

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 970200 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 970200

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/55

C12N 15/80

C12N 9/24

C12N 1/15

C12R 1:75

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 12.07.1995

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 17.01.1997

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 17.01.1997

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 12.07.1995 PCT/US1995/008676
Internationell ansökan - International
application

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

20.07.1994 US 278473

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novo Nordisk Biotech Inc., 1445 Drew avenue, Davis CA 95616-4880, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Jensen, Ejner Bech, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Boominathan, Karuppan Chettier, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Termofiilinen sieniekspresiojärjestelmä

Termofiliskt jästexpresionssystem

Termofiilinen sieniekspressiojärjestelmä - Termofiliskt
jästexpressionssystem

5 Keksinnön ala

Keksintö koskee isäntäsoluja, jotka ovat käyttökelpoisia yhdistelmä-DNA-proteiinien tuotannossa. Erityisesti keksintö koskee termofiilisiä sieni-isäntäsoluja, joita voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-proteiinien, erityisesti entsyymien ekspres-

10 pression.

Keksinnön tausta

Yhdistelmä-DNA-isäntäsolujen käyttö heterologisten proteiinien ekspressiossa on viime vuosina huomattavasti yksinkertaistanut kaupallisesti arvokkaiden proteiinien suurten

15 määrien tuotantoa, joita proteiineja on muuten saatavissa vain puhdistamalla luontaisista lähteistään. Nykyisin on olemassa kirjava valikoima ekspressiojärjestelmiä, joista voidaan valita minkä hyvänsä määrätyn proteiinin tuotantoon,

20 mukaan lukien prokaryoottiset ja eukaryoottiset isännät. Usein sopivan ekspressiojärjestelmän valinta ei riipu ainoastaan isäntäsolun kyvystä tuottaa riittävät saannot proteiinia aktiivisessa tilassa, vaan siitä voi suuressa määrin määrätä proteiinin ajateltu lopullinen käyttö.

25

Vaikka nisäkäs- ja hiivasolut ovat olleet tavallisimmin käytettyjä eukaryoottisia isäntiä, filamenttisienet on nyt alettu tunnustaa hyvin käyttökelpoisiksi isäntäsoluina yhdistelmä-DNA-proteiinintuotannossa. Määrättyjä Aspergillus-

30 suvun lajeja on käytetty tehokkaasti isäntäsoluina yhdistelmä-DNA-proteiinintuotantoa varten. Lisäksi on usein ongelmia, jotka liittyvät myseelin liian tiheiden aggregaattien muodostumiseen ja epätasaiseen jakautumiseen, mistä on myös seurauksena ravinteiden loppuun kulumiseen ja epätuottavaan tilanteeseen. On kuvattu, että Aspergillus nidulans-laji on transformoitu yhdistelmä-DNA-plasmideilla (Ballance, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 112: 284-289, 1983), mutta

35

transformoinnin havaittiin tapahtuvan melko alhaisella taa-
juudella. Sekä *Aspergillus niger* että *Aspergillus oryzae* on
myös kuvattu käyttökelpoisiksi heterologisten proteiinien
yhdistelmä-DNA-tuotannossa. Vaikka näitä lajeja käytetään
5 nykyisin rutiininomaisesti yhdistelmä-DNA-proteiinintuotan-
nossa, niillä on kuitenkin haittansa. Erityisesti, niiden
kasvumorfologia fermentoreissa eivät ole optimaalisia fer-
mentointiin, viskositeetin tahtoessa kasvaa liian korkeaksi
biomassan lisääntyessä. kasvanut viskositeetti rajoittaa
10 fermentointiviljelmän sekoitusta ja ilmastusta, johtaen
myseelin hapen ja ravinteiden puutteeseen, mistä myseelistä
tulee sen vuoksi ja tuottamaton. Lisäksi on usein ongelmia,
jotka liittyvät myseelin liian tiheiden aggregaattien muo-
dostukseen, ja epätasaiseen jakautumiseen, mikä myös johtaa
15 ravinteiden loppumiseen. Siksi kaupallisiin tarkoituksiin
tarvitaan edelleen sieni-isäntiä, joita voidaan käyttää
yhdistelmä-DNA-proteiinien ekspressiossa, mutta joilla on
tyydyttävät kasvuominaispiirteet, kuten nopea kasvu ja al-
hainen viskositeetti, lisäten näin tuottavuutta fermentto-
20 reissa.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö aikaansaa uusia yhdistelmä-DNA-sieni-isäntäsoluja,
joilla on kasvuominaispiirteet, jotka soveltuvat erityisen
25 hyvin heterologisten proteiinien tuotantoon fermentoreissa.
Keksinnön mukaiset isäntäsolut pystyvät kasvamaan nopeasti,
niillä on alhainen viskositeetti määrättyllä biomassakonsent-
raatiolla ja ne antavat tulokseksi tasaisesti jakaantuneen
myseelin, jolla on riittävän löyhä rakenne salliakseen ra-
30 vinteiden riittävän diffuusion myseelin kaikkiin osiin. Eri-
tyisesti keksinnön mukaiset isäntäsolut ovat termofiilisiä
sieniä, jotka ekvivalenteissa fermentointiolosuhteissa, esi-
merkiksi, eräfermentoinnissa pH-arvossa 5, suola/hiivauute-
väliaineessa, joka sisältää 100 g/l glukoosia, tuottavat
35 viskositeettiarvot, jotka mitattuna esimerkiksi yksikössä
pascal ovat alle 80 %, edullisesti alle 50 %, ja edullisim-
min alle 30 % viskositeettiarvoista, jotka saadaan samoissa

olosuhteissa samalla biomassalla *Aspergillus oryzae*'lla; edulliset sieni-isännät tuottavat myseelin homogeenista, löyhää rakennetta. Edullisimmin sieni-isäntäsolut ovat Thielavia sp.:tä, *Thermoascus* sp.:tä, *Myceliophthora* sp.:tä, tai Sporotrichum sp.:tä. Siksi keksintö aikaansaa edellä määritettyjä yhdistelmä-DNA-isäntäsoluja, jotka käsittävät nukleiinihappofragmentin, joka koodittaa heterologista proteiinia (jonka ymmärretään tässä käsittävän myös peptidit), jota proteiinia isäntäsolu voi ekspressoida. Edelleen keksintö

10 aikaansaa tavan tuottaa heterologisia proteiineja, jossa tavassa kasvatetaan keksinnön mukaista isäntäsolua olosuhteissa, jotka johtavat kiinnostuksen kohteena olevan heterologisen proteiinin ekspressioon, ja otetaan proteiini talteen viljelmästä.

15

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuviossa 1 kuvataan viskositeettia eräfermentoinnissa, mitattuna yksikössä pascal, ja ekstrapoloituna arvoon 30 g/l, joukolla termofiilisiä sieniä, verrattuna viskositeettiin

20 *Aspergillus oryzae*'lla.

Kuviossa 2 esitetään termofiilisten kantojen transformoimattomista kannoista ja ksylanaasitransformanteista eristetyin kokonais-DNA:n "southern"-hybridisointianalyysi. Koettimena

25 käytetään *Humicola insolens*-ksylanaasi-cDNA:n 1,2-kb HindIII-XhoI-fragmenttia. Linja 1: *Myceliophthora thermophila* transformoimaton; Linja 2: *Myceliophthora thermophila* transformantti #5; Linja 3: *Myceliophthora thermophila* transformantti #11; Linja 4: *Acremonium alabamense* transformoimaton;

30 Linja 5: *Acremonium alabamense* transformantti #5; Linja 6: *Acremonium alabamense* transformantti #8; Linja 7: *Sporotrichum cellulophilum* transformoimaton; Linja 8: *Sporotrichum cellulophilum* transformantti #6; Linja 9: *Sporotrichum cellulophilum* transformantti #7.

35

Kuviossa 3 kuvataan ajan funktiona biomassan kasvu *Thielavia terrestris* 373:lla, ja saman kannan itiöimättömällä mutan-

tilla. Nuoli osoittaa pisteen, jossa 373-kanta alkaa itiöidä.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

5 Minkä hyvänsä yhdistelmä-DNA-proteiinin kaupallinen käyttö riippuu suuresti kyvystä saavuttaa tehokkaan tuotannon suurimittakaavaisessa fermentoinnissa. Joukko tekijöitä rajoittaa tuottavuutta sienten teollisissa fermentoinneissa. Tavalliset ongelmat liittyvät suhteellisen suureen viskositeettiin verrattuna yksisoluisiin organismeihin, kuten *Saccharomyces cerevisiae*'en ja *Bacillus* sp.:hen, ja myseelin usein hyvin heterogeeniseen jakaumaan tiiviiksi aggregaateiksi, jotka aiheuttavat myseelin pääosan nälkiintymisen johtuen O_2 :n ja/tai ravinteen kaikkiin soluihin diffundoitumisen puutteesta. Suuri viskositeetti fermenttorissa saavutettavaa hapensiirtonopeutta, mikä puolestaan vaikuttaa haitallisesti kokonaisenergiaan, jonka solut voivat tuottaa, johtaen täten saatavissa olevan tuottavan biomassan alempaan konsentraatioon ja pienempään lopullisen tuotteen saantoon tai pitempiin fermentointiaikoihin. Sen vuoksi voidaan nähdä, että yksinkertaisesti biomassan lisääntyminen ei ole, ilman oikeaa morfologiaa, joka johtaa alhaisempaan viskositeettiin, joka on riittävä fermentoinnin saannon kohottamiseen. Tuottavassa biomassassa on oltava lisäystä jotta saavutettaisiin lainkaan etuja.

Nyt on keksitty, että joukolla termofiilisiä sieniä on odottamattomasti määrättyt kasvuominaispiirteet, jotka tekevät ne fermentoreissa kasvatukseen sopiviksi. Yritykset käyttökelpoiset kasvuominaispiirteet omaavien sienten tunnistamiseksi alkavat termofiilisten sienten taksonomisesti heterogeenisen ryhmän sattumanvaraisena seulontana erilaisissa kasvatusolosuhteissa. Ravistelupulloarvioinnit keskittyvät suureksi osaksi määrittämään, tuottavatko ehdokaskannat suuret määrät solunulkoisia proteiineja ja/tai proteaaseja, joista ominaispiirteistä kumpikin ovat ei-toivottuja solussa, jota on määrää käyttää yhdistelmä-DNA-proteiinintuotantoon. Tarkkail-

laan kuitenkin myös kunkin kannan kasvua ja morfologiaa. Aluksi, suurta kasvunopeutta, yhdistettynä myseelien irtomaiseen, homogeeniseen jakaumaan, ilman sekä viljelmässä muodostuneita suuria pellettejä että aggregaatteja, pidetään
 5 hyvän ehdokkaan ilmaissijana fermenttorissa käyttöä varten. Tämän alustavan seulonnan pohjalta valitaan seuraavien lajien kantoja fermenttoreissa testaukseen: *Thermoascus thermophilus*, *Mucor pusilus*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris*, *Acremonium alabamense* (*Thielavia terrestris*'in epätäydellinen muoto), *Talaromyces emersonii* ja *Sporotrichum cellulophilum*.
 10

Ehdokaskannat testataan kuudessa 100-g/l:isessä glukoosieräfermentointiajossa, ja analysoidaan viskositeetin suhteen,
 15 *Aspergillus oryzae*'lla kontrollina. *Mucor pusilus* tuottaa suuren myseelikakun, ja *Talaromyces*-kannat tuottavat suuret proteaasitasot, ja jätetään sen vuoksi pois lisätutkimuksista. Taulukossa 1 esitetyt tiedot lopuille kannoille kuvaavat, että testattujen termofiilien viskositeettitasot ovat
 20 oleellisesti (ts. ainakin noin 50 %) alhaisemmat kuin tasot, jotka havaittiin *Aspergillus oryzae*'lla yhtäsuurilla biomassoilla. Kuviossa 1 esitetään näiden tietojen ekstrapolaatio, verraten kantoja biomassatasolla 30 g/l. Perustuen pelkääseen viskositeettihavaintoihin, *Thielavia terrestris*'illa vaikuttaa olevan edullisin profiili. Tämän lajin myseelit
 25 ovat homogeenisesti dispergoituneet, muodostuen löyhän rakenteen tiiviistä, erittäin haaroittuneista myseeleistä. *Myceliophthora* on samanlainen kuin *Thielavia*, mutta sillä on pitkänomainen ja vähemmän haaroittunut kasvumuoto, antaen
 30 tulokseksi hieman suuremman viskositeetin kuin *Thielavia*'lla nähty. Sekä *Thermoascus*'illa että *Sporotrichum*'illa on myös käyttökelpoinen morfologia ja hyvin alhainen viskositeetti.

Käyttökelpoisen morfologian omaamisen lisäksi ehdokasisäntäsolun on tietysti oltava transformoitavissa ja pystyttävä
 35 ekspressöimään heteroloogista proteiinia. Vaikka termofiilisiä sieniä, esimerkiksi, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, on

transformoitu aikaisemmin (Allison et al., Curr. Genet. 21:225-229, 1992), ei heterologisten proteiinien ekspres-
 siota yhdistelmä-DNA-sienisolussa ole kuvattu. Sen vuoksi
 oli aluksi epävarmaa, osoittautuisivatko nämä termofiilit
 5 viimekädessä lainkaan käyttökelpoisiksi heterologisen yhdis-
 telmä-DNA-proteiinin tuotannossa. Kuten alla olevissa esi-
 merkeissä esitetään, standardi-Aspergillus-transformointi-
 protokollia (kuten kuvataan esimerkiksi julkaisussa: Chris-
 tiansen et al.; Bio/Technol. 6: 1419-1422) voidaan kuitenkin
 10 hämmästyttävästi käyttää transformoimaan pääosaa testatuista
 kannoista. Täten keksinnön mukaiset termofiiliset sienet
 aikaansaavat vaadittavat ominaisuudet isäntäsoluina yhdis-
 telmä-DNA-proteiinintuotannossa fermenttoreissa käyttöä
 varten, sekä transformoitavuuden että edullisen morfologian
 15 suhteen.

Samoin termofiilisten sienten käyttö isäntäsoluina antaa
 muita etuja. Näiden sienten viljelmässä havaitun alhaisemman
 viskositeetin lisäksi, korkeampi lämpötila, jossa niitä kas-
 20 vatetaan, johtaa joillakin lajeilla suurempaan kasvunopeu-
 teen kuin ei-termofiileillä nähdyt nopeudet. Tämä puolestaan
 johtaa nopeampaan biomassan kertymiseen, mistä on seuraukse-
 na suhteellisen lyhyt fermentointisykli. Myös, jatkuvatoimi-
 sessa fermentoinnissa, korkeampien lämpötilojen yhdistelmä
 25 alhaisemman pH-arvon kanssa, jota nämä sienet suosivat,
 aikaansaa olosuhteet, joissa kontaminaatiovaara on merkittä-
 västi pienentynyt.

Keksintö käsittää minkä hyvänsä termofiilisen sienen, joka
 30 täyttää fermentoinnin aikana edellä määritellyt viskositeet-
 tivaatimukset. "Termofiiliselä sienellä" tarkoitetaan mitä
 hyvänsä sientä, jolla on optimaalinen kasvu lämpötilassa
 ainakin noin 40 °C, edullisesti välillä 40 - 50 °C. Tähän
 luetaan mukaan, mutta näihin rajoittumatta, termofiiliset
 35 jäsenet suvuista Acremonium, Corynascus, Thielavia, Myce-
 liophthora, Thermoascus, Sporotrichum, Chaetomium, Ctenomy-
 ces, Scytalidium ja Talaromyces. Eräässä edullisessa suori-

tusmuodossa termofiili on kantoja *Thermoascus thermophilus*, *Myceliophthora thermophila*, *Sporotrichum cellulophilum* tai *Thielavia terrestris*. Ymmärretään, että edellä mainituilla lajeilla keksintö käsittää sekä täydelliset että epätäydelliset tilat, ja muut taksonomiset ekvivalentit, esimerkiksi anamorfit, riippumatta lajinimestä, jolla ne tunnetaan. Esimerkiksi *Thielavia terrestris*'in epätäydellinen muoto tunnetan nimellä *Acremonium alabamense*, ja *Myceliophthora thermophila* on *Thielavia heterothallica*. Muita esimerkkejä taksonomisista ekvivalenteista ja muista käyttökelpoisista lajeista esitetään esimerkiksi julkaisuissa: Cannon, *Mycopathologica* 111: 75-83, 1990; Moustafa et al., *Persoonia* 14: 173-175, 1990; Stalpers, *Stud. Mycol.* 24, 1984; Upadhyay, et al., *Mycopathologia* 87: 71-80, 1984; Subramanian et al., *Cryptog. Mycol.* 1: 175-185, 1980; Guarro et al., *Mycotaxon* 23: 419-427, 1985; Awao et al., *Mycotaxon* 16: 436-440, 1983; von Klopotek, *Arch. Microbiol.* 98:365-369, 1974; ja Long et al., 1994, *ATCC Names of Industrial Fungi*, ATCC, Rockville, Maryland. Ammattimiehet tunnistavat helposti sopivien ekvivalenttien identiteetin.

Kuten esimerkeissä esitetut tulokset osoittavat, useilla isolaateilla kustakin lajista on morfologia, jota vaaditaan niiden tekemiseksi käyttökelpoiseksi fermentoinnissa. Osoitetaan myös, että kyky tulla transformoiduksi ei rajoitu yhteen ainoaan termofiiliseen lajiin. Täten ymmärretään, että käyttökelpoisuus ei rajoitu yhteen ainoaan isolaattiin tai kantaan, vaan on paremminkin lajien ryhmän ominaispiirre. Ammattimiehet ymmärtävät, että heterologisen ekspression ekspressiossa voidaan käyttää myös muita näiden lajien kantoja isolaatteja. Kunkin lajin useita kantoja on saatavissa kokoelmista laitoksista the American Type Culture Collection (ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville Maryland 20852; Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604; Fungal Genetics Stock Center (FGSC), Kansas; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Mascheroder Weg 1B,

D-3300 Braunschweig, Saksa; Institute of Applied Microbiology (IAM), Tokyo University 1-1,1-Chome, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan; Institute for Fermentation (IFO), 17-85 Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan; ja
 5 Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Oosterstraat 1, 3740 AG Baarn, Hollanti, ja niitä on saatavissa myös viljelmäkokoelmasta yhtiöstä Novo Nordisk Biotech, Davis, California.

- 10 Muiden termofiilisten sieni-isäntien fermenttoreissa käyttöön soveltuvuus voidaan määrittää helposti seuraavissa esimerkeissä kuvatuilla menetelmillä. Lyhyesti, ehdokassieniä viljellään standardikasvatusväliaineella, kuten suolat/-hiivauute, soiija, perunaproteiini, tai millä hyvänsä väliaineella, jota on täydennetty glukosilla tai muulla sopivalla
 15 hiililähteellä. Fermentointi suoritetaan pH-arvossa noin 4 - 7 ja lämpötilassa noin 37 - 50 °C, edullisesti noin 42 - 46 °C:ssa. Ymmärretään tietysti, että kontrollifermentoinnin lämpötilan pitäisi olla kontrollikannalle optimaalinen; A.
 20 oryzae'lle tämä on noin 32 - 36 °C. On mahdollista tunnistaa fermentointiin käyttökelpoiset kannat kvalitatiivisesti myseelin morfologian ulkonäköön perustuvalla tarkastuksella ravistelupulloissa; käyttökelpoisilla kannoilla nähdään myseelin löyhä, homogeeninen järjestäytyminen useilla haa-
 25 roittumispisteillä. Käyttökelpoisuuden varmistus määritetään parhaiten fermenttoreissa arvioimalla kasvatusväliaineen todellisen viskositeetin fermentoinnin eri ajankohtina. Viskositeetin määrittäminen voidaan tehdä millä hyvänsä tekniikan alalla tunnetulla tavalla, esimerkiksi Brookfield-rotatio-
 30 viskometrialla (määrätty tai rajoittamaton leikkausetaisyys ja mikä hyvänsä akselikonfiguraatiotyyppi), kinemaattisilla viskositeettiputkilla (läpivirtausputket), laskukuulaviskometrialla tai kuppityyppisellä viskometrialla. Edullisesti arviointiin otetaan mukaan A. oryzae-kanta kontrolliksi,
 35 jonka kanssa ehdokaskannan viskositeettia verrataan. Edullisilla isäntäsoluilla on noin 80 % tai alle A. oryzae-kannan identtisissä fermentointiolosuhteissa tuottamasta viskosi-

teettitasosta, edullisesti noin 50 % tai alle, ja edullisimmin noin 30 % tai alle.

Ammattimies ymmärtää, että tässä kuvatun isäntälajin menestys-
 5 tyksessä transformointi ei rajoitu erityisesti esimerkkeinä esitettyjen vektorien, promoottorien ja valintamarkkerien käyttöön. Yleisessä mielessä, ne tekniikat, jotka ovat käyttökelpoisia *A. oryzae*'n, *A. niger*'in ja *A. nidulans*'in transformoinnissa, ovat käyttökelpoisia myös keksinnön mukaisilla isäntäsoluilla. Esimerkiksi, vaikka *amdS*-valintamarkkerit ovat edullisia, muita käyttökelpoisia valintamarkkereita ovat mm., mutta näihin rajoittumatta, *argB* (*A. nidulans* tai *A. niger*), *trpC* (*A. niger* tai *A. nidulans*), *pyrG* (*A. niger* tai *A. nidulans*), *sC* (senaattiresistanssi) tai
 10 glufosinaattiresistanssi (*A. oryzae*) -markkerit, tai niiden muista lajeista olevat ekvivalentit. Promoottori voi olla mikä hyvänsä DNA-sekvenssi, jolla nähdään näissä lajeissa voimakas transkriptioaktiivisuus, ja se voi olla peräisin geeneistä, jotka koodittavat sekä solunulkoisia että solunsisäisiä proteiineja, kuten amylaaseja, ksylanaaseja, glukoamylaaseja, proteaaseja, lipaaseja, sellulaaseja ja glykolyttisiä entsyymejä. Sellaiset sopivat promoottorit voivat olla peräisin *A. oryzae*-TAKA-amylaasin, *Rhizomucor miehei*-asparagiinihappoproteinaasin, *A. niger*-glukoamylaasin, *A.*
 25 *niger*'in neutraalin α -amylaasin, *A. niger*'in happostabiilin α -amylaasin, ja *Rhizomucor miehei*'n lipaasin geeneistä. Esimerkkejä promoottoreista, jotka ovat glykolyttisten entsyymien geeneistä, ovat TPI, ADH, ja PGK. Promoottori voi myös olla homologinen promoottori, ts. promoottori geenille, joka on luontainen käytetylle isäntäkannalle. Eräs keksinnön mukainen käyttökelpoinen promoottori on *A. oryzae*'n TAKA-amylaasipromoottori. TAKA-amylaasi on eräs hyvin tunnettu α -amylaasi (Toda et al., Proc. Japan Acad. 58 Ser. B.: 208-212, 1982). Promoottorisekvenssi voidaan myös varustaa linkereillä erityisten restriktiokohtien lisäämiseksi, jotka
 35 helpottavat promoottorisekvenssin liittämistä valitun geenin kanssa tai valitun signaaliptidin tai esialueen kanssa.

Terminaattorit ja polyadenylointisekvenssit voivat myös olla peräisin samoista lähteistä kuin promoottorit. Konstruktion voidaan sisällyttää myös enhancersekvenssejä. Jotta vältettäisiin solun rikkomisen välttämättömyys ekspressöisyn tuotteen saamiseksi, ja ekspressöidyn tuotteen mahdollisen hajoamisen määrän minimoimiseksi solun sisällä, on edullista, että tuote erittyy solun ulkopuolelle. Tähän tarkoitukseen kiinnostuksen kohteena oleva geeni on eräässä edullisessa suoritumuodossa liitetty esialueeseen, kuten signaali- tai johtopeptidiin, joka voi ohjata ekspressöidyn tuotteen solun erityisreitille. Esialue voi olla peräisin mistä hyvänsä organismista eritetyn proteiinin geeneistä, tai se voi olla luonnollinen esialue. Sellaisen esialueen käyttökelpoisia lähteitä ovat mm. glukoamylaasi- tai amylaasigeeni *Aspergillus*-lajista, amylaasigeeni *Bacillus*-lajista, lipaasi- tai proteinaasigeeni *Rhizomucor miehei*'istä, α -faktorin geeni *Saccharomyces cerevisiae*'sta, tai vasikan prokymosiinigeeni. Edullisimmin esialue on johdettu *A. oryzae*'n TAKA-amylaasin, *A. niger*'in neutraalin α -amylaasin, *A. niger*'in happostabiilin α -amylaasin, *B. licheniformis*'in α -amylaasin, *Bacillus* NCIB 11837:stä olevan maltogeenisen amylaasin, *B. stearothermophilus*'in α -amylaasin tai *B. licheniformis*'in subtilisiinin geenistä. Eräs tehokas signaalisekvenssi on *A. oryzae*'n TAKA-amylaasin signaali, *Rhizomucor miehei*'n asparagiinihappoproteinaasin signaali ja *Rhizomucor miehei*'n lipaasisignaali. Eräänä vaihtoehtona voidaan myös käyttää ekspressöidylle geenille luonnollista esialuetta.

Halutun tuotteen geeni liitettynä toimintakykyisesti promoottori- ja terminaattorisekvensseihin voidaan sisällyttää vektoriin, joka sisältää valintamarkkerin, tai se voidaan sijoittaa erilliseen vektoriin tai plasmidiin, joka pystyy integroitumaan isäntäkannan genomiin. Vektorijärjestelmä voi olla yksinkertainen vektori tai plasmidi tai kaksi tai useampia vektoreita tai plasmideja, jotka yhdessä sisältävät genomiin integroitavan kokonais-DNA:n. Vektorit tai plasmidit voivat olla lineaarisia tai suljettuja rengasmaisia mo-

lekyylejä. Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan isäntä transformoidaan kahdella vektorilla, joista toinen sisältää valintamarkkerin ja toinen käsittää loput sisällytettävästä heterologisesta DNA:sta, mukaan lukien promootorin, halutun proteiinin geenin, ja transkription terminaattorin ja polyadenylointisekvenssit.

Keksinnön mukaista isäntäsolulajia voidaan käyttää ekspressoimaan mitä hyvänsä kiinnostuksen kohteena olevaa prokaryoottista tai eukaryoottista heterologista peptidiä tai proteiinia, ja edullisesti sitä käytetään ekspressoimaan eukaryoottisia peptidejä tai proteiineja. Thielavia terrestrislaji on erityisen käyttökelpoinen siinä, että se tunnetaan turvallisen taustan omaavana. Erityisen kiinnostuksen kohteena näillä lajeilla on niiden käyttö heterologisten proteiinien, erityisesti sienientsyymien ekspressiossa. Uusia ekspressiojärjestelmiä voidaan käyttää ekspressoimaan entsyymejä kuten katalaasi, lakkaasi, fenolioksidaasi, oksidaasi, oksidoreduktaasit, sellulaasi, ksylanaasi, peroksidaasi, lipaasi, hydrolaasi, esteraasi, kutinaasi, proteaasi ja muut proteolyyttiset entsyymit, aminopeptidaasi, karboksipeptidaasi, fytaasi, lyaasi, pektinaasi ja muut pektinolyttiset entsyymit, amylaasi, glukoamylaasi, α -galaktosidaasi, β -galaktosidaasi, α -glukosidaasi, β -glukosidaasi, mannosidaasi, isomeraasi, invertaasi, transferaasi, ribonukleaasi, kitinaasi, mutanaasi ja deoksiribonukleaasi. Ammattimiehet ymmärtävät, että käsitteeseen "sienientsyymit" luetaan mukaan paitsi luontaiset sienientsyymit, myös ne sienientsyymit, joita on modifioitu aminohapposubstituutioilla, -deleetioilla, -additioilla, tai muilla modifikaatioilla, joita voidaan tehdä aktiivisuuden, lämpöstabiiliuden, pH-sietokyvyn ja vastaavien ominaisuuksien parantamiseksi.

Keksinnön mukaisia isäntäsoluja voidaan käyttää myös isäntäsoluille luontaisten proteiinien yhdistelmä-DNA-tuotantoon. Esimerkkejä sellaisesta käytöstä ovat mm., mutta näihin rajoittumatta, termofiilin luontaisen proteiinin sijoit-

taminen eri promoottorin kontrollin alaiseksi proteiinin
 ekspression lisäämiseksi, kiinnostuksen kohteena olevan
 luontaisen proteiinin solun ulkopuolelle kuljetuksen joudut-
 taminen käyttämällä signaalisekvenssiä, tai kohdeisäntäsolu-
 5 jen normaalisti tuottaman proteiinin kopioluvun suurentami-
 nen. Täten keksintö käsittää käsitteen "heterologinen protei-
 iini" puitteissa homologisten proteiinien sellaisen yhdis-
 telmä-DNA-tuotannon, sellaisessa laajuudessa, että sellai-
 seen ekspressioon liittyy geenielementtien käyttö, jotka eivät
 10 ole isäntäsolulle luontaisia, tai luontaisten elementtien
 käyttö, jotka on käsitelty toimimaan tavalla, jota ei nor-
 maalistä nähdä isäntäsolussa.

Kuten edellä mainittiin, Thielavia terrestris on, erinomai-
 15 sesta morfologiastaan johtuen, yhdistelmä-DNA-proteiinin-
 tuotantoon käytettävien edullisten lajien joukossa. Myös
 tällä lajilla tapahtuu kuitenkin submerssiviljelmässä kasvua
 rajoittavissa oloissa (joko glukoosia tai happea) biomassan
 menetystä, joka johtuu itiöimisestä. Erityisesti, ferment-
 20 toinnin varhaisvaiheiden aikana tuotettujen myseelien suuret
 määrät voivat kadota nopeasti, ja voi ilmaantua suuret mää-
 rät itiöitä. Koske myseelit ovat yhdistelmä-DNA-proteiinien
 tuotannon lähde, itiöimisen välttäminen viljelmässä on toi-
 vottavaa. Tähän tarkoitukseen eristetään itiöimätön Thiel-
 25 a-via-mutantti. Itiöitä altistetaan UV-valolle, ja kasvatetaan
 5 päivän ajan. Sitten myseelit levitetään levyille, ja inkuboidaan
 24 tunnin ajan. Valitaan 8 suurinta koloniaa, olet-
 taen, että myseelifragmentit kasvavat nopeammin kuin itiöt,
 joiden on idettävä ensin, ja testataan ravistelupulloissa.
 30 Kahdessa koloniassa kahdeksasta ei nähdä itiöintiä submers-
 siviljelmässä, mikä osoittaa, että tämä on käyttökelpoinen
 lähestymistapa itiöimättömien kantojen tuottamiseen, mikäli
 tarvetta syntyy.

35 Keksintöä kuvataan edelleen seuraavilla ei-rajoittavilla
 esimerkeillä.

I. Termofiilien ravistelupulloarviointi

Ravistelupulloissa käytetään ASPO4-väliainetta, jolla on seuraava koostumus, vaihtelevalla hiililähteellä:

	Hiivauute	2 g/l
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l
	CaCl ₂	1 g/l
	KH ₂ PO ₄	5 g/l
	Sitruunahappo	2 g/l
	Hivenmetallits*	0,5 ml/l
10	Urea	1 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l

* sisältää 14,3 g/l ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, 0,5 g/l
 15 NiCl₂·6H₂O, 13,8 g/l FeSO₄·7H₂O, 8,5 g/l MnSO₄·H₂O, ja 3 g/l
 sitruunahappoa

Käytetään väliseinättömiä propyleeniravistelupulloja (100-
 tai 500-ml), joita ravistellaan nopeudella 200 r/min lämpö-
 20 tilassa 42 - 44 °C, pH 4,5.

Joukko termofiilisiä kantoja seulotaan ravistelupulloissa
 seuraavien ominaispiirteiden suhteen: (1) kasvun kiivaus;
 (2) proteaasintuotanto; (3) erittyneet proteiinit; ja (4)
 25 myseelin morfologia. Proteaasiaktiivisuuden määrittämiseksi
 kustakin kasvatusliemestä olevaa supernatanttia sentrifugoi-
 daan 5 min ajan nopeudella 2500 r/min, ja käytetään kaseii-
 nikirkastuslevymäärityksessä, jossa määritetään yhdistelmä-
 DNA-proteiiniekspression mahdollisina ehdokkaina arvioitujen
 30 eri sienilajien tuottamien proteaasien tasot.

Kaseiinilevykirkastusmääritys suoritetaan seuraavalla taval-
 la. Levyväliaine koostuu määrästä 20 g/l kuorittua maitoa,
 20 g/l agarosia ja 0,2 M sitraatti/fosfaatti-puskuria tes-
 35 tejä varten, jotka ajetaan pH-arvossa 5 ja pH-arvossa 7, ja
 glysiini/NaOH-puskuria testejä varten, jotka ajetaan pH-
 arvossa 9. Maitojauhe sekoitetaan 100 ml:n kanssa puskuria,

ja pidetään 60 °C:ssa. Agarosis sekoitetaan 400 ml:n kanssa puskuria, ja autoklavoidaan 5 min ajan. Hieman jäähtymisen jälkeen lisätään lämmin maitoseos, ja seos käännetään varovasti 2 - 3 kertaa sekoittamiseksi. Väliaine kaadetaan 150-
 5 mm:isille levyille käyttäen 50 - 70 ml/levy, ja säilytetään käyttöön asti 5 °C:ssa.

Juuri ennen käyttöä, agariin tehdään 12 reikää/levy. Kunkin pH-arvon omaavaan yhteeseen levyyn lisätään 25 µl supernatant-
 10 tia kunkin kannan fermentoinnista, ja inkuboidaan yön yli 37 °C:ssa. Levyille, joilla pH-arvo on 9, lisätään 0,5 M jää-
 etikkaa kaseiinin saostamiseksi ja kunkin kirkkaan vyöhyk-
 keen visualisoinnin sallimiseksi. Sitten kukin levy arvioid-
 saan kirkkaan vyöhykkeen koon suhteen (ts. vyöhykkeen puut-
 15 tumisesta halkaisijaan >2 cm) ja vyöhyketyypin suhteen (ts. kirkas, samea tai molempia tyyppisiä).

Kunkin kannan supernatantteja käytetään myös kantojen so-
 lunulkoisen proteiinintuotannon arvioimiseen. Proteiinipro-
 20 fiilin määritykseen käytetään Novex 8- - 16-% SDS-polyakryy-
 liamidigradienttigateejejä, jotka on valmistettu valmistajan
 ohjeiden mukaan. 40-µl:inen (48 tuntia) kasvatussupernatan-
 tin näyte sekoitetaan 10 µl:n kanssa 5X liuotuspuskuria
 (liuotuspuskuri = 4 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8, 1 g SDS, 617 mg
 25 ditiotreitolia, ja steriiliä tislattua vettä 10 ml:aan), ja
 glyseroli/bromifenolisinin kanssa (10 - 20 mg lisättynä
 noin 10 ml:aan 80- - 90-%:ista glyserolia, ja lisätty kiehu-
 vaan veteen 1 - 2 tunniksi liuottamiseksi), keitetään 5 min
 ajan, jäähdytetään, lisätään ja ajetaan jännitteellä 120 V,
 30 kunnes bromifenolisininen jälkienseurausväri saavuttaa gee-
 lin pohjan. Geelit värjätään Coomasie-kirkkaansinisellä.
 Niitä isolaatteja, joilla nähdään suuret joukot vyöhykkeitä,
 pidetään vähemmän sopivina mahdollisina uusina isäntinä.

35 Kasvu arvioidaan kvalitatiivisesti, asteikolla + → +++.
 Morfologia arvostellaan seuraavasti: 1 - pitkiä tiiviitä
 vuorovaikutuksessa olevia hyyfejä, joissa on hyvin vähän

haaroittumista; 2 - useita konidioitiöitä, hyvin selvällä haaroittumisella; 3 - ohuita, pitkiä, suoria hyyfejä, joilla on jonkin verran haaroittumista; 4 - paksuja, lyhyitä, epä-säännöllisiä hyyfejä, joissa on runsaasti haatoitusta; 5 - löyhää myseeliä, jossa on hyvin selvää haaroitusta; 6 - löyhää haaroittunutta myseeliä, jolla on hyvin homogeeninen myseelin jakautuminen; 7 - pitkiä tiiviisti vuorovaikutuksessa olevia hyyfejä, joissa on jonkin verran haaroitusta. Morfologioita 5 ja 6 pidetään toivottavimpina.

10

Suoritetaan ravistelupulloissa viisi koetta, joissa vaihdellaan hiililähteen identiteettiä ja määrää seuraavalla tavalla: (1) maltodekstriiniä 10 g/l; (2) glukoosia 10 g/l; (3) maltodekstriiniä 20 g/l; (4) 10 g/l Avicell'ia + 1 g/l glukoosia [sellulaasien indusoimiseksi]; (5) 30 g/l maltodekstriiniä + 10 g/l glukoosia. Testattujen lajien isolaatit, yhdessä tai useassa kokeessa, ovat: *Talaromyces emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *Thielavia terrestris*, *Thermoascus thermophilus*, *T. aurantiacus*, *Malbranchea sulfurea*, *Melanocarpus albomyces*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Acremonium alabamense*, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Mucor pusilus*, *Myceliophthora thermophila*, ja *Scytalidium thermophilum*. Useilla näistä kannoista on käyttökelpoinen morfologia ja voimakas kasvu yhdessä tai useassa edellä määritellyistä koeolosuhteista. Testatuissa oloissa, mikään testatuista kannoista ei eritä korkeita (>1 g/l) tasoja mitään proteiinia, ja niillä katsotaan olevan puhdas proteiinitausta. Useilla kannoista nähdään korkea proteaasiaktiivisuus (esimerkiksi, *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*) ja jotkin kasvavat hyvin huonosti testatuissa kasvuolosuhteissa (esimerkiksi, *Malbranchea sulfurea*). Mitään näistä kannoista ei testattu edelleen.

Arvioinnin kuluessa määritetään itiöinnin laajuus submerssiviljelmässä ja levyillä. Kyky itiöidä levyillä on käytännöllisesti katsoen välttämätöntä käyttökelpoisessa isäntäsolussa. Kiinnostavista lajeista kummallakaan *Thielavia terrestris*

- ris'ista tai Myceliophthora thermophila'sta ei nähdä lainkaan itiöitä normaaleilla sieniarleveyillä. Sitten näille kahdelle lajille kehitetään itiönmuodostusmenetelmiä. Myceliophthora'a varten myseeliä kasvatetaan ensin perunadekstroosiagar(PDA; Difco) -levyillä 37 °C:ssa 48 tuntia, sitten kasvatetaan yön yli 50 °C:ssa, sitten kasvatetaan vielä 24 - 48 tuntia 37 °C:ssa. Lämpötilastressi ilmeisesti laukaisee itiöinnin tässä lajissa.
- 10 Thielavia'lla itiöinti levyillä voidaan indusoida inkubamalla myseeliä ensin PDA-levyillä 3 päivän ajan 37 °C:ssa inkubointihuoneen normaalissa ilmakehässä. Sitten viljelmä sijoitetaan 1-l:iseen Pyrex®-astiaan, jota huuhdotaan N₂-kaasulla, suljettuna muovikääreellä, ja palautetaan 48 tunniksi huoneeseen, jonka lämpötila on 37 °C. Levy poistetaan astiasta huoneen normaaliin ilmakehään ja jätetään inkuboitumaan 1 viikoksi. Levyllä kehittyy esi- ja jälki-N₂-käsittelykasvun välillä likaisenvalkoisten itiöiden rengas. Ilmeisesti tämän itiöinnin laukaisee happistressi.
- 20 Happirajoitus, samoin kuin glukoosirajoitus, laukaisee myös Thielavia'n itiöinnin submerssiviljelmässä. Itse asiassa sellaista itiöintiä tapahtuu spontaanisti 3 - 4 päivän kulu-
luttua ASPO₄-väliaineessa, jossa on 20 g/l glukoosia. Fer-
mentointioloissa tämä itiöinti on kuitenkin ei-toivottavaa,
25 koska myseelin biomassa katoaa nopeasti ja korvautuu itiöillä, alentaen täten tuottavuutta. Tämän ongelman voittamiseksi, Thielavia terrestris E373:sta luodaan itiöimätön kanta. Ravistelupulloa, jossa on 10⁶ UV:lle altistettua (30-s altistuksen johtaessa 40-%:iseen kuolemaan) itiötä/ml väli-
30 ainetta (ASPO₄, jossa on 2 g/l glukoosi) kasvatetaan 5 päivän ajan 42 °C:ssa. Tämän viljelmän myseeliä laimennetaan 0,1-%:iseen Tween-liuokseen, joka on levitetty PDA-levyille, ja inkuboidaan 24 tunnin ajan 42 °C:ssa. 8 suurinta Poimitaan 8 suurinta koloniaa, olettaen, että myseelifragmentit
35 kasvavat nopeammin kuin itiöt, joiden on ensin idettävä. Valitut koloniat siirretään ravistelupulloihin; valituista

kahdeksasta koloniasta kaksi ei itioöi lainkaan näissä submerssiviljelmissä, kun taas kuudella muulla nähdään jonkin asteista itiöintiä.

- 5 Alustavaan tutkimukseen tankkifermentoinnissa valitaan Thielavia terrestris (kannat E373 ja ATCC 20627), Myceliophthora thermophila (kanta A421), Sporotrichum cellulosophilum (kanta ATCC 20493) ja Thermoascus thermophilus (kannat 2050 ja CBS 759.71), Mucor pusilus (kanta A209), Acremonium alabamense
 10 (A2082), Talaromyces emersonii (kanta A577). Kannat, jotka on merkitty kirjaimella "A", ovat saatavissa viljelmäkokoelmasta yhtiöstä Novo Nordisk A/S, Bagsverd, Tanska; kannat, jotka on merkitty kirjaimella "E", ovat saatavissa viljelmäkokoelmasta yhtiöstä Novo Nordisk Entotech, Davis, California.
 15

II. Fermenttoriarviointi

Tankkifermentoinnissa käytetty väliaine on seuraava:

	<u>Erä</u>
20	MgSO ₄ ·7H ₂ O 2 g/l
	KH ₂ PO ₄ 5 g/l
	Sitruunahappo·1H ₂ O 4 g/l
	Hiivauute 10 g/l
	NH ₄ sulfaatti 10 g/l
25	CaCl ₂ 2 g/l
	AMG-hivenainemetallit* 0,5 ml/l
	Pluronic 1 ml/l
	*sisältää ZnSO ₄ ·7H ₂ O 14,3 g/l; CuSO ₄ ·5H ₂ O 2,5 g/l; NiCl ₂ ·6H ₂ O 0,5 g/l; FeSO ₄ ·7H ₂ O 13,8 g/l; MnSO ₄ ·H ₂ O 8,5 g/l; sitruunahappo 3,0 g/l
30	

Käytetään vesijohtovettä, ja pH säädetään happamaan pH-arvoon 6 ennen autoklavointia.

- 35 Hiililähde: 50 % glukoosia lisätään tasolle 100 g/l alkupe-
 räisen tilavuuden (2 l) perusteella

Fermentointi suoritetaan 42 - 46 °C:ssa, pH-arvossa 5,0, ± 0,1, säädettynä H₃PO₄:llä tai NaOH:lla. Käytetään Applicon-fermenttoreita, joilla on kasvatettu siipirataskoko. Liuenneen hapen (DOT) konsentraatio pidetään tasolla >20 % kyl-
 5 lästyskonsentraatiosta ilmastusnopeudella 1 tilavuus/tila-
 vuus/min ja sekoitusnopeudella välillä 800 - 1400 r/min.

Biomassakonsentraatio arvioidaan kuivana solupainona. 20 ml viljelmiä suodatetaan ennalta punnitteujen 20-µm:isten mem-
 10 braanien läpi. Suodatinkakut pestään kahdesti H₂O:lla, kui-
 vataan 48 tuntia 96 °C:ssa, ja punnitaan. Viskositeetti mää-
 ritetään Bohlin Reologi, Inc. "Visco 88"-laitteella, joka on
 varustettu "C14" kuppi-ja sylinteri-järjestelmällä. Järjes-
 telmä asetetaan asemaan "1", ja nopeus asetetaan arvoon "8".
 15 Tämä pyörittää sylinteriä kupin sisällä nopeudella 1000
 r/min ja saadaan leikkausnopeus 1222/s. Koko kasvatusnäyt-
 teet poistetaan fermenttoreista, ja mitataan 2 min sisällä
 huoneenlämpötilassa olevalla laitteistolla. Noin 10 ml näy-
 tettä pannaan kuppiin, joka puolestaan on kiinnitetty Visco
 20 88:aan, jonka sylinteri on täysin upoksissa. Merkitään muis-
 tiin alkuperäinen viskositeettilukema, joka saadaan sekun-
 tien sisällä sylinterin pyörimisen alusta.

Kuusi kantojen *T. terrestris* E373 ja ATCC 20627, *M. ther-*
 25 *mophila* 421, *S. cellulophilum* ATCC 20493, *T. thermophilus*
A2050 ja *A. oryzae* A1560 (kontrolli) fermentointiajoa ana-
 lysoidaan viskositeetin suhteen. Kaikki ajot ovat eräfermen-
 tointwja, joissa on 100 g/l glukoosia pH-arvossa 5 ja sekoi-
 tusnopeudella 1100 r/min. Termofiilisiä kantoja kasvatetaan
 30 42 °C:ssa, ja *A. oryzae*'ta kasvatetaan 37 °C:ssa. Tiedot
 esitetään taulukossa 1, jossa esitetään viskositeetti-arvot
 yksikössä Pa; mitä alhaisempi viskositeetti Pascal-yksikössä
 on, sitä vähemmän viskoosi viljelmä on. Mitatut viskositeet-
 tiarvot ovat tuoreille näytteille, jotka on mitattu reomet-
 35 rissä ensimmäisten testaussekuntien aikana. Ekstrapoloidut
 viskositeetti-arvot, joissa verrataan kantoja tasolla 30 g/l
 biomassaa, esitetään kuviossa 1.

Taulukko 1. Termofiilien viskositeettien vertailu

	Kanta	Aika (tuntia)	Biomassa (g/l)	Vis- kositeetti (Pascal)
5	Aspergillus oryzae, A1560	24	34,1	0,473
		43,5	36,9	0,399
		51,5	27,6	0,217
	Thielavia ter- restris, E373	24	28,2	0,028
		43,5	33,5	0,013
10	Myceliophthora thermophila, A421	24	20,8	0,045
		43,5	30,3	0,094
		51,5	27,8	0,035
	Sporotrichum cellulophilum, ATCC 20493	17,5	22,2	0,065
		24	30,0	0,096
		40	46,8	0,144
15	Thielavia terrestris, ATCC 20627	47	52,9	0,178
		24	6,1	0,018
		40	51,1	0,016
	Thermoascus thermophilus, A2050	24	17,4	0,025
		40	22,4	0,037
		71,5	31,6	0,042
20		112	36,6	0,053

Kuten tiedot osoittavat, selvästi viskoosein kanta on A. oryzae-kontrollikanta. Vähiten viskooseja kantoja ovat kaksi Thielavia-kantaa. Nämä kannat havaitaan helposti sekoitettaviksi ja ilmastettaviksi fermenttoreissa, ja niillä nähdään hyvin homogeenisesti dispergoitu myseeli, joka muodostaa löyhää rakennetta tiiviisti assosioituneista, hyvin haaroituneista myseeleistä, jotka katkeavat jatkuvasti kasvun aikana. Ei muodostu suuria pellettejä eikä aggregaatteja.

Myceliophthora-kanta on hyvin samanlainen kuin Thielavia, mutta sillä saadaan pitkänomainen ja vähemmän haaroittunut kasvumuoto, antaen tulokseksi hieman suuremman viskositeetin. Mittauksia Acremonium'illa ei saada, mutta ulkonäköön perustuva tarkastus osoittaa, että sillä on samanlainen morfologia ja viskositeetti kuin Thielavia'lla. Myös Thermoascus'illa nähdään hyvä morfologia, samanlainen kuin Thielavia'lla. Myös Sporotrichum on morfologisesti hyvä, mutta se tuottaa suuret määrät vihreää pigmenttiä ja alkaa liueta näissä fermentointiolosuhteissa. Mucor pusilus tuottaa optimaalista morfologiaa huonomman morfologian, yhdellä suurella myseelikakulla, eikä sitä analysoida edelleen. Myöskään Talaromyces'tä ei tutkita edelleen, koska se tuottaa suuremmat määrät proteaasiaktiivisuutta kuin muut kannat. Taulukossa 2 esitetään fermenttorissa testatuille kannoille tiedot kasvunopeuksista, jotka on mitattu biomassakonsentraatioilla 2 - 15 g/l, ja proteaasituotannosta. Kasvunopeus arvioidaan kasvukäyrästä, jossa nähdään lähes lineaarinen biomassan lisäys 2 - 15 g/l kuivaa biomassakonsentraatiota (biomassa määritetään suodattamalla, kuivaamalla ja punnitsemalla suodattimelle jäljelle jäävän myseelin.

Taulukko 2. Kasvunopeus ja proteaasinmuodostus glukoosieräfermentoinneissa pH-arvossa 5 ja 42 °C:ssa

Kanta	Kasvunopeus suhteessa A. oryzae'en	Proteaasintuotanto
Thermoascus thermophilus	1X	alhainen proteaasi
Mucor pusilus	2,5X	hyvin runsas proteaasi (kaikki)
Myceliophthora thermophila	1X	hyvin runsas alkalinen proteaasi
Thielavia terrestris	3X	runsas hapan proteaasi
Acremonium alabamense	3X	runsas hapan proteaasi
Talaromyces emersonii	1X	hyvin runsas proteaasi (pääasiassa hapan)
Sporotrichum cellulophilum	2X	hieman proteaasia (pääasiassa hapanta)

Eräs toinen menetelmä sienimorfologian arviointiin ja sen määrittämiseen, kuinka sovelias se on submerssitankkifermentointiin, on yrittää saada hyvin suuren biomassakonsentraa-

tion. Yksisoluisilla organismeilla, kuten *E. coli*lla ja *S. cerevisiae*'lla on mahdollista saavuttaa biomassakonsentraatio lähes 100 g/l, mutta sienillä on hyvin vaikeaa saavuttaa taso yli 75 g/l. Yläraja (joka johtuu suuresta viskositeetista ja hapenkuljetuksen puutteesta) *A. oryzae*'lla ja *A. niger*'illä on noin 50 - 60 g/l. Thielavia terrestris E373 ja edellä kuvattu itiöimätön mutantti testataan submerssiviljelmässä. Fermentointi suoritetaan happamassa pH-arvossa 5,42 °C:ssa ja välaineessa, jolla on kaksinkertainen vahvuus verrattuna aikaisemmin kuvattuun eräväliaineeseen (200 g/l glukoosia). Itiöimätön mutantti saavuttaa biomassan noin 90 g/l 140 tunnin jälkeen (kuvio 3). Tämä on epätavallisen korkea biomassakonsentraatio sienifermentoinnissa, ja osoittaa selvästi tämän tyyppisen morfologian omaavien kantojen ylivoimaisuuden.

II. Heterologisten geenien ekspressio termofiileissä

A. Valittavissa olevat markkerivektorit. Käytetään isäntäsolujen transformointiin vektoria pJaL77, jolla on hygromysiini B-resistanssi-valittava markkeri. Tämä markkeri perustuu *E. coli*-hygromysiini B-fosfotransferaasigeeniin, joka on TAKA-promoottorin kontrollin alainen. Lyhyesti, vektori konstruoidaan seuraavalla tavalla. Hygromysiini B-resistenssin antava geeni ostetaan yhtiöstä Boehringer Mannheim plasmidina pPh-1. Tämä geeni varustetaan PCR:llä ATG-kodonilla samoin kuin sopivilla restriktiokohdilla amino- ja karboksiterminaalisisä päissä, käyttäen alukkeita: 5'-GCT CAG AAGCTT CCATCC TAC ACC TCA GCA ATG TCG CCT GAA CTC ACC GCG ACG TCT-3' (N-terminaalinen) ja 3'-CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG CTCCAG AGATCT CAT GCT-5' (C-terminaalinen). PCR-fragmentti katkaistaan restriktioentsyymeillä BamHI ja XhoI, ja kloonataan *Aspergillus*-ekspressiovektorissa pToC68 (joka kuvataan julkaisussa WO 91/17243) oleviin vastaaviin kohtiin, jolloin muodostuu pJaL77.

35

Plasmidi pToC90, joka sisältää amdS-markkerin, konstruoidaan kloonamalla 2,7-ke XbaI-fragmentin p3SR2:sta (Hynes et al.

Mol. Cell. Biol. 3(8): 1430-1439, 1983) XbaI:lla katkaistuun ja defosforyloituun pUC19-plasmidiin.

B. Ekspressiovektori. Vektori pHD414 on plasmidin p775 (EP
 5 238 023) johdannainen. Vastakohtana tälle plasmidille,
 pHD414:ssä on ainutlaatuisten restriktiokohtien ketju TAKA-
 promoottorin ja AMG-terminaattorin välissä. Plasmidi konst-
 ruoidaan poistamalla noin 200 emäsparia pitkän fragmentin
 (joka sisältää ei-toivottuja RE-kohtia) terminaattorin 3'-
 10 päästä, ja poistamalla seuraavaksi noin 250 emäsparia pit-
 kän fragmentin promoottorin 5'-päästä, joka myös sisältää
 ei-toivottuja kohtia. 200 emäsparin alue poistetaan kat-
 kaisemalla NarI:llä (sijaitsee pUC-vektorissa) ja XbaI:llä
 (juuri 3'-suuntaan terminaattorista), täyttämällä muodostu-
 15 neet päät seuraavaksi Klenow-DNA-polymeraasilla + dNTP:llä,
 puhdistamalla vektorifragmentin geelillä, ja liittämällä
 vektorifragmentin uudelleen. Tätä plasmidia kutsutaan nimel-
 lä pHD413. pHD413 katkaistaan StuI:llä (sijaitsee promootto-
 rin 5'-päässä) ja PvuII:lla (pUC-vektorissa), fraktiooidaan
 20 geelillä ja liitetään uudelleen, jolloin saadaan tulokseksi
 pHD414. E. coli-kanta, joka sisältää noin 1 100 emäsparin
 ksylanaasi-HindII/XbaI-cDNA-fragmentin pYES:issä, on talle-
 tettu kansainväliseen talletuslaitokseen DSM tulonumerolla
 DSM 6995. Ksylanaasi-cDNA-fragmentti eristetään klooneista
 25 yhdestä katkaisemalla HindIII/XbaI:llä. Fragmentti puhdiste-
 taan agarosigeelielektroforeesilla, elektroeluoidaan, ja
 tehdään valmiiksi liitosreaktioita varten. cDNA-fragmentti
 liitetään pHD414:ään, jolloin muodostuu pAXX40-1-1, joka on
 talletettu kansainväliseen talletuslaitokseen Agricultural
 30 Research Service Culture Collection tulonumerolla NRRL B-
 21164. Ksylanaasigeeni on talletettu tulonumerolla DSM
 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
 GmbH) 6995.

III. Termofiilisten isäntien transformointi

Kaikkien testattujen kantojen transformointiin käytetään seuraavia yleismenettelytapoja, mainiten poikkeukset nimenomaisesti:

- 5 100 ml MY51-väliainetta (maltodekstriini, 30 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l; K_2PO_4 , 10 g/l, K_2SO_4 , 2 g/l; sitruunahappoa, 2 g/l; hiiuvauute, 10 g/l; AMG-hivenainemetalleja, 0,5 ml; ureaa 1 g/l; $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$, 2 g/l, pH 6,0) siirrostetaan transformoitavan kannan myseelipaloilla (2 cm halkaisija),
- 10 ja inkuboidaan ravistellen 42 °C:ssa 14 tunnin ajan. Myseeli kerätään suodattamalla "miracloth"-suodattimen läpi, ja pestään 200 ml:lla 0,6 M MgSO_4 :ää. Myseeli suspendoidaan 15 ml:aan 1,2 M MgSO_4 :ää, 10 mM NaH_2PO_4 , pH = 5,8. Suspensio jäähdytetään jäällä, ja lisätään 1 ml puskuria, joka sisältää 120 mg Novozyme® 234:ää. 5 min kuluttua lisätään 1 ml 12
- 15 mg/ml BSA:ta (Sigma-tyyppi H25), ja inkubointia varovasti sekoittaen jatketaan 1 - 3 tunnin ajan, riippuen kannasta, 30 °C:ssa, kunnes suuri joukko protoplasteja on on näkyvissä näytteessä, jota tarkastellaan mikroskoopin alla. Acre-
- 20 monium'illa ja Thielavia'lla, protoplastinmuodostustehokkuus on suhteellisen alhainen, ja nämä kannat vaativat pitemmät inkubointiajanjaksot (2 - 3 tuntia), kunnes saadaan transformointiin riittävästi protoplasteja.
- 25 Suspensio suodatetaan "miracloth"-suodattimen läpi, suodos siirretään steriiliin putkeen, ja päällystetään 5 ml:lla 0,6 M sorbitolia, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,0. Sentrifugoidaan 15 min ajan nopeudella 2500 r/min, ja protoplastit kerätään MgSO_4 -kerroksen päältä. Protoplastisuspensioon lisätään kak-
- 30 si tilavuutta STC:tä (1,2 M sorbitolia, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl_2), ja seosta sentrifugoidaan 5 min ajan nopeudella 2500 r/min. Protoplastipelletti suspendoidaan uudelleen 3 ml:aan STC:tä, ja pelletöidään uudelleen. Tämä toistetaan, ja sitten protoplastit suspendoidaan uudelleen
- 35 0,2 - 1 ml:aan STC:tä.

- 100 μ l protoplastisuspensiota sekoitetaan 5 - 25 μ g:n kanssa sopivaa DNA:ta 10 μ l:ssa STC:tä. Kukin kanta kotransformoidaan pAXX40-1-1:llä ja plasmidilla, joka sisältää valittavissa olevan markkerin. Plasmidi pToC90 sisältää A. nidulans-amdS-geenin, ja sitä käytetään transformointiin ja kasvun suhteen valintaan asetamidilla ainoana tyypilähteenä. Plasmidia pJaL77 käytetään transformointiin ja hygromysiini B-resistenssin (150 μ g/ml) suhteen valintaan.
- 10 Seosten annetaan seistä huoneenlämpötilassa 25 min ajan. Lisätiin 0,2 ml 60-%:ista PEG 4000:tta (BDH 29576), 10 mM CaCl_2 :ta ja 10 mM Tris-HCl:ää, pH = 7,5, ja sekoitetaan varovasti kahdesti, ja lisätään lopulta 0,85 ml samaa liuosta, ja sekoitetaan varovasti. Seoksen annetaan seistä huoneen-
- 15 lämpötilassa 25 min ajan, sentrifugoidaan 2500 X g:llä 15 min ajan, ja pelletti suspendoidaan uudelleen 2 ml:aan 1,2 M sorbitolia. Vielä yhden sedimentoinnin jälkeen protoplastit levitetään sopiville levyille. Protoplastit levitetään mini-maalisille levyille (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113: 51-
- 20 56, 1966), jotka sisältävät 1,0 M sakkaroosia, pH = 7,0, 10 mM asetamidia tyypilähteenä (kun amdS on valintamarkkeri) ja 20 mM CsCl taustakasvun estämiseksi. Väliaine poikkeaa hygB on valintamarkkeri siinä, että käytetään 10 mM natriumnitraattia tyypilähteenä, ja läsnä on 150 μ g/ml hygromysiini
- 25 B:tä. Valintalevyjä inkuboidaan 42 °C:ssa 5 päivän ajan. Kaikki transformantit, jotka kasvavat COVE-valintaväliaineella, siirretään COVE II(COVE-väliaine ilman kalsiumkloridia ja sakkaroosikonsentraatiolla 30 g/l)-levyille, jotka sisältävät AZCL-ksylaania (0,2 %) ja vastaavaa valinta-
- 30 netta. Kotransformantit tunnistetaan sinisen ympäröivän renkaan nopealla muodostuksella sienikoloniassa ja sen ympärille. Transformointikoekiden tulokset ja tunnistettujen kotransformanttien lukumäärät esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3. Termofiilien transformoinnin tulokset

Kanta	Valinta	Transformanttien lukumäärä	Kotransformanttien lukumäärä
Myceliophthora	amdS HygB	42 0	18 0
Sporotrichum	amdS HygB	35 0	15 0
Thielavia	amdS HygB	18 0	4 0
Acremonium	amdS HygB	23 0	10 0

Hygromysiinivalinta ei onnistu missään tutkituista termofiil-
 lisistä sienistä johtuewn luultavasti siitä, ettei promoot-
 10 tori ole tehokas näissä kannoissa. amdS-valinnalla transfor-
 mantteja saadaan kuitenkin kaikilla kannoilla paitsi Thermo-
 ascus'illa. Kotransformointitaajuus on välillä 20 - 40 %.

D. Ksylanaasiekspression arviointi transformanteissa

15 Kaikki ksylanaasilevymäärytyksillä tunnistetut kotransfor-
 mantit alistetaan ravistelupulloarvioinnille ksylanaasituot-
 tavuuden suhteen. Käytetään M401-väliainetta, jolla on seu-
 raava koostumus (g/l): maltodekstriini, 50,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
 2,0; KH_2PO_4 , 2,0; sitruunahappo, 4,0; hiivauute, 8,0; AMG-
 20 hivenmetalliliuosta, 0,5 ml; ammoniumsulfaatti, 2,0; urea,
 1,0. Viljelmiä kasvatetaan 42 °C:ssa ja ksylanaasiaktiivi-
 suus mitataan päivittäin alkaen 24 tunnista. Ksylanaasiak-
 tiivisuus kasvatusliemissä määritetään käyttämällä 0,2 %
 AZCL-ksylaania (Megazyme Co. Australia) suspendoituna sit-
 25 raatti/fosfaatti-puskuriin, pH 6,5. Kasvatusneste laimenne-
 taan, tavallisesti 100-kertaisesti, ja 10 μl laimennettua
 kasvatusnestettä sekoitetaan 1 ml:n kanssa 0,2 % AZCL-ksy-
 laanisubstraattia. Seosta inkuboidaan 42 °C:ssa 30 min ajan.
 Reaktioseos sekoitetaan hyvin joka 5. min. Inkuboinnin lo-
 30 pussa sulamaton substraatti saostetaan sentrifugoimalla
 nopeudella 10 000 r/min 5 min ajan. Tästä substaatista va-
 pautunut sininen väri kvantisoidaan absorbanssilla 595
 nm:llä, ja kasvatusliemissä oleva entsyymiaktiivisuusmäärä
 lasketaan standardista, joka on tehty entsyymivalmisteesta,

jolla on tunnettu aktiivisuus. Endoksykanaasiyksikkö (EXU) määritetään suhteessa entsyymistandardiin, joka on valmistettu identtisissä oloissa. Myös transformoimattomia kantoja kasvatetaan identtisissä oloissa, ja verrataan transformant-

5 tien kanssa.

Kuviossa 2 esitetyt tiedot (perustuvat aktiivisuushuippuun) osoittavat, että kaikki transformoimattomat kannat tuottavat ksykanaasiaktiivisuutta hyvin alhaisilla tasoilla, kun taas

10 jotkin transformanteista tuottavat jopa 5- - 10-kertaisesti suuremman aktiivisuuden kuin transformoimattomat kannat. Käytetyn kasvatusväliaineen SDS-PAGE-analyysi paljastaa 22-kD Humicola-ksykanaasiproteiininvyöhykkeen läsnäolon vain transformanteissa, vaikkakin hyvin alhaisilla tasoilla. Tämä

15 kuvaa heterologisten geenien ekspression potentiaalia termofiilisissä sienissä. Ksykanaasintuotto on samaa luokkaa kuin Myceliophthora-Sporotrichum-Acremonium-Thielavia-suvuilla.

E. Transformoinnin ja ekspressiovektoreiden integroitumisen

20 varmistus

Jotta osoitettaisiin kiistattomasti ekspressiovektoreiden transformointi ja integroituminen, suoritetaan "southern"-hybridisointianalyysijä käyttämällä kokonais-DNA:ta, joka on eristetty kustakin transformoimattomasta kannasta ja kunkin

25 kannan valituista transformanteista. Kunkin kannan kaksi parasta transformanttia valitaan "southern"-hybridisointianalyysiin. Näistä kannoista eristetty kokonais-geeni-DNA sulatetaan EcoRI:llä, DNA-fragmentit erotetaan 1-%:isen agarosigeelin läpi, ja siirretään täplät. Koska Thielavia

30 ja Acremonium edustavat saman kanssa täydellistä ja epätäydellistä vaihetta, vain Acremonium'ista olevaa DNA:ta käytetään hybridisointikokeisiin. Ensin, täplä kokeillaan Aspergillus nidulans-amdS-geenillä, transformointiin käytetyllä valintamarkkerilla. Tulokset osoittavat amdS-geenin läsnä-

35 olon vain transformanteissa, mutteivät transformoimattomissa negatiivisissa kontroleissa. Saman täplän uudelleen koetus, amdS-koettimen poistamisen jälkeen, Humicola insolens-ksy-

naasi-cDNA:n 1,2 kiloemäksen HindIII- ja XhoI-fragmentilla antaa seuraavat tulokset: Vain Acremonium-transformantit, muttei mikään transformoimaton kanta, osoittavat H. insolens-cDNA-hybridisoivien vyöhykkeiden läsnäolon. Transformoimattomat Myceliophthora ja Sporotrichum samoin kuin niiden transformantit osoittavat koettimeen hybridisoituvan noin 2 kiloemäksen vyöhykkeen läsnäolon probe (osoittaen mahdollisesti H. insolens-ksylanaasigeenin kanssa homologiaa omaavien DNA-sekvenssien läsnäolon näissä kannoissa), kun taas transformanteilla nähdään lisäksi suurimolekyyli-

5

10

massaiset vyöhykkeet, jotka hybridisoituvat tähän koettimeen.

Patenttivaatimukset

1. Termofiilinen yhdistelmä-DNA-sieni-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on suvun Tkielavia, Acremonium, Hyceliopbehora tai Sporoderichum jäsen, joka käsittää nukleiinihapposekvenssin, joka koodittaa heterologista proteiinia.
5
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että sekvenssi on toimintakykyisesti liittynyt promoottoriin.
10
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että proteiini on sieniproteiini.
- 15 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että promoottori on sienipromoottori.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että promoottori on promoottoreita, joka on A. oryzae'n TAKA-amylaasista, Rhizomucor miehei'n asparagiinihappoproteinaasista, A. niger'in glukoamylaasista, A. niger'in neutraalista α -amylaasista, A. niger'in happostabiliista α -amylaasista, tai Rhizomucor miehei'n lipaasista.
20
- 25 6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että proteiini on sienientsyymi.
7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on katalaasi, lakkaasi, fenolioksideaasi, oksidaasi, oksidoreduktaaseja, sellulaasi, ksylaasi, peroksidaasi, lipaasi, hydrolaasi, esteraasi, kutinaasi, proteolyyttisiä entsyymejä, aminopeptidaasi, karboksipeptidaasi, fytaasi, lyaasi, pektinolyyttisiä entsyymejä, amylaasi, glukoamylaasi, α -galaktosidaasi, β -galaktosidaasi, α -glukosidaasi, β -glukosidaasi, mannosidaasi, isomeraasi, invertaasi, transferaasi, ribonukleaasi, kitinaasi, mutanaasi tai deoksiribonukleaasi.
30
35

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se käsittää myös valittavissa olevan markkerin.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että markkeri on *argB*, *trpC*, *pyrG*, *amdS*, *hygB*, *sC*, tai glufosinaattiresistenssi.

10. Menetelmä kiinnostuksen kohteena olevan proteiinin tuotamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kasvatetaan termofiilistä yhdistelmä-DNA-isäntäsolua, joka on suvun *Thielavia*, *Acremonium*, *Myceliophthora* tai *Sporotrichum* jäsen, joka käsittää heterologista proteiinia koodittavan nukleiinihapposekvenssin liittyneenä toimintakykyisesti promoottoriin, oloissa, jotka sallivat proteiinin ekspression, ja otetaan proteiini talteen viljelmästä.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on sieniproteiini.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että promoottori on sienipromoottori.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on sienientsyymi.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on katalaasi, lakkaasi, fenolioksidaasi, oksidaasi, oksidoreduktaaseja, sellulaasi, ksylanaasi, peroksidaasi, lipaasi, hydrolaasi, esteraasi, kutinaasi, proteolyyttisiä entsyymejä, aminopeptidaasi, karboksipeptidaasi, fytaasi, lyaasi, pektinolyyttisiä entsyymejä, amylaasi, glukoamylaasi, α -galaktosidaasi, β -galaktosidaasi, α -glukosidaasi, β -glukosidaasi, mannosidaasi, isomeraasi, invertaasi, transferaasi, ribonukleaasi, kitinaasi, mutanaasi tai deoksiribonukleaasi.

15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on sieniproteiini.

n e t t u siitä, että solu sisältää myös valittavissa olevan markkerin.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n -
 5 n e t t u siitä, että markkeri on argB, trpC, pyrG, amdS, hygB, sC tai glufosinaattiresistanssi.

17. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
 n e t t u siitä, että promoottori on promoottoreita, joka
 10 on *A. oryzae*'n TAKA-amylaasista, *Rhizomucor miehei*'n asparaagiinihappoproteinaasista, *A. niger*'in glukoamylaasista, *A. niger*'in neutraalista α -amylaasista, *A. niger*'in happostabiiliista α -amylaasista tai *Rhizomucor miehei*'n lipaasista.

18. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n -
 15 n e t t u siitä, että isäntäsolu saadaan *Thielavia terrestris*'istä, *Acremonium alabamense*'sta, *Myceliophthora thermophilum*'ista tai *Sporotrichum cellulophilum*'ista.

19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, t u n n e t t u
 20 siitä, että se on saatu *Thielavia terrestris*'ista, *Acremonium alabamense*'sta, *Myceliophthora thermophilum*'ista tai *Sporotrichum cellulophilum*'ista.

20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, t u n n e t t u
 25 siitä, että se on saatu *Thielavia terrestris*'istä.

21. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, t u n n e t t u
 siitä, että se on saatu *Thielavia terrestris*'in itiöimättö-
 30 mästä mutantista.

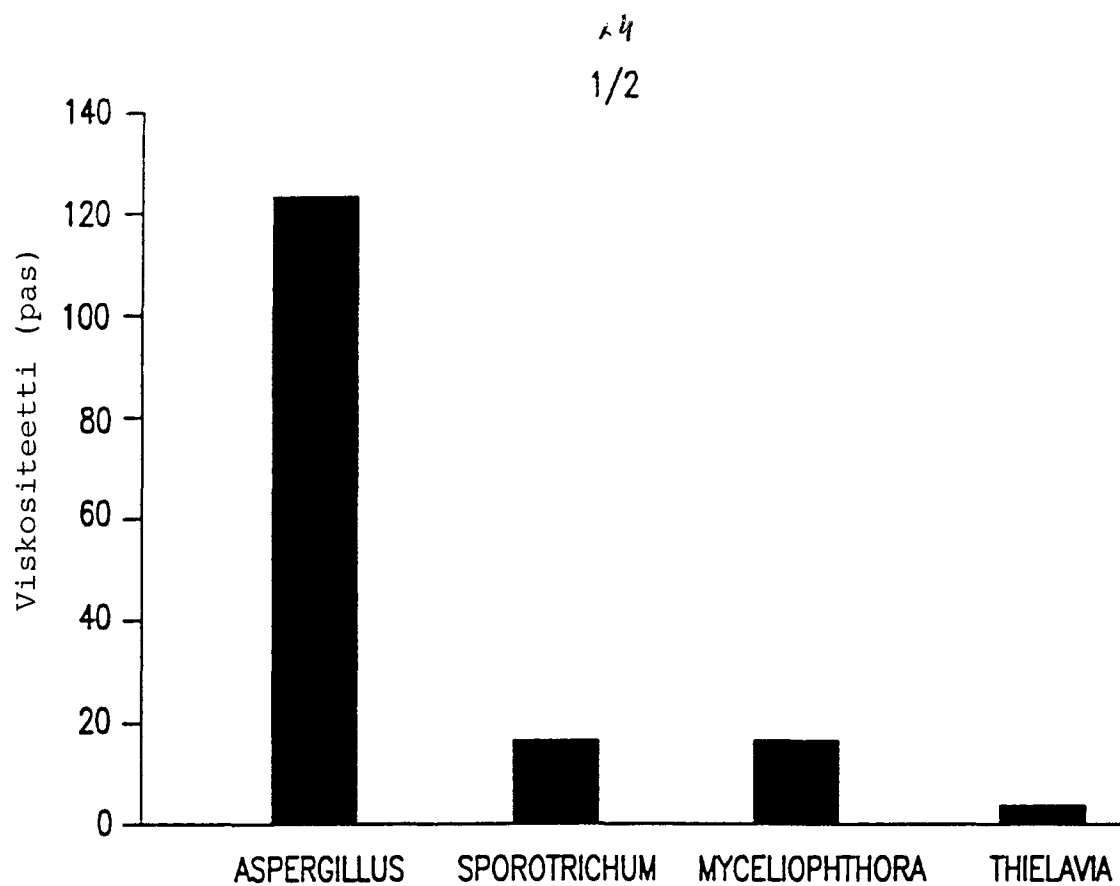


FIG.1

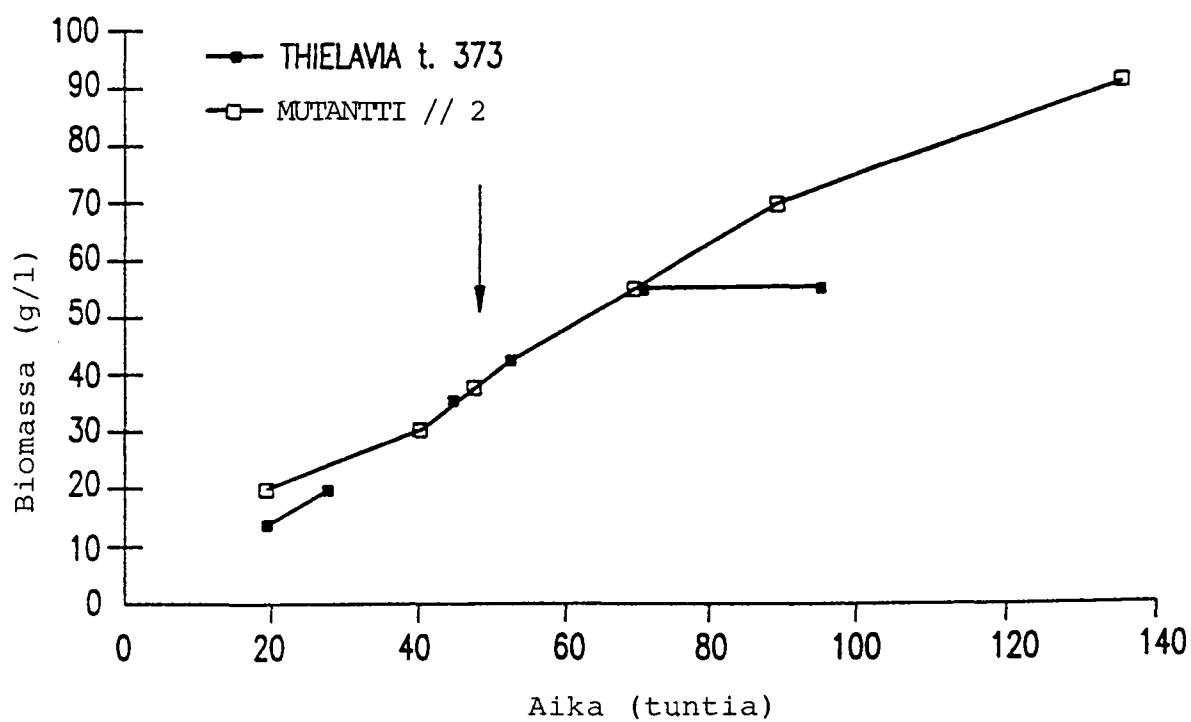


FIG.3



FIG.2