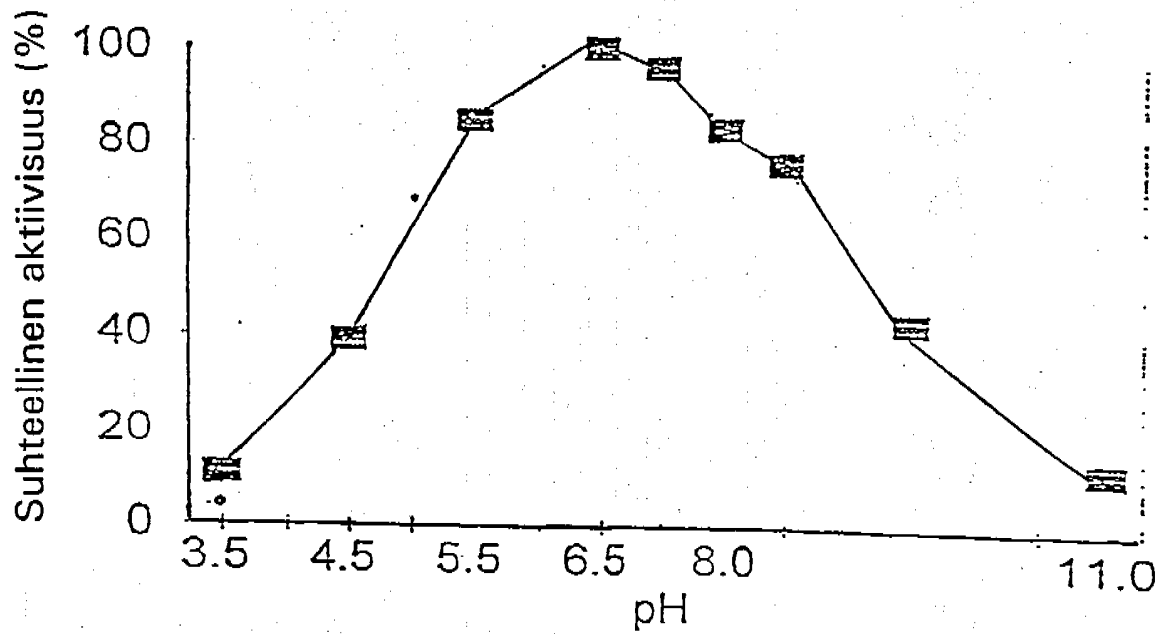
pH-opt: DSM43186

FIGURE 1

T-Stab: DSM43186

60°C

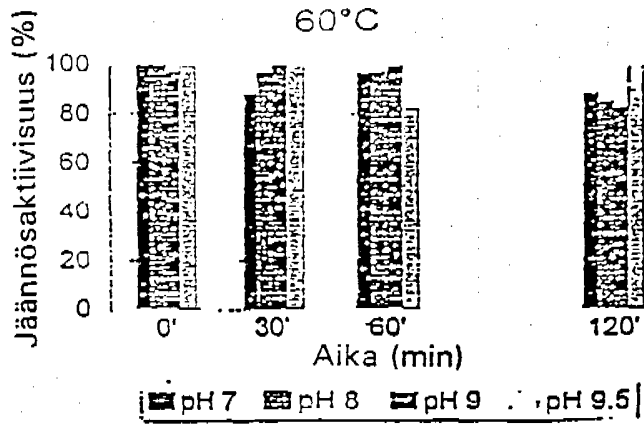


Figure 2

T-stab: DSM43186

70°C

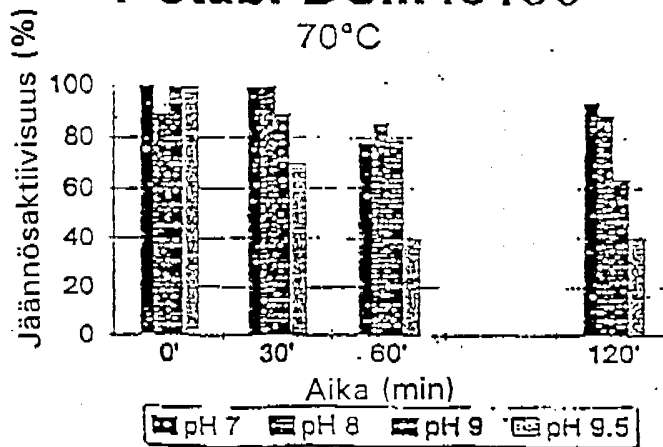


Figure 2A

T-stab: DSM43186

80°C

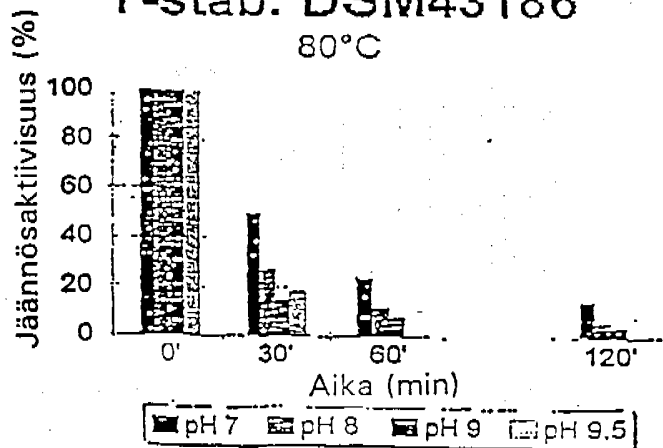


Figure 2B

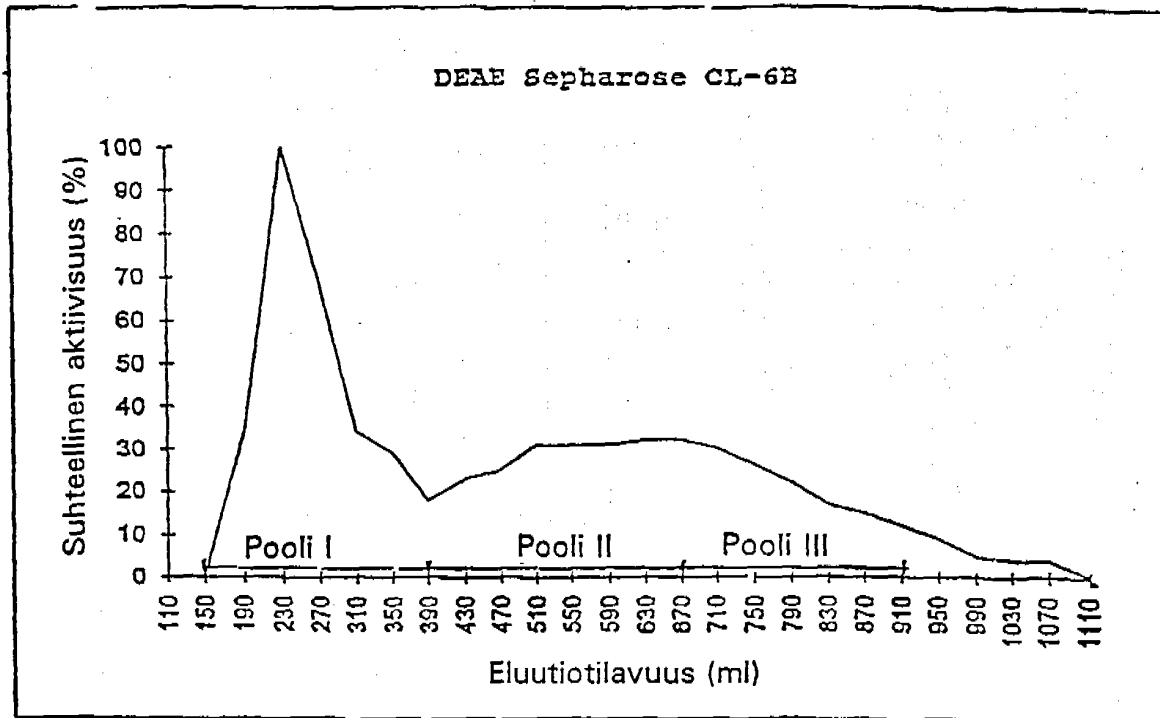


FIGURE 3

FIGURE 4

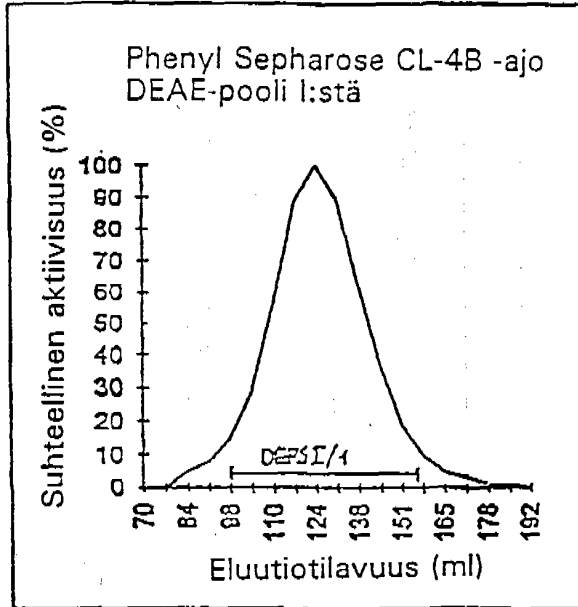


FIGURE 4A

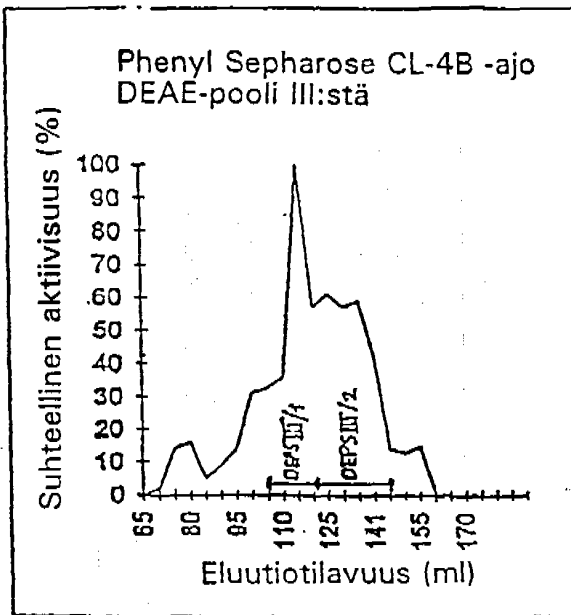
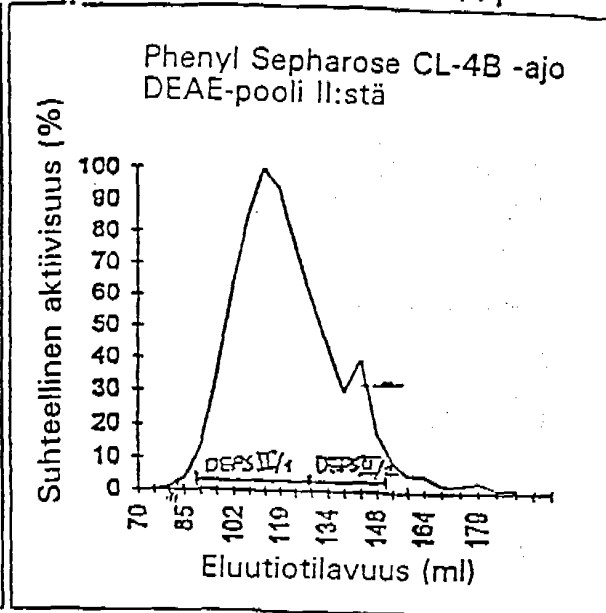
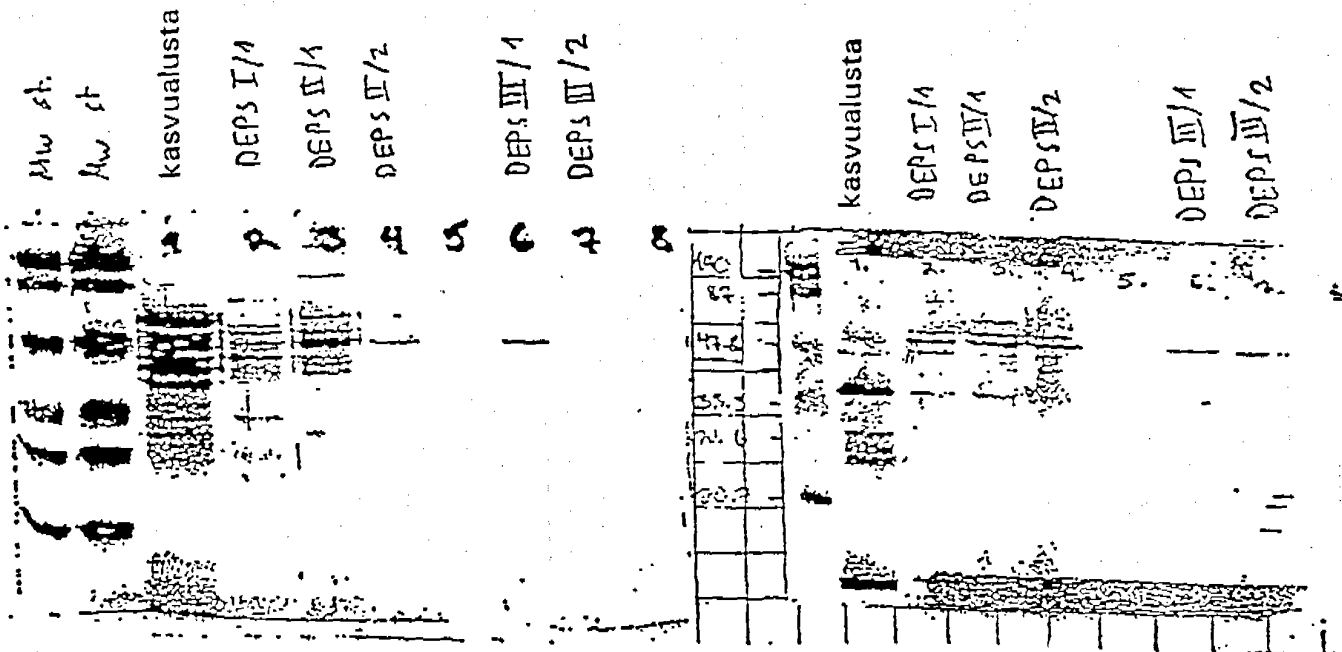


FIGURE 4B



COOMASSIE

FIGURE 5

WESTERN

FIGURE 5A

FIGURE 6

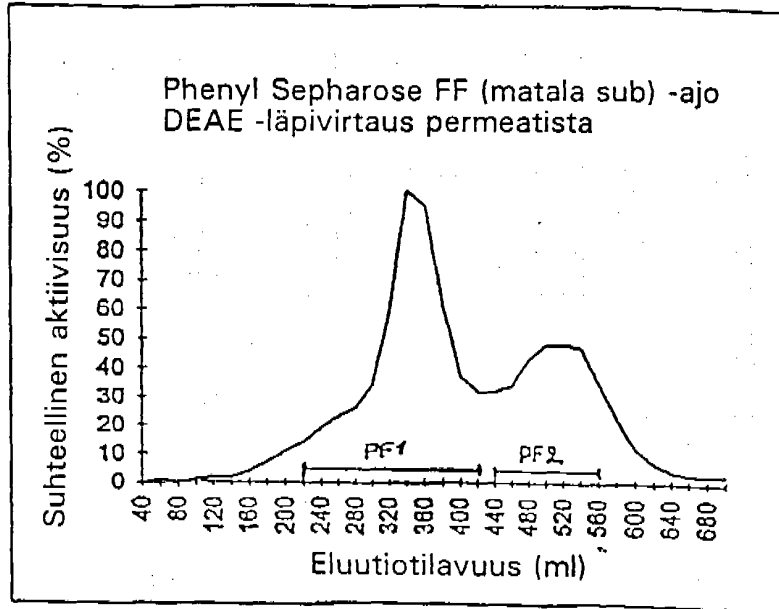
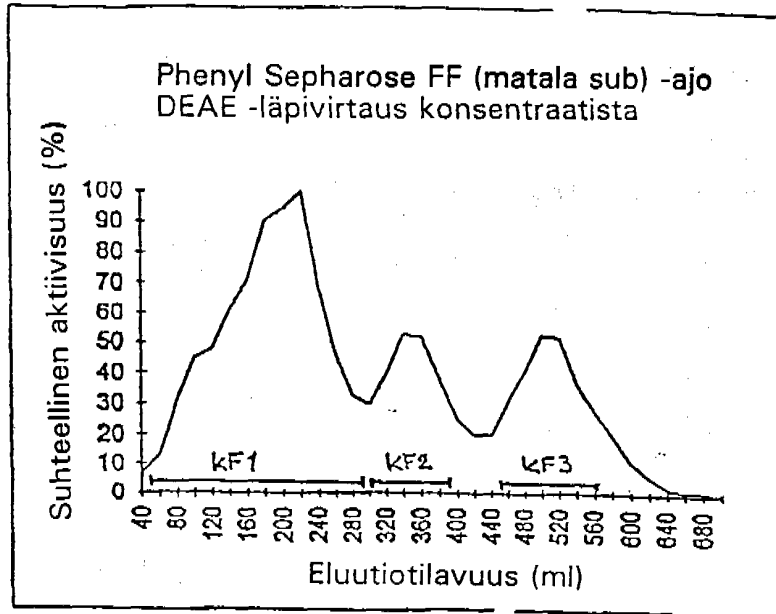


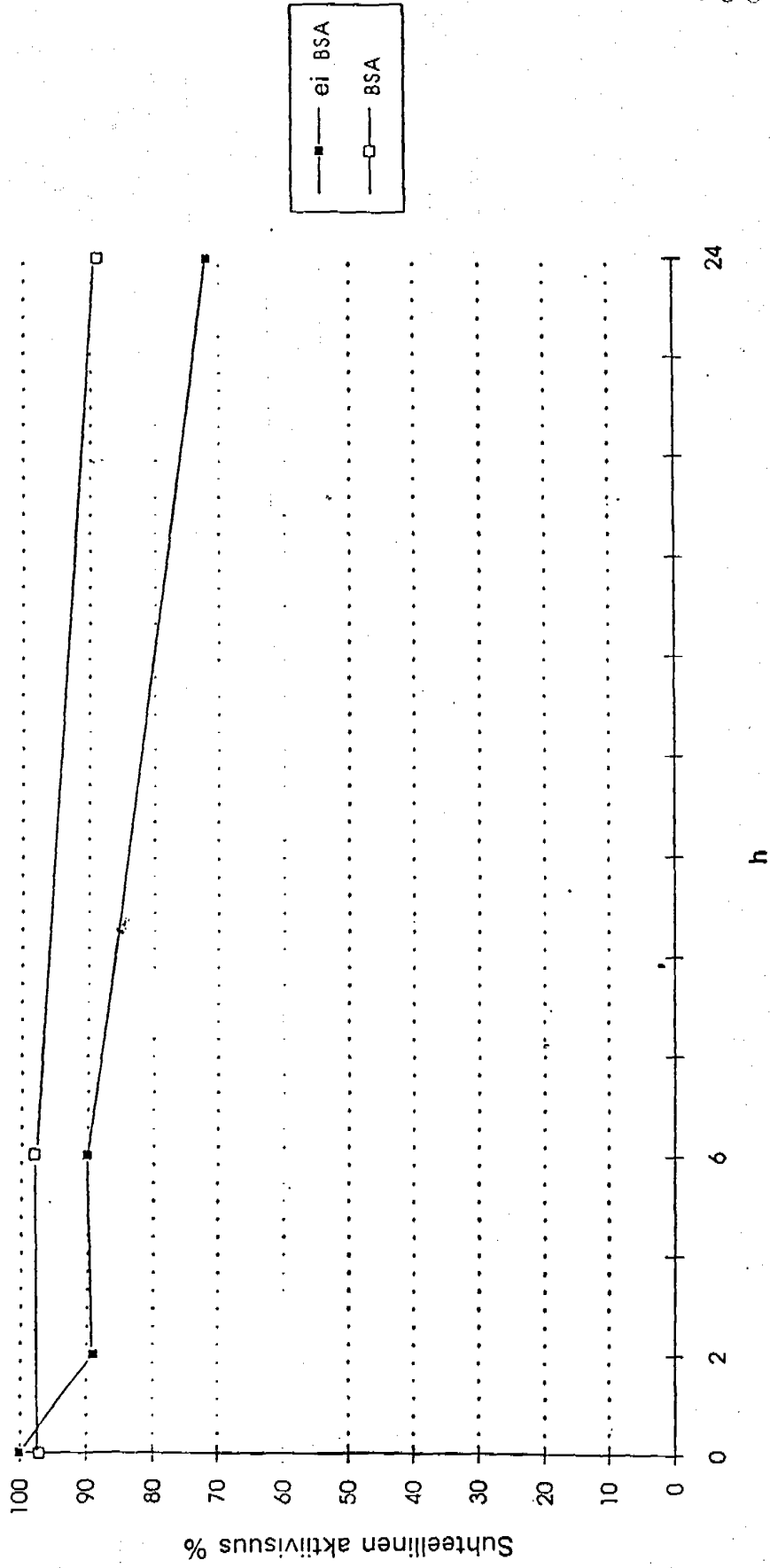
FIGURE 6A



31003

34064 00000

50 kDa ksylanaasi



118010

Figure 9.

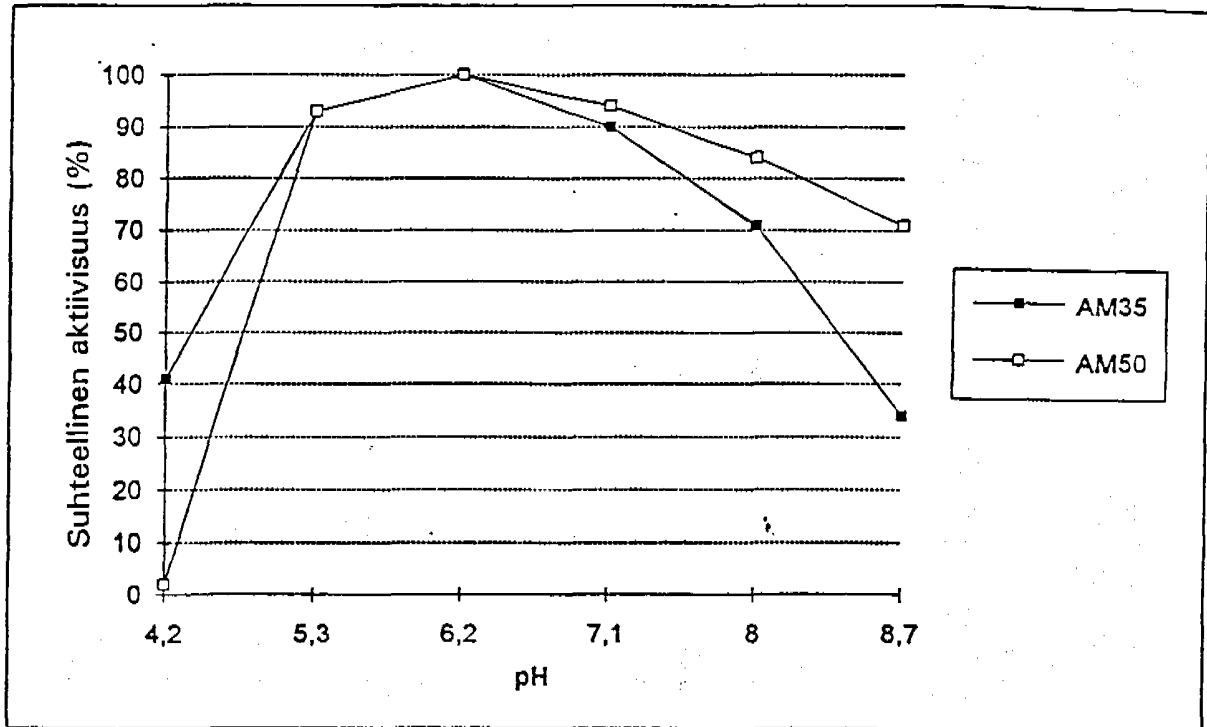


FIGURE 10C

118010

35 kDa ksylanaasi, 80 oC

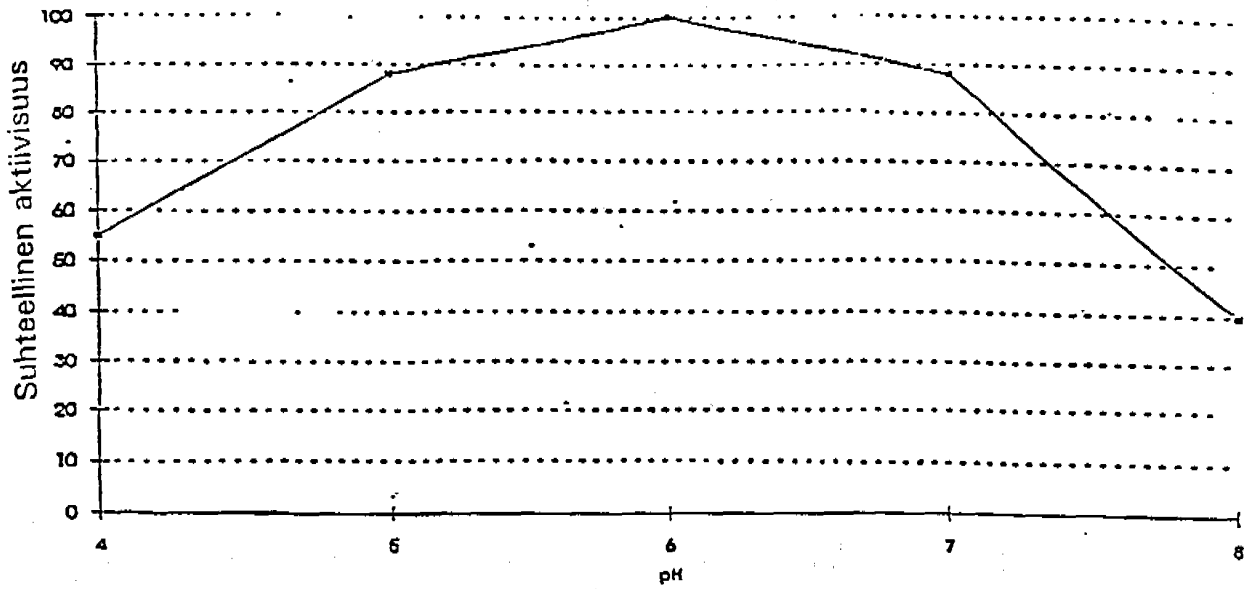


FIGURE 10A

50 kDa ksylanaasi

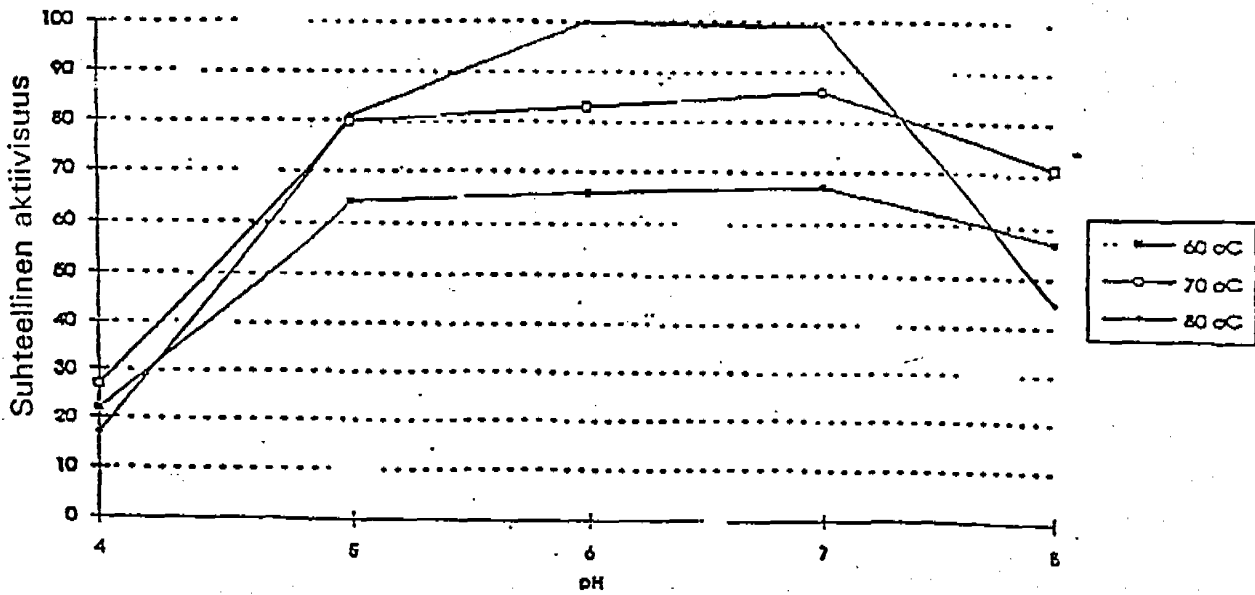


FIGURE 10B

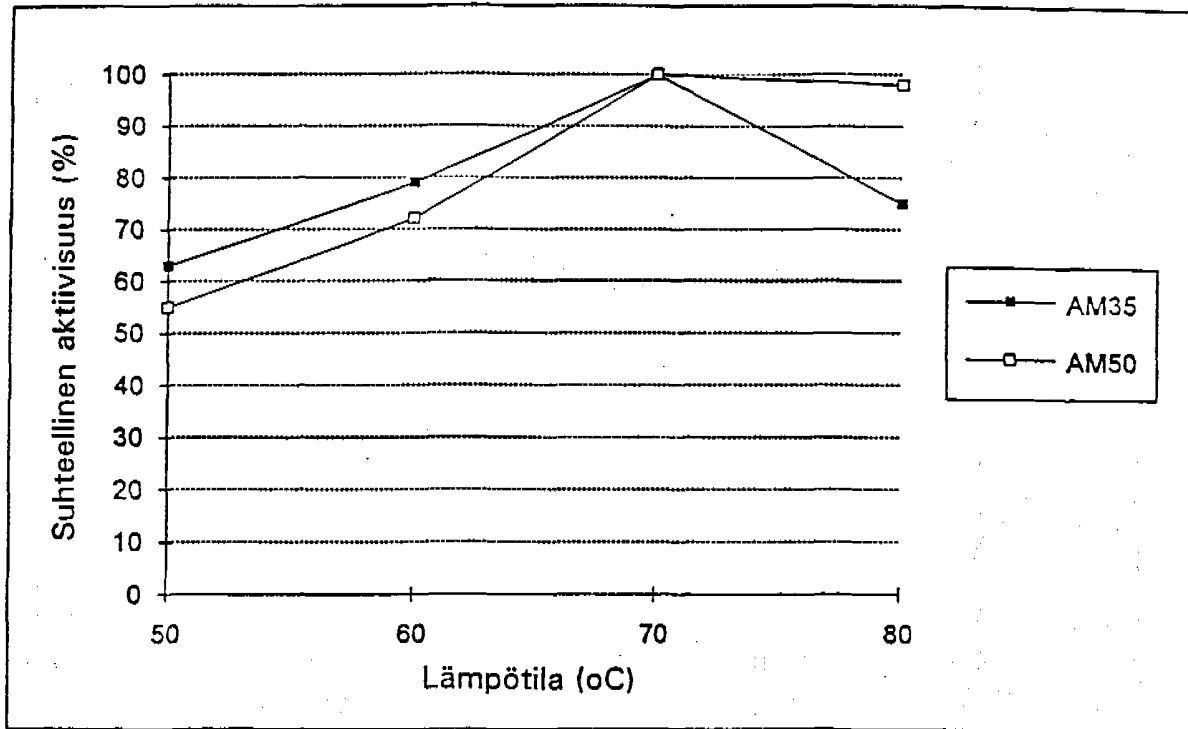


FIGURE 11

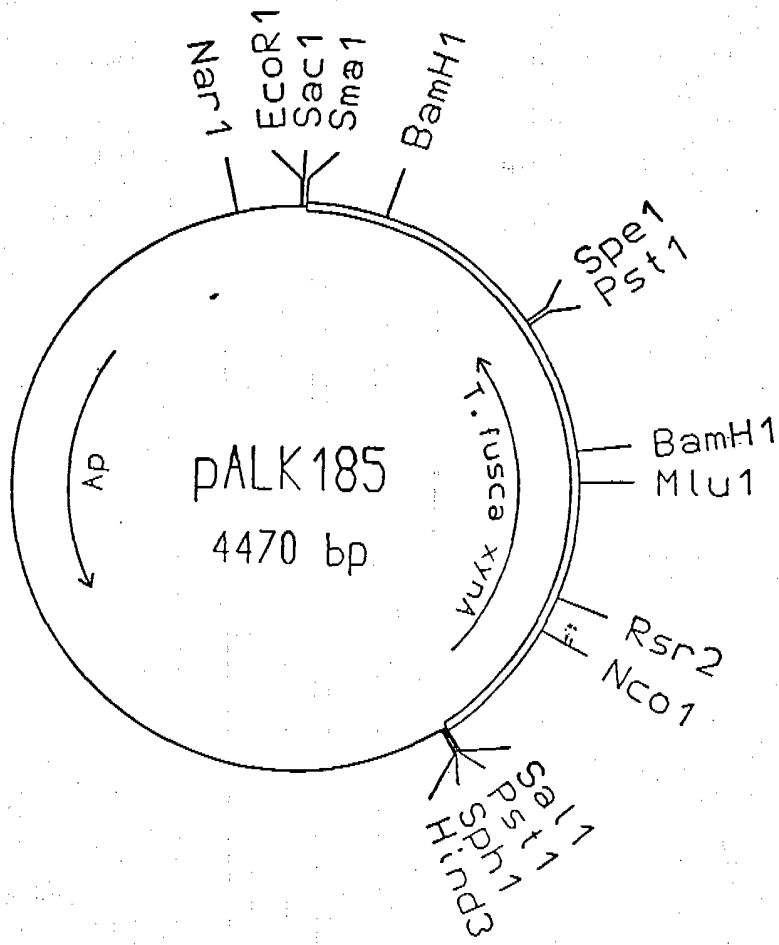


Figure 12.

GENE

DATA

CCCGGGTATTCATGTGAATGATTAGCAACAGTTATGTTACGGAGATATTTCTGAGAGTGTGACAGGTCGTGAAGTCGGTCCGATACCTTCGAGCTAGCTCCGATAGTTT 110
 TCGATACGCCGGCACATCGAGCACGTCGGACGAGTCACGGCCACGTCGGTTTTCCGCCGCACGCCCGCAGAGCGGGCCGAGAACCCCGCGTGTCCGGCCGATCGGTG 220
 CCGGTCCGTCGTTCCGCCCGGACCGCGCGGGTCCGCGACAGCCAGCCCCATCGGCCCTTCTCAGGAGGAAGCCGTACATGAACGAACCCCTCACCATCACGCGAGG 330
 CCAGGCCCGCAGAGCCCTCGGCCTCCGGCCGATCGTCACCAGTGCCTTCGCCCTGGCACTCGCCATCGCCGGTGCCTGCTGCCCGGCACGGCCACGCCGACACCACC 440
 H N E P L T I T Q
 A R R R R R L G L R R I V T S A F A L A L A I A G A L L P G T A H A D T T
 ATCACCAGAACCGAGCCGGTACGACAACGGCTACTTCTACTCGTTCGGACCGACGCCCGGGACCGTCTCCATGACCCTCCACTCGGGCGGACGCTACAGCACCTC 550
 I T O N O T G Y O N G Y F Y S F W T D A P G T V S M T L H S G G S Y S T S
 GTGGCGAACACCGGAACTTCGTCGCCCGCAAGGGTGGTCCACCGGGGACGGCGGACCGTGACCTACAACGCCCTCTTCAACCCGTCGGGTAACGGCTACCTCACCG 660
 W R N T G N F V A G K G W S T G G R R I V T Y N A S F N P S G N G Y L T
 TCTACGGCTGGACCGAACCCTCGTCGAGTACTACATCGTCGAGAGCTGGGGCACCTACCGGCCACCGGCACCTACAAGGGCACCGTCACCACCGCGGGGAACG 770
 L Y G W T R N P L V E Y Y I V E S W G T Y R P T G T Y K G T V T T D G G T
 TACGACATCTACGAGACCTGGCGGTACAACCGCCGTCATCGAGGGCACCGGACCTCCAGCAGTTCGGAGCGTCCGGCAGCAGAGCGGACCGGACCGGACCATCAC 880
 Y D I Y E T W R Y N A P S I E G T R T F Q Q F W S V R Q Q K R T S G T I T
 CATCGGCAACCACTTCGACCGCTGGGCCCGCGCGGCATGAACCTGGGCAGCCAGACTACCAGATCATGGCGACCGAGGGCTACCAGAGCAGCGGTAGCTCCACCGTCT 990
 I G N H F D A W A R A G H N L G S H D Y Q I H A T E G Y Q S S G S S T V
 CCATCAGCGAGGGTGGCAACCCCGCAACCCGGTAACCCCGCAACCCCGCAACCCCGGTAACCCCGGTAACCCCGCGGTGGCTGCGTCGCGACCTCTCCGCCGGC 1100
 S I S E G G N P G N P G N P G N P G N P G N P G N P G G G C V A T L S A G
 CAGCAGTGGAGCGACCGCTACAACCTCAACGTCTCGGTGAGCGGCTCGAACAACCTGGACCGTCCGGATGGACGTCGCCCTACCCGGCCCGCATCATCGCCACCTGGAACAT 1210
 Q Q W S D R Y N L N V S V S G S N N W T V R M D V P Y P A R I I A T W N I
 CCAGCCCAGTGGCCCGAGTCCCAGGTGCTCATCGCCAGACCCAACGGCAACGGCAACAACCTGGGGCGTGACGATCCAGCACAACGGCAACTGGACCTGGCCGACGGTCA 1320
 H A Q W P E S Q V L I A R P N G N G N N W G V T I Q H N G N W T W P T V
 CCTGTACCCGCAACTGAGTTCCEGCCCCAAAGGTGGCGCGGGGCTCCCGGCCG

1375

T C T A N

Figure 13,



TCGGCAGCCTATTGACAAATTCGTGAATGTTCCACACTTGCTCGCAGACGGCCCCCGCATCATGGTGCACCGGTCGGCGGGACCGTGTCCGACGCCATTCCG 110
 GGGTGTCCGCTCGGGGCGGGCGTCCGATCCCGGGGACTCCCGCGGTCCCTTTCCGTGTCCCTCTAATGGAGGCTCAGGCATGGCGTGAACGCCTTCCCCAGACCC 220
 H G V N A F P R P
 GGAGCTCGGGGTTCAACCGCGGGGTGTACCGGGCCCTGGCCGGGCCACGGTGAGCGTGGTCCGGCGTGGTACGGCCCTGACGGTGACCCAGCCGCCAGCGCCGGC 330
 G A R R F T G G L Y R A L A A A T V S V V G V Y T A L T V T O P A S A A A
 #1696
 GAGCACGCTCGCCGAGGGTGGCGGCAGCACAAACGGTACTTCGGCGTGGCCATCGCCGCGAACAGGCTCACCGACTCGGTCTACACCAACATCGGGAACCGCGAGTTCA 440
 S T L A E G A A O H N R Y F G V A I A A N R L T D S V Y T N I A N R E F
 #1696 #1697 #1698 #1704
 ACTCGGTGACGGCCGAGAACGAGATGAAGATCGACGCCACCGAGCCGACGAGGGCGGGTTCGACTTCACCCAGGCGGACCGGATCTACAACCTGGCGCCGCGAGAACGGC 550
 N S V T A E N E H K I D A T E P Q Q G R F D F T Q A O R I Y N W A R Q N G
 #1704
 AAGCAGGTCGGCGCCACACCCCTGGCCTGGCACTCGCAGCAGCCGAGTGGATGCAGAACCTCAGCGGCCAGGCGGTGGCCAGGCGATGATCAACCACATCCAGGGGGT 660
 K Q V R G H T L A W H S O O P O W H O N L S G O A L R Q A M I N H I O G V
 CATGTCCCTACTACCGGGCAAGATCCCGATCTGGGACGTGGTGAACGAGGCGTTCGAGGACGGAACTCCGGCCCGCGGTGCGACTCCAACCTCCAGCGCACCGGTAACG 770
 H S Y Y R G K I P I W D V V N E A F E D G N S G R R C D S N L Q R T G N
 ATTGGATCGAGGTCCGGTTCGGCACCGCCCGCAGGGGGACCCCTCGGCCAAGCTCTGCTACAACGACTACAACATCGAGAAGTGAACCGCGCCCAAGACCCAGGCGGTC 880
 D W I E V A F R T A R O G D P S A K L C Y N D Y N I E N W N A A K T O A V #1703
 TACAACATGGTGGGGACTTCAAGTCCCGCGCGTGGCCATCGACTGCGTGGGCTTCCAGTCCGACTTCAACAGCGGTAACCCGTACAACCCGAACCTCCGCACCCCT 990
 Y N M Y R D F, K S R G V P I D C V G F Q S H F N S G N P Y N P N F R T T L
 GCAGAGTTCGGCGCCCTCGGCGTGGACGTGAGGTCCAGGACTGGACATCGAGAAGCCCGCCGAGACCTAGCCAGCGTGATCGGGACTGCTGGCCGTGGACC 1100
 Q Q F A A L G Y D V E V T E L D I E N A P A Q T Y A S V I R D C L A Y D
 GCTGCACCGGCATCACCGTCTGGGGTGTCCCGGACAGCGACTCCTGGCGCTGTTACAGAACCCGCTGCTGTTTCGACAACAACGGCAACAAGAAGCAGGCTACTACGG 1210
 #1699
 R C T G I T Y W G V R D S D S W R S Y Q N P L L F D N N G N K K Q A Y Y A
 GTGCTCGACGCCCTGAACGAGGGCTCCGACGACGGTGGCGGCCCGTCCAACCCGCGGTTCTCGCCGCGCCGGTGGCGGTTCCGGGCAGATCCGGGGCGTGGCTCCAA 1320
 Y L D A L N E G S D D G G G P S N P P V S P P P G G G S G Q I R G V A S N
 CCGGTGCATCGAGTGGCAACGGCAACACCGCCGACGGCACCCAGGTCCAGCTGTACGACTGCCACAGCGGTTCCAACAGCAGTGGACCTACACCTCGTCCGGTGAGT 1430
 R C I D V P N G N T A D G T Q V Q L Y D C H S G S N O Q W T Y T S S G E
 TCCGCATCTCGGCAACAAGTGCCTGGACCGGGCGGCTCCAGCAACGGTGGGTGGTCCAGATCTACAGTCTGCTGGGGCGGCGCAACAGAGTGGGAGCTCCGGGCC 1540
 F R I F G N K C L D A G G S S N G A Y V Q I Y S C W G G A N O K W E L R A
 GACGGCACCATCGTGGCGTGCAGTCCGGGCTGTGCTCGACGCGGTGGTGGCGGCACCGCAACGGCACCGGGCTGACGCTACTCCTGCTGGGGCGGCAACAACCA 1650
 D G T I V G V O S G L C L D A V G G G T G N G T R L O L Y S C W G G N N Q
 GAAGTGGTCTACAACGCTGATCCCGGCTGATCGACCCAGTGTAGGGCCGCTCCGGTACCGCACCGTCCGACCGGAGGGCGGTCCCTTGTTCGTCCAGGACGGAAGGA 1760
 K W S Y N A
 CCGGCTGAGCAGGCGGGCGATCGGACACCATGGTGGGAGGCACGAAAGCGGGGAGGGGTCGTATCCGAGACTCCGGGAAGTGGAGGTGTTCTCCACCTGA 1864

Figure 14.

