

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS**  
**PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN**  
**FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) **FI 911812 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**  
**PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG**  
**PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE**  
**PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **911812**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
**C12N 9/24**  
**C12N 1/14**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.04.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.04.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **09.11.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

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

08.05.1990 AT 1030/90

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 •Voest-Alpine Industrieanlagenbau**, Turmstrasse 44, 4020 Linz, ITÄVALTA, (AT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 •Wizani, Wolfgang**, Österreich, ITÄVALTA, (AT)

**2 •Esterbauer, Hermann**, Österreich, ITÄVALTA, (AT)

**3 •Steiner, Walter**, Österreich, ITÄVALTA, (AT)

**4 •Gomes, Joseph**, Bangladesh, BANGLADESH, (BD)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Leitzinger Oy**, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Menetelmä ksylanaasin valmistamiseksi**

**Förfarande för framställning av xylanas**

Menetelmä ksylanaasin valmistamiseksi. - Förfarande för framställning av xylanäs.

Keksintö koskee menetelmää ksylanaasin valmistamiseksi, ksylanaasin käyttöä, mikro-organismia *Thermomyces lanuginosis* DSM 5826 ja sen avulla valmistettua ekso- ja endosellulaasivapaata ksylanaasia.

Yksivuotisilla kasveilla tai lehtipuilla pääasiallisesti ksylaanista koostuvan hemiselluloosan hajottaminen on välttämätön selluloosan tuotannon vaihe. Tämä hajottaminen voi tapahtua joko kemiallista tietä, esimerkiksi emäksisen kuumauuton avulla, tai entsyymattista tietä substraattispesifisen entsyymikäsittelyn, erityisesti ksylanaasikäsittelyn avulla. Valkaisemattoman tai puoliksi valkaistun selluloosan entsyymattinen käsittely ksylanaaseilla johtaa hemiselluloosasidesten katkeamiseen ja ksylaanin hajoamiseen. Tällöin voidaan käyttää kuitenkin vain puhtaita ksylanaaseja, joiden sellulaasissa ei ole epäpuhtauksia, koska muuten myös selluloosi pilkkoutuu ja hajoaa, mikä on äärimmäisen epätoivottavaa.

Ennen kaikkea muutamat mesofiilit ja termofiilit mikro-organismit tuottavat ksylanaaseja, jotka hajottavat ravintoalustassa esiintyviä ksylaanipitoisia raaka-aineita ja käyttävät niitä C-lähteenä. Riippuen muista ravintoalustassa olevista raaka-aineista, pääasiassa selluloosasta, muodostuu myös tälle substraatille spesifisiä sellulaaseja. Jotta saadaan ekso- ja endosellulaasivapaata ksylanaasia, ksylanaasi täytyy erottaa muodostuneista sellulaaseista käytettävässä menetelmässä ja puhdistaa. Käymistäpahtumassa sellulaasien muodostumisen vähentämiseksi mikro-organismeja voidaan viljellä myös puhdistetulla ksylaanilla. Julkaisussa D. J. Senior et al., *Biotechnology Letters*, vol 10, no 12, sivut 907 - 912 (1988) kuvataan puhdistetul-

la ksylaamalla viljellystä *Trichoderma harzianum*ista saatujen ksylanaasien käyttöä ksylaamin hajottamiseksi valikoivasti.

Ksylanaasin tuottaminen viljelemällä erityisen puhdasta ksylaania käyttäen ei tule suurten raaka-ainekustannusten takia kysymykseen useimmissa teknisissä sovellutuksissa.

Havaittiin yllättäen, että tuotetaan yllättävän suuren aktiivisuuden omaavaa ksylanaasia, kun viljellään erästä sientä elatusaineessa, joka sisältää maissintähkää, jolloin muodostuneella ksylanaasilla ei ole lainkaan ekso- ja endosellulaasiaktiiviteettia tai se on hyvin vähäinen.

Keksinnön aihe on siten ksylanaasin valmistusmenetelmä, joka on tunnettu siitä, että viljellään erästä sientä elatusaineessa, joka sisältää maissintähkää.

Keksinnön mukaisesti ksylanaasia valmistetaan viljelemällä sientä elatusaineessa, joka sisältää maissintähkää. Ksylanaaseilla tarkoitetaan tällöin pelkästään ksylanaaseja, joilla ei ole lainkaan ekso- tai endosellulaasiaktiivisuutta tai se on erittäin vähäinen. Tällöin käyttökelpoiset sienet ovat sieninä, jotka voivat tuottaa keksinnön mukaisessa menetelmässä suuren ksylanaasiaktiivisuuden. Esimerkiksi tällaisista sienistä on *Thermomyces lanuginosus* (aikaisemmin *Humicola lanuginosa*). *Monylianus*-lajin heimo eristettiin Bangladeshissä öljyemulsiolla juuttikuituja käsittelevän juuttitehtaan juuttijätekasasta. Juuttijätekasen lämpötila oli 65 - 70 °C. Tämä heimo tallennettiin saksalaiseen mikro-organismien ja soluviljelmien kokoelmaan nimellä DMS 5826. Tämä heimo on erityisen sopiva tuottamaan yllättävän suuren aktiivisuuden omaavia ksylanaaseja maissintähkää sisältävässä elatusaineessa. *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 on uusi ja samoin keksinnön aihe.

Elatusaine, jossa sientä viljellään, sisältää kasvulle välttämättömien ravinteiden ja hivenaineiden ohella maissintähkää. Maissintähkä voidaan käyttää sinällään tai jauhettuna ja mahdollisesti steriloituna kuumentamalla 110 - 160 °C:n lämpötilaan tai esikäsiteltynä esimerkiksi ylikuumennetulla vesihöyryllä. Erityisen suuri ksylanaasiaktiivisuus saavutetaan odottamatta, kun maissintähkä jauhetaan karkeaksi ennen sen käyttöä. Vaikka maissintähkä rouhitaan tai jauhetaan hienoksi, tulokset ovat yllättävän hyviä, mutta karkeaksi jauhetun maissintähkän käyttö antoi kuitenkin ylivoimaisesti parhaat tulokset.

Sopivia typpilähteitä ovat esimerkiksi lihapeptoni, kalapeptoni, urea, ammoniumsulfaatti, mallasuute, lihauute, soijajauhe, hiivauute ja vastaavat, epäorgaaniset suolat, esimerkiksi kaliumvetysulfaatti, kaliumdivetyfosfaatti, dinatriumvetyfosfaatti, rautasulfaatti, kalsiumkloridi, magnesiumsulfaatti ja vastaavat. Ksylanaasin vapauttamisen kiihdyttämiseksi elatusaineeseen, voi olla edullista lisätä elatusaineeseen pinta-aktiivisia aineita. Tavallisesti käytetään ei-ioniaktiivisia pinta-aktiivisia aineita, jollaisia ovat esimerkiksi Tween 40, Tween 60 tai Tween 80, määrän ollessa 0,05 - 0,5 painoprosenttia perustuen elatusaineen kokonaismäärään. Elatusaineeseen voidaan lisätä mahdollisesti myös hivenaineita, esimerkiksi harvinaisia metalleja, jollaisia ovat  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , tai vitamiineja. Mahdollisesti elatusaineen pH-arvo säädetään edullisesti ammoniakkin tai fosforihapon avulla arvoon 5,0 - 8,0, edullisesti arvoon 6,0 - 7,0.

Sientä viljellään elatusaineessa noin 30 - 70 °C:n lämpötilassa, edullisesti 40 - 60 °C:n lämpötilassa ja erityisen edullisesti 45 - 55 °C:n lämpötilassa. Fermentoimisen alussa säädetyn pH-arvon pitäminen vakiona ei ole välttämätöntä. Se voidaan kuitenkin pitää vakiona mahdollisesti

annostelemalla elatusaineeseen esimerkiksi ammoniakkia tai fosforihappoa.

Fermentoimisen päättymisen jälkeen ksylanaasi voidaan eristää tavanomaisesti fermentointiliemestä. Sen lisäksi erotetaan esimerkiksi sienirihmasto, itiöt ja jäljellä olevat liukenemattomat aineet sentrifugoimalla tai suodattamalla. Entsyymien puhdistaminen edelleen voi tapahtua tavanomaisesti, esimerkiksi suolaamalla ammoniumsulfaatin avulla tai saostamalla liuottimen avulla, kuten asetonin, alkoholin tai vastaavan avulla. Näin saatu raakaentsyymi voidaan mahdollisesti puhdistaa edelleen esimerkiksi geelisuodatuksen, ioninvaihtokromatografian, geelielektroforeesin tai vastaavan avulla.

Keksinnönmukaisesti valmistetulla ksylanaasilla on suuri ksylanaasiaktiivisuus. On käynyt ilmi, että käytettäessä maissintähkää C-lähteenä saavutetaan yllättävän korkea ksylanaasiaktiivisuus muihin käsittelimättömiin raaka-aineisiin, kuten ohran akanoihin, vehnänolkeen, vehnänleseisiin, jauhettuun pyökinkuoreen, sinimailasjauhoon, puna-apilajauhoon ja soiijaöljyyn verrattuna. Käytettäessä karkeaksi jauhettua maissintähkää muodostuneen ksylanaasin aktiivisuus lisääntyy vielä nelinkertaiseksi.

Keksinnönmukaisesti valmistettu ksylanaasi sisältää vain vähäisen ekso- ja endosellulaasiaktiivisuuden tai sitä ei ole lainkaan. *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826-sienen valmistama ksylanaasi osoittautui useissa kokeissa ekso- tai endosellulaasivapaaksi. Tällainen ekso- ja endosellulaasivapaa ksylanaasi on uusi ja samoin keksinnön aihe. Tällöin *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 voi tuottaa ksylanaasia paitsi maissintähkää sisältävässä elatusaineessa, myös elatusaineessa, joka sisältää maissintähkän sijasta muita kiinteitä tai liuennaita ksylaaniipitoisia hiililäh-

teitä, kuten esimerkiksi ohran akanoita, jauhettua vehnänolkea, valkaisuamatonta selluloosaa tai ksylaania. Yllättäen suuri ksylanaasiaktiivisuus saavutettiin kuitenkin, kun elatusaine sisälsi maissintähkää.

Keksinnönmukaisesti valmistetulla ekso- ja endosellulaasivapaalla ksylanaasilla oli etanolisaostuksen ja pakastekui-vaoksen jälkeen seuraavat ominaisuudet:

a) pH-stabiilisuus (kuva 1)

Entsyymiä inkuboitiin puskuriliuoksissa pH-arvon vaihdella 66 tunnin ajan 20 °C:n lämpötilassa. Kaikkien näytteiden aktiivisuus mitattiin käyttäen 1 % hemiselluloosaa pH-arvon ollessa 4,8 seuraavasti: inkuboitiin 1 ml:aa 1 %:sta substraattiliuosta Na-sitraattipuskurissa (pH 4,8), (ksylaani kauran akanoista; Sigma X-0627) 2 minuutin ajan 50 °C:n lämpötilassa, sitten 15 minuutin ajan 50 °C:n lämpötilassa, kun ensin oli lisätty 0,5 ml entsyymiliuosta. Sitten lisättiin 3 ml dinitrosalisyylihapporeagenssia (kuten IUPAC:n mukaisessa FPU-testissä) ja 0,5 ml 2,5 N NaOH:ta ja seosta kuumennettiin 5 minuutin ajan kiehuva-ssa vesihauteessa. Sitten seos jäähdytettiin nopeasti kylmässä vesihauteessa ja ekstinktio mitattiin 540 nm:n aallonpituudella tyhjäarvoon (sitraattipuskuriin) verrattuna. Tästä arvosta täytyy vähentää entsyymin (0,5 ml entsyymiä + 1,0 ml sitraattipuskuria) ja substraattiliuoksen (1 ml 1 %:sta substraattiliuosta sitraattipuskurissa) ekstinktio. Tarkistuskäyrä saatiin käyttäen 1,0 ml sitraattipuskuria ja 0,5 ml standardiliuosta (sisältäen 0,5 - 1,5 mg ksyloosia/ml).

Ksylanaasiaktiivisuuden laskeminen:

$XU/ml = mg \text{ pelkistävää sokeria (ksyloosina/koe)} \times 0,888.$

pH-alueella 5,0 - 7,0 saatiin 97 - 100 %:a alkuperäisestä aktiivisuudesta.

## b) Optimaalinen pH-arvo (kuva 2)

Entsyymiaktiiviteetti määritettiin inkuboimalla (15 min, 50 °C) käyttäen 1 %:a hemiselluloosasuspensiota sitraattipuskurissa (pH-arvo 3,0 - 6,5), tris-HCl-puskuria (pH-arvo 7,0 - 9,0) ja fosfaattipuskuria (pH-arvo 6,5 - 8,0).  
Optimaalinen pH-alue: 6,0 - 7,5.

## c) Lämmönkestävyys (kuva 3)

Entsyymiliuosta inkuboitiin 0,05 molaarisessa sitraattipuskurissa (pH 4,8) 45 - 60 °C:n lämpötilassa 72 tuntiin saakka. Entsyymin aktiivisuus mitattiin käyttäen 1 % hemiselluloosaa 50 °C:n lämpötilassa.

20 tunnin kuluttua mitattiin 45 °C:n lämpötilassa 93 %:a ja 50 °C:n lämpötilassa 65 %:a alkuperäisestä aktiivisuudesta.

## d) Optimaalinen lämpötila (kuva 4)

Entsyymiaktiivisuus määritettiin inkuboimalla 15 minuutin ajan käyttäen 1 % hemiselluloosasuspensiota 0,05 molaarisessa sitraattipuskurissa pH-arvon ollessa 4,8.  
Optimaalinen lämpötila: 65 °C.

e) 385 XU/ml-entsyymiliuoksen ekso- ja endosellulaasien ja  $\beta$ -glukosidaasin pitoisuus:

i) ekso- ja endosellulaasit:

IUPAC:n mukaisessa FPU-testissä ei havaittu sellulaasiaktiivisuutta.

Lisäksi käsiteltiin dialyysiletkaa (regeneroitua selluloosaa) 72 tunnin ajan entsyymillä vesipitoisessa väliaineessa, ja väliaineesta testattiin glukoosin läsnäolo, jolloin ei havaittu lainkaan glukoosia. Sellulaasipitoiset entsyymit liuottavat dialyysiletkun sitävastoin muutaman tunnin kuluessa.

Lisäksi inkuboidaessa entsyymiä pitkäaikaisesti selluloosalla pH-arvon ollessa 6,5 määritettiin vapautuneen, pelkistävän sokerin laatu. Mittaukset tapahtuivat tällöin 3, 7, 19 ja 163 tunnin kuluttua. Tällöin kävi ilmi, että kaikissa tapauksissa vapautui vain ksyloosia, ksylobiooseja, ksylootriooseja, mutta ei lainkaan glukoosia. Toistotekniikan avulla käyttäen OBR-hydroksietyyliselluloosalla värjättyä agargeeliä tutkittiin endo-sellulaasiaktiivisuus, jolloin ei havaittu lainkaan mainittua aktiivisuutta. Entsyymi oli kaikkien suoritettujen kokeiden ja testien mukaan täysin vapaa sellulaaseista. Keksinnönmukaisella ksylanaasilla ei ollut raja-arvolla 0,1 yksikköä/ml myöskään karboksimeetyylisellulaasi- (endo- $\beta$ -1,4-sellulaasi) aktiivisuutta ja siten se on myös käyttökelpoinen viskosiinvalmistuksessa.

ii)  $\beta$ -glukosidaasi:

Esi-inkuboidaan 0,6 ml:aa 0,05 molaarista natriumsitraattipuskuria (pH 4,8) ja 0,3 ml:aa entsyymiliuosta 2 minuutin ajan 50 °C:n lämpötilassa. Sitten lisätään 0,3 ml p-nitrofenoli- $\beta$ -D-glukosidia (4 ml/ml natriumsitraattipuskuria) ja seosta inkuboidaan 10 minuutin ajan 50 °C:n lämpötilassa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 2,4 ml 1 molaarista Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-liuosta ja ekstinktio mitattiin 405 nm:n aallonpituudella tyhjäarvoon verrattuna.  $\beta$ -glukosidaasiaktiivisuus laskettiin seuraavasti:

$$\text{IU/ml} = \frac{E \cdot 12}{18,5 \times t}$$

E = ekstinktio

t = reaktioaika (min)

Keksinnönmukaisen ksylanaasin  $\beta$ -glukosidaasiaktiivisuus oli 0,2 - 0,9 IU/ml. Sellobioosin glukoosiksi pilkkovan

$\beta$ -glukosidaasin pitoisuudella ei ole vaikutusta keksinnön-  
mukaisen ksylanaasin käyttäytymiseen selluloosan valmistuk-  
sessa, koska ekso- ja endosellulaasien puuttumisesta joh-  
tuen ei muodostu selluloosan hajoamistuotteita, joihin  
päästään käsiksi  $\beta$ -glukosidaasin kautta.

f) Lisäksi todettiin beta-ksylosidaasi-, arabinosidaasi-,  
asetyyliesteraasi-, asetyyliksylaaniesteraasi- ja mannaa-  
siaktiivisuus, kulloinkin  $\leq$  100 yksikköä/l.

g) Entsyymiseoksen liukoisen proteiinin osuus oli 800 mg/l,  
pääproteiinin molekyylipaino 24 - 25 kDa ja pääproteiinin  
isoelektrinen piste 4,1.

h) Puhdistettu entsyymi hydrolysoitiin entsyymaattisesti  
11 peptidiksi. Neljä peptidiä sekventoitiin 8, 16, 5 tai  
12 aminohapon kanssa. Tällöin tutkittava ksylanaasi osoit-  
tautui olevan N-päätteestä tukittu, joten sitä ei voitu  
sekventoida N-päätteisestä päästä, kun taas *Humicola lanu-*  
*ginosa* sp:stä (*Thermomyces lanuginosus*) saadulla ksylanaa-  
silla, joka oli eristetty julkaisun Anand et al., Arch.  
Biochem. Biophys. 276, 546 - 553 (1990) mukaan, oli N-  
päätteisenä aminohappona arginiini.

Keksinnönmukaisesti valmistettu ksylanaasi on hyödyllinen  
ksylaani- ja lignoselluloosapitoisten kasviperäisten raaka-  
aineiden ja niistä saatujen kuitujen entsyymaattisessa  
käsittelyssä ja sitä voidaan käyttää esimerkiksi edullises-  
ti valkaisuun, siistaukseen, selluloosan jalostamiseen  
viskoosinvalmistuksessa tai muuhun esikäsittelyyn, kuten  
esimerkiksi ksylaanin poistamiseen ennen keittoa.

Ksylaani- ja lignoselluloosapitoisilla kasviperäisillä  
raaka-aineilla tarkoitetaan raaka-aineita, jotka on saatu  
lehti- ja havupuista, yksivuotisista kasveista, esimerkiksi

pellavasta, oljesta, bagassista, kenafista, kaislasta, elefantinruohosta jne, mutta myös kuituja, jotka on saatu kasviperäisistä raaka-aineista, kuten valkaistusta, puoli-valkaistusta tai valkaisemattomasta selluloosasta tai jätepaperista.

Käyttöä varten keksinnönmukaisesti valmistettua ksylanaasia ei tarvitse puhdistaa, kiinteän elatusaineen erottaminen riittää. Kiinteän ravintoaineen poistamisen jälkeen fermentointiliemi voidaan käyttää sellaisenaan suoraan kasviperäisistä raaka-aineista saatujen kuitujen käsittelyyn.

Selluloosateollisuudessa keksinnönmukaisesti valmistetulla ksylanaasilla voidaan käsitellä sekä valkaisematonta, että myös puolivalkaistua ja myös valkaistua selluloosaa. Selluloosan käsittely johtaa hemiselluloosa-ligniini-sidosten katkeamiseen. Seuraavassa valkaisukäsittelyssä tarvitaan siten vähemmän valkaisuainetta. Käsiteltäessä puolivalkaistua selluloosaa esivalkaisun jälkeen jäljelle jäänyt ksylaani hajoaa, jolloin saadaan puhtaampaa ja vaaleampaa massaa. Entsyymikäsittelyn vaikutus määritetään kappaluvun (K) avulla, joka ilmoittaa hapettuvan aineen pitoisuuden, siis esimerkiksi ligniinin pitoisuuden. Valkaistussa selluloosassa ksylaanikäsittelyn avulla saadaan suurempi alfa-selluloosapitoisuus.

#### Esimerkki 1

Elatusaineen, jonka määrä oli 300 ml:aa ja joka koostui 9 g:sta jauhettua ja kuivattua maissintähdettä, 3,3 g:sta lihapeptonia, 0,6 g:sta  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :a, 0,45 g:sta ureaa, 0,09 g:sta  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :ta, 0,09 g:sta  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :ta, 4,5 g:sta  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :a, 0,3 ml:sta Tween 80:a, 0,3 ml:sta  $\text{S}_1$ :tä (1,6 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 3,45 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ja 0,3 ml:sta  $\text{S}_2$ :tä (5 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), pH-arvo säädettiin 6:ksi ja sitä käsiteltiin autoklaavissa

ravistuspullossa 60 minuutin ajan 128 °C:n lämpötilassa. *Thermomyces lanuginosus* DMS 5826-sienen esiviljelmä inokuloitiin tähän elatusaineeseen ja sitä viljeltiin 4,5 päivää 50 °C:n lämpötilassa ravistaen (140 rpm). Elatusaine suodatettiin 4,5 päivän kuluttua ja ksylanaasin (XU/ml),  $\beta$ -glukosidaasin (IU/ml), karboksimeetyylisellulaasin (CMC-aasi/ml) ja eksoglukanaasin (FPU/ml) aktiivisuus määritettiin.

XU/ml	389,7
3 päivän varastoinnin jälkeen	
4 °C:n lämpötilassa	395,0
IU/ml	0,29
FPU/ml	ei osoitettavissa
CMC-aasi	ei osoitettavissa

#### Esimerkki 2

##### Maissintähkät

- rouhittiin (maissintähkäkappaleiden koko yli 10 mm)
- jauhettiin karkeaksi (maissintähkäkappaleiden koko 3 - 10 mm)
- jauhettiin hienoksi (maissintähkäkappaleiden koko pienempi kuin 3 mm).

Valmistettiin kulloinkin 1000 ml elatusainetta, joka koostui 28,6 g:sta hiivauutetta, 4,23 g:sta  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :a, 10 g:sta  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :a, 0,3 g:sta  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :ta, 0,3 g:sta  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :ta ja 0,3 g:sta  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :ta ja 25 g:sta a) rouhittua, b) karkeaksi jauhettua ja c) hienoksi jauhettua, kuivattua maissintähkää, elatusaineen pH-arvo säädettiin 6,5:ksi ja elatusainetta käsiteltiin autoklaavissa 25 minuutin ajan ravistuspullossa 121 °C:n lämpötilassa.

*Thermomyces lanuginosus* DMS 5826-sienen esikulttuuri inokuloitiin tähän elatusaineeseen ja sitä viljeltiin 50 °C:n lämpötilassa ravistaen. Viiden päivän kuluttua elatusaine

suodatettiin ja ksylanaasin aktiivisuus (XU/ml) eri elatusaineissa määritettiin:

		XU/ml yhden päivän varastoinnin jälkeen 4 °C:n lämpötilassa
Maissintähkä	XU/ml	
Rouhittu	764	881
Karkeaksi jauhettu	1601	1526
Hienoksi jauhettu	388	423

### Esimerkki 3

Esimerkissä 2 kuvatussa elatusaineessa ja esimerkissä 2 kuvatulla tavalla paitsi käyttäen muita C-lähteitä, määritettiin seuraavat ksylanaasiaktiivisuudet:

C-lähde	Ksylanaasiaktiivisuus (XU/ml)
Maissintähkä (50 % hienoksi jauhettua, 50 % karkeaksi jauhettua)	477
Vehnän olki	232
Vehnänlese	186
Ohran akana	61
Ulva rifide (levä)	28
Sinimailasjauhe	20
Puna-apilajauhe	14
Jauhettu pyökinkuori	8
Liukoinen tärkkelys	4
Soijaöljy	4

### Esimerkki 4

*Thermomyces lanuginosus* DMS 5826-sientä viljeltiin esimerkiksi 1 vastaten, jolloin jauhetun maissintähkän sijasta käytettiin 9 g:aa jauhettua vehnän olkea.

XU/ml	104,3
3 päivän varastoinnin jälkeen 4 °C:ssa	123,9
IU/ml	0,51
FPU/ml	ei osoitettavissa
CMC-aasi/ml	ei osoitettavissa

## Esimerkki 5

Thermomyces lanuginosus DMS 5826-sientä viljeltiin esimerkiksi 1 vastaten, jolloin jauhetun maissintähkän sijasta käytettiin ohran akanoita.

XU/ml	222,9
3 päivän varastoinnin jälkeen 4 °C:ssa	196,2
IU/ml	0,60
FPU/ml	ei osoitettavissa
CMC-aasi/ml	ei osoitettavissa

## Esimerkki 6

Thermomyces lanuginosus DMS 5826-sientä viljeltiin esimerkiksi 1 vastaten, jolloin jauhetun maissintähkän sijasta käytettiin 9 g:aa hemiselluloosaa (ksylaania).

XU/ml	151,55
IU/ml	ei osoitettavissa
FPU/ml	ei osoitettavissa
CMC-aasi/ml	ei osoitettavissa

## Esimerkki 7

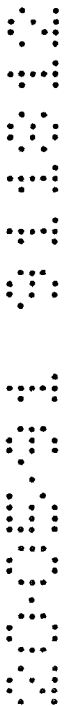
## Sulfaattiselluloosan käsittely

Ruzomberokista (kovapuusta) saatua kuivattua sulfaattiselluloosaa kuumettiin veden kanssa 1,5 tuntia 45 °C:n lämpötilassa ja ravisteltiin. Sitten lisättiin esimerkin 1 mukaisesti valmistettu ksylanaasi ja ravisteltiin kierrosnopeudella 230 rpm.

a) 30 g fermentointilientä	b) 90 g fermentointilientä
220 g selluloosaa	220 g selluloosaa
(K=19,97)	(K=19,97)
350 g vettä	290 g vettä
grammaa kohden kuitua	grammaa kohden kuitua
lisättiin 100 XU entsyymiä	lisättiin 300 XU entsyymiä.

Selluloosan suodattamisen jälkeen määritettiin kappaluku:

	a)	b)
Kappaluku	17,45	13,39

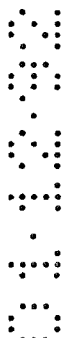


Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ksylanaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että sientä viljellään elatusaineessa, joka sisältää maissintähkää.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytettävä sieni on *Thermomyces lanuginosus*.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n - n e t t u siitä, että käytettävä sieni on *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.
4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sientä viljellään 30 - 70°C lämpötilassa pH-arvon ollessa 5,0 - 8,0.
5. Jonkin patenttivaatimuskista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sientä viljellään 45 - 55°C lämpötilassa pH-arvon ollessa 5,0 - 8,0.
6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826-sientä viljellään 45 - 50°C lämpötilassa pH-arvon ollessa 6,0 - 7,0.
7. *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.
8. Ksylanasi, t u n n e t t u siitä, että ravintoväliai- neessa viljellään *Thermomcyes lanuginosus* DSM 5826, joka salpaa N-terminaalin ja jolla on seuraavat ominaisuudet:
  - a) molekyylipaino 24 - 25 k-Daltonia,
  - b) liukoinen proteiiniosuus 800 mg/l
  - c) isoelektrinen piste 4,1
  - d) pH-arvo on korkeintaan 6,0 - 7,5
  - e) optimaalinen lämpötila: 65°C.

9. Menetelmä ksylanaasin selluloosavapaata valmistusta varten, tunnettu siitä, että viljellään Thermomyces lanuginosus DSM 5826 väliaineessa.

10. Thermomyces lanuginosus DSM 5826 käyttö ksylaani- ja lignoselluloosapitoisten kasvisraaka-aineiden ja tällaisista raaka-aineista saatujen kuituaineiden entsymaattista käsittelyä varten.



Patentkrav

1. Förfarande för framställning av xylanas, k ä n n e - t e c k n a t därav, att en svamp odlas i ett näringsmedium, som innehåller majscolvar.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att den använda svampen är *Thermomyces lanuginosus*.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den använda svampen är *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.
4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e - t e c k n a t därav, att svampen odlas vid en temperatur av 30 - 70 °C och ett pH-värde av 5,0 - 8,0.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e - t e c k n a t därav, att svampen odlas vid en temperatur av 45 - 55 °C och ett pH-värde av 5,0 - 8,0.
6. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att svampen *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 odlas vid en temperatur av 45 - 50 °C och ett pH-värde av 6,0 - 7,0.
7. *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826.
8. Exo- och endocellulasfritt xylanas, k ä n n e t e c k n a t därav, att det erhållits genom odling av *Thermomyces lanuginosus* DSM 5826 i ett näringsmedium.
9. Användning av exo- och endocellulosafritt xylanas, som framställts enligt något av patentkraven 1 - 6, för enzymatisk behandling av xylan- och lignocellulosahaltiga växtråmnen och från dessa erhållna fibrer.





BIODIVERSITY

Jäljelle jäävä ksylanaasi-  
aktiivisuus (%)

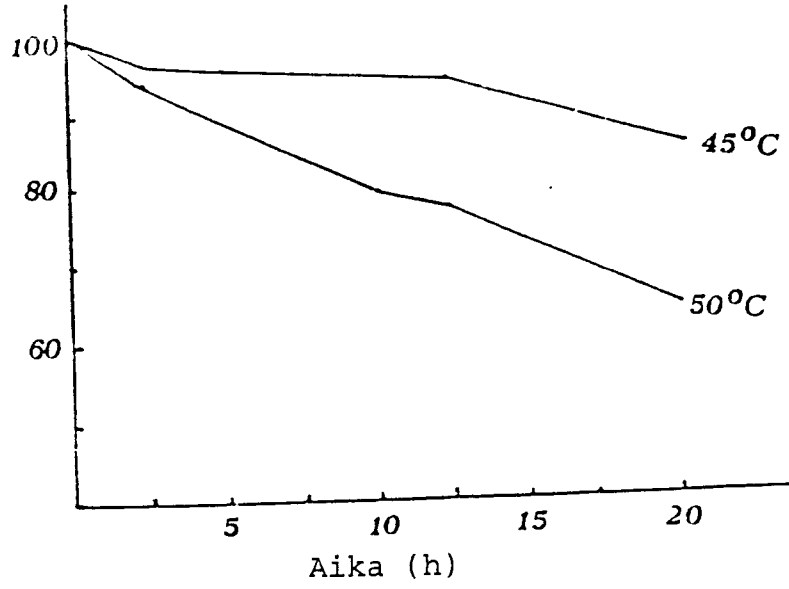


Fig. 3

Suhteellinen ksylanaasiaktiivisuus (%)

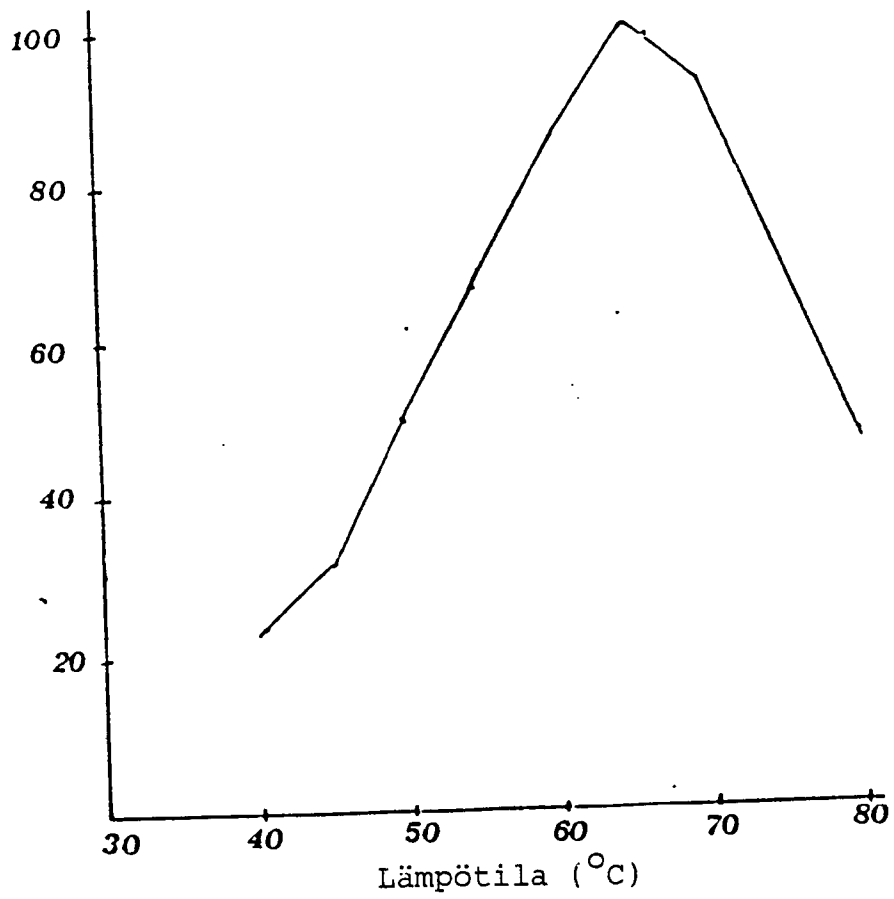


Fig. 4