

ÖZET**KSİLANAZLAR, BUNLARI KODLAYAN NÜKLEİK ASİTLER VE BUNLARI
YAPMAK VE KULLANMAK İÇİN YÖNTEMLER**

5 Bu buluş genel olarak enzimlerle, enzimleri kodlayan polinükleotitlerle, bu tür polinükleotitlerin ve polipeptitlerin kullanımıyla ve daha özel olarak ksilanaz aktivitesine örn, dahili β -1,4-ksilosidik bağlarının veya endo- β -1,4-glukanaz bağlarının hidrolizini katalize eden ve/veya bir lineer polisakkarit beta-1,4-ksilanı ksiloza ayırıştırır veya bir glukanaz aktivitesine örn, bir endoglukanaz aktivitesine, örneğin dahili endo- β -1,4-ve/veya 1,3-glukanaz bağlarının hidrolizini katalize eden, bir ksilanaz aktivitesine 10 ve/veya bir mannaz aktivitesine sahip olan enzimlerle ilgilidir.

İSTEMLER

1. İzole edilmiş, sentetik ya da rekombinant bir nükleik asit olup, özelliği;
 - (a) en az bir polipeptidi kodlayan bir nükleik asit içermesi, burada nükleik asidin (i) SEK ID NO: 383 ya da (ii) SEK ID NO: 481'in sekansını içermesi,
- 5 burada nükleik asidin, bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptidi kodlaması,

ve isteğe bağlı olarak, sekans özdeşliklerinin bir sekans karşılaştırma algoritmali analiz ile ya da bir görsel inceleme ile belirlenmesi,

ve isteğe bağlı olarak, bu sekans karşılaştırma algoritmasının, bir filtreleme ayarının
- 10 blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F'e ayarlandığı ve diğer tüm opsiyonların varsayılan olarak ayarlandığı bir BLAST versiyon 2.2.2 algoritması olması;
 - (b) ksilanaz aktivitesine sahip en az bir polipeptidi kodlayan bir nükleik asit içermesi, burada polipeptidin SEK ID NO: 384 ya da SEK ID NO: 482'nin sekansını içermesi;
 - (c) (i) (a) ya da (b)'deki nükleik asidi içermesi ve en az bir koruyucu amino asit
 - 15 ikamesine sahip bir polipeptidi kodlaması ve bunun ksilanaz aktivitesini muhafaza etmesi; ya da (ii) (c)(i)'nin nükleik asidini içermesi, burada en az bir koruyucu amino asit ikamesinin, bir amino asidin benzer karakteristiklere sahip bir başka amino asit ile ikame edilmesini içermesi; ya da koruyucu bir ikamenin: bir alifatik amino asidin bir başka alifatik amino asit ile değiştirilmesini; bir Serin ile bir Treonin ya da bir Treonin
 - 20 ile Serinin değiştirilmesini; bir asidik kalıntı ile bir başka asidik kalıntının değiştirilmesini; bir amid grubu taşıyan bir kalıntı ile bir amid grubu taşıyan bir başka kalıntının değiştirilmesini; bir bazik kalıntının bir başka bazik kalıntı ile değiştirmesini; ya da bir aromatik kalıntının bir başka aromatik kalıntı ile değiştirilmesini içermesi;
 - (d) bahsedilen ksilanaz aktivitesine sahip olan ancak bir sinyal sekansı, bir prepro etki alanı, bir dokerin etki alanı ve / veya bir karbonhidrat bağlama modülü (CBM) içermeyen bir polipeptidi kodlayan (a), (b) ya da (c)'nin nükleik asidini içermesi;
 - (e) bahsedilen ksilanaz aktivitesine sahip olan ayrıca bir heterolog sekans içeren bir polipeptidi kodlayan (a), (b), (c) ya da (d)'nin nükleik asidini içermesi;
 - (f) (e)'nin nükleik asidini içermesi, burada heterolog sekansın, (i) bir heterolog
 - 30 sinyal sekansını, bir heterolog karbonhidrat bağlama modülünü, bir heterolog dokerin etki alanını, bir heterolog katalitik etki alanını (CD) ya da bunların bir kombinasyonunu;

- (ii) burada heterolog sinyal sekansının, karbonhidrat bağlama modülünün ya da katalitik etki alanının (CD) bir heterolog enzimden türetildiği (i)'nin sekansını ya da (iii) bir etiketi, bir epitopu, bir hedefleme peptidini, bir bölünebilir sekansı, bir tespit edilebilir parçayı ya da bir enzimi kodlayan, bir sekans içermesi ya da bundan oluşması;
- 5 (g) (f)'nin nükleik asidini içermesi, burada heterolog karbonhidrat bağlama modülünün (CBM) bir ksilan bağlama modülü, bir selüloz bağlama modülü, bir lignin bağlama modülü, bir ksiloz bağlama modülü, bir mannaz bağlama modülü, bir ksiloglukana özgü modül ve / veya bir arabinofuranosidaz bağlama modülü içermesi ya da bunlardan oluşması;
- 10 (h) (f)'nin nükleik asidini içermesi, burada heterolog sinyal sekansının, kodlanmış proteini bir vakuole, bir endoplazmik retikuluma, bir kloroplasta ya da bir nişasta granülüne hedeflemesi; ya da
- (i) (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) ya da (h)'ye tamamen tamamlayıcı olan bir nükleik asit sekansı içermesidir.
- 15 **2.** Ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptidi kodlayan izole edilmiş, sentetik ya da rekombinant bir nükleik asit olup, özelliği; bu nükleik asidin:
- (a) SEK ID NO: 383 ya da SEK ID NO: 481'in sekansına ait en az bir sekans modifikasyonu içermesi,
- burada, sekans modifikasyonunun en az bir, iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz,
- 20 on, on bir, on iki, on üç, on dört, on beş, on altı, on yedi, on sekiz, on dokuz ya da aşağıdaki değişikliklerin tamamını içermesidir:
- SEK ID NO: 383'ün 10 ila 12 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, CCT, TTA, TTG, CTC, CTA ya da CTG ile değiştirilmesi;
- SEK ID NO: 383'ün 25 ila 27 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin,
- 25 CCC, CCG, CCA ya da CCT ile değiştirilmesi;
- SEK ID NO: 383'ün 28 ila 30 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TCA, TCC, TCT, TCG, AGT ya da AGC ile değiştirilmesi;
- SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TTT ya da TTC ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TAC ya da TAT ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, ATA, ATT ya da ATC ile değiştirilmesi;

- 5 SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TGG ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 40 ila 42 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, CAC ya da CAT ile değiştirilmesi;

- 10 SEK ID NO: 383'ün 52 ila 54 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TTC ya da TTT ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 73 ila 75 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, GAG ya da GAA ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 73 ila 75 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, CCC, CCG, CCA ya da CCT ile değiştirilmesi;

- 15 SEK ID NO: 383'ün 88 ila 90 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, GTG, GTC, GTA ya da GTT ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TGT ya da TGC ile değiştirilmesi;

- 20 SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, CAT ya da CAC ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TTG, TTA, CTT, CTC, CTA ya da CTG ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 103 ila 105 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, GAG ya da GAA ile değiştirilmesi;

- 25 SEK ID NO: 383'ün 103 ila 105 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, GAT ya da GAC ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 211 ila 213 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, ACA, ACT, ACC ya da ACG ile değiştirilmesi;

- 30 SEK ID NO: 383'ün 211 ila 213 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, TGT ya da TGC ile değiştirilmesi;

SEK ID NO: 383'ün 508 ila 582 arasındaki kalıntılarının eşdeğerindeki nükleotitlerin, CAT ya da CAC ile değiştirilmesi; veya

(b) SEK ID NO: 383'e ait en az bir sekans modifikasyonu içermesi ve SEK ID NO: 383'e ait en az bir modifikasyonunun:

- 5 10 ila 12 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde CCT, TTA, TTG, CTC, CTA ya da CTG olan,
25 ila 27 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde CCC, CCG, CCA ya da CCT olan,
28 ila 30 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TCA, TCC, TCT, TCG, AGT ya da AGC olan,
- 10 37 ila 39 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TTT ya da TTC olan,
37 ila 39 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TAC ya da TAT olan,
37 ila 39 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde ATA, ATT ya da ATC olan,
37 ila 39 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TGG olan,
40 ila 42 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde CAC ya da CAT olan,
- 15 52 ila 54 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TTC ya da TTT olan,
73 ila 75 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde GAG ya da GAA olan,
73 ila 75 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde CCC, CCG, CCA ya da CCT olan,
88 ila 90 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde GTG, GTC, GTA ya da GTT olan,
100 ila 102 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TGT ya da TGC olan,
- 20 100 ila 102 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde CAT ya da CAC olan,
100 ila 102 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TTG, TTA, CTT, CTC, CTA ya da CTG olan,
103 ila 105 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde GAG ya da GAA olan,
103 ila 105 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde GAT ya da GAC olan,
- 25 211 ila 213 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde ACA, ACT, ACC ya da ACG olan,
211 ila 213 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde TGT ya da TGC olan,
508 ila 582 arasındaki kalıntılardaki nükleotitlerde CAT ya da CAC olan

bir değişiklik içermesidir.

3. İstem 1 ya da 2'ye ait bir sekansı içeren bir nükleik asit ihtiva eden bir ekspresyon kaseti, bir vektör ya da bir klonlama vasıtası olup, özelliği; isteğe bağlı olarak klonlama vasıtasının bir viral vektör, bir plazmit, bir faj, bir fajemid, bir kosmid, bir fosmid, bir bakteriyofaj ya da bir yapay kromozom içermesi, isteğe bağlı olarak viral vektörün bir adenovirüs vektör, bir retroviral vektör ya da bir adeno ile ilişkili viral vektör içermesi ya da yapay kromozomun, bir bakteriyel yapay kromozom (BAC), bir bakteriyofaj P1 türevi vektör (PAC), bir maya yapay kromozomu (YAC) ya da bir memeli yapay kromozomu (MAC) içermesidir.
4. İstem 1 ya da 2'nin bir sekansına sahip bir nükleik asit içeren ya da İstem 3'te belirtilen bir ekspresyon kaseti, bir vektör ya da bir klonlama vasıtası içeren bir dönüştürülmüş hücre olup, özelliği; isteğe bağlı olarak bu hücrenin bir bakteriyel hücre, bir memeli hücresi, bir mantar hücresi, bir maya hücresi, bir böcek hücresi ya da bir bitki hücresi olmasıdır.
5. İstem 1 ya da 2'nin bir sekansına sahip olan bir nükleik asit içeren bir transgenik insan olmayan hayvan, bitki, bitki parçası ya da bitki tohumu olup, özelliği; bitkinin isteğe bağlı olarak, bir mısır bitkisi, bir süpürge darısı bitkisi, bir patates bitkisi, bir domates bitkisi, bir buğday bitkisi, bir yağlı tohum bitkisi, bir kolza tohumu bitkisi, bir soya fasulyesi bitkisi, bir piriņç bitkisi, bir arpa bitkisi, bir çim, bir pamuk bitkisi, bir pamuk tohumu bitkisi, bir hurma, bir susam bitkisi, bir yer fıstığı bitkisi, bir ayçiçeği bitkisi ya da bir tütün bitkisi olması, ve burada hayvanın isteğe bağlı olarak, bir fare, bir sıçan, bir tavşan, bir koyun, bir domuz, bir tavuk, bir keçi, bir balık ya da bir inek olmasıdır.
6. Bir ksilanaz aktivitesine sahip olan izole edilmiş, sentetik ya da rekombinant bir polipeptit ya da peptit olup, özelliği;
- (a) bir amino asit sekansı (i) SEK ID NO: 384 ya da (ii) SEK ID NO: 482 içermesi, burada, isteğe bağlı olarak, sekans özdeşliklerinin bir sekans karşılaştırma algoritmali analiz ile ya da bir görsel inceleme ile belirlenmesi ve isteğe bağlı olarak bu sekans karşılaştırma algoritmasının, bir filtreleme ayarının blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F'e ayarlandığı ve diğer tüm opsiyonların varsayılan olarak ayarlandığı bir BLAST versiyon 2.2.2 algoritması olması;

(b) istem 1'in nükleik asidi tarafından kodlanan bir amino asit sekansı içermesi, burada polipeptidin ksilanaz aktivitesine sahip olması;

(c) (a) ya da (b)'deki amino asit sekansını içermesi ve en az bir amino asit kalıntısı koruyucu ikamesi içermesi ve polipeptidin bahsedilen ksilanaz aktivitesini muhafaza etmesi;

(d) (c)'deki amino asit sekansını içermesi, burada koruyucu ikamenin bir alifatik amino asidin bir başka alifatik amino asit ile değiştirilmesini; bir Serin ile bir Treonin ya da bir Treonin ile Serinin değiştirilmesini; bir asidik kalıntı ile bir başka asidik kalıntının değiştirilmesini; bir amid grubu taşıyan bir kalıntı ile bir amid grubu taşıyan bir başka kalıntının değiştirilmesini; bir bazik kalıntının bir başka bazik kalıntı ile değiştirilmesini ya da bir aromatik kalıntının bir başka aromatik kalıntı ile değiştirilmesini ya da bunların bir kombinasyonunu içermesi;

ve isteğe bağlı olarak, alifatik kalıntının Alanin, Valin, Lösin, İzolösin ya da bunların sentetik bir eşdeğerini içermesi; asidik kalıntının Aspartik asit, Glutamik asit ya da bunların sentetik bir eşdeğerini içermesi; amid grubu içeren bir kalıntının Aspartik asit, Glutamik asit ya da bunların sentetik bir eşdeğerini içermesi; bazik kalıntının Lizin, Arginin ya da bunların sentetik bir eşdeğerini içermesi veya aromatik kalıntının Fenilalanin, Tirosin ya da bunların sentetik bir eşdeğerini içermesi;

(e) bahsedilen ksilanaz aktivitesine sahip olan ancak bir sinyal sekansı, bir prepro etki alanı, bir dokerin etki alanı ve / veya bir karbonhidrat bağlama modülü (CBM) içermeyen (a), (b), (c) ya da (d)'deki polipeptidi içermesi,

burada karbonhidrat bağlama modülünün (CBM) isteğe bağlı olarak bir ksilan bağlama modülü, bir selüloz bağlama modülü, bir lignin bağlama modülü, bir ksiloz bağlama modülü, bir mannaz bağlama modülü, bir ksiloglukana özgü modül ve / veya bir arabinofuranosidaz bağlama modülü içermesi ya da bunlardan oluşması;

(f) bahsedilen ksilanaz aktivitesine sahip olan ayrıca bir heterolog sekans içeren bir polipeptidi kodlayan (a), (b), (c), (d) ya da (e)'nin polipeptidini içermesi;

(g) (f)'nin polipeptidini içermesi, burada heterolog sekansın, (i) bir heterolog sinyal sekansı, bir heterolog karbonhidrat bağlama modülü, bir heterolog dokerin etki alanı, bir heterolog katalitik etki alanı (CD) ya da bunların bir kombinasyonunu; (ii) burada heterolog sinyal sekansının, karbonhidrat bağlama modülünün ya da katalitik etki alanının (CD) bir heterolog lignoselülozik enzimden türetildiği (ii)'nin sekansını ve /

veya (iii) bir etiket, bir epitop, bir hedefleme peptidi, bir bölünebilir sekans, bir tespit edilebilir parça ya da bir enzim içermesi;

(h) (g)'nin polipeptidini içermesi, burada heterolog karbonhidrat bağlama modülünün (CBM) bir ksilan bağlama modülü, bir selüloz bağlama modülü, bir lignin bağlama modülü, bir ksiloz bağlama modülü, bir mannaz bağlama modülü, bir ksiloglukana özgü modül ve / veya bir arabinofuranosidaz bağlama modülü içermesi ya da bunlardan oluşması;

(i) (g)'nin polipeptidini içermesi, burada heterolog sinyal sekansının, kodlanmış proteini bir vakuole, bir endoplazmik retikuluma, bir kloroplasta ya da bir nişasta granülüne hedeflemesi;

(j) (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) ya da (i)'nin polipeptidini içermesi, burada ksilanaz aktivitesinin dahili β -1,4-ksilosidik bağların hidrolizini katalize etmeyi içermesi; bir endo-1,4-beta-ksilanaz aktivitesi içermesi; daha küçük moleküler ağırlıkta ksiloz ve ksilo oligomer üretmek için bir ksilanın ya da bir arabinoskılanın hidrolize edilmesini içermesi; 1,4- β -glikozit-bağlı D-ksilopiranoz içeren bir polisakkaridin hidrolize edilmesini içermesi; bir selüloz ya da bir hemiselülozun hidrolize edilmesini içermesi; bir tahta, bir tahta ürün, bir kağıt küspesi, bir kağıt ürünü ya da kağıt atığı içindeki bir selülozun ya da bir hemiselülozun hidrolize edilmesini içermesi; bir yem ya da bir gıda ürünündeki bir ksilanın ya da bir arabinoksilanın hidrolizini katalize etmeyi içermesi ya da bir mikrobiyal hücredeki ya da bir bitki hücresindeki bir ksilanın ya da bir arabinoksilanın hidrolizinin katalize edilmesini içermesi, burada ksilan ya da arabinoksilanın isteğe bağlı olarak, suda çözünebilir bir arabinoksilan içermesi ve suda çözünebilir ksilanın ya da arabinoksilanın isteğe bağlı olarak bir hamur ya da bir ekmek ürünü içermesi, burada yem ya da gıda ürününün isteğe bağlı olarak bir tahıl tabanlı hayvan yemi, bir malt ya da bir bira, bir süt ya da bir süt ürünü, bir meyve ya da bir sebze içermesi ya da

(k) (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) ya da (j)'nin polipeptidini içermesi, burada polipeptidin isteğe bağlı olarak en az bir glikozilasyon alanı içermesi ya da ayrıca, bir polisakkarit içermesi, burada glikozilasyonun isteğe bağlı olarak bir N-bağlı glikozilasyon olması ve polipeptidin isteğe bağlı olarak, bir *P. pastoris* ya da bir *S. pombe* içinde eksprese edildikten sonra glikozilatlanmasıdır.

7. Ksilanaz aktivitesine sahip olan bir izole edilmiş, sentetik ya da rekombinant polipeptit olup, özelliği; polipeptidin aşağıdakileri içeren bir sekansa sahip olmasıdır:

(a) SEK ID NO: 384 ya da SEK ID NO: 482'nin sekansına ait en az bir sekans modifikasyonu içermesi,

5 burada, sekans modifikasyonunun en az bir, iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on, on bir, on iki, on üç, on dört, on beş, on altı, on yedi, on sekiz, on dokuz ya da aşağıdaki değişikliklerin tamamını içermesidir:

SEK ID NO: 384'ün 4. kalıntısında treonin'in eşdeğerindeki amino asidin lösin olması,

SEK ID NO: 384'ün 9. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin prolin olması,

10 SEK ID NO: 384'ün 10. kalıntısında glutaminin eşdeğerindeki amino asidin serin olması,

SEK ID NO: 384'ün 13. kalıntısında treonin'in eşdeğerindeki amino asidin fenilalanin olması,

15 SEK ID NO: 384'ün 13. kalıntısında treonin'in eşdeğerindeki amino asidin tirosin olması,

SEK ID NO: 384'ün 13. kalıntısında treonin'in eşdeğerindeki amino asidin izolösin olması,

SEK ID NO: 384'ün 13. kalıntısında treonin'in eşdeğerindeki amino asidin triptofan olması,

20 SEK ID NO: 384'ün 14. kalıntısında asparajinin eşdeğerindeki amino asidin histidin olması,

SEK ID NO: 384'ün 18. kalıntısında tirosinin eşdeğerindeki amino asidin fenilalanin olması,

25 SEK ID NO: 384'ün 25. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin glutamik asit olması,

SEK ID NO: 384'ün 25. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin prolin olması,

SEK ID NO: 384'ün 30. kalıntısında asparajinin eşdeğerindeki amino asidin valin olması,

SEK ID NO: 384'ün 34. kalıntısında glutaminin eşdeğerindeki amino asidin sistein olması,

SEK ID NO: 384'ün 34. kalıntısında glutaminin eşdeğerindeki amino asidin histidin olması,

- 5 SEK ID NO: 384'ün 34. kalıntısında glutaminin eşdeğerindeki amino asidin lösin olması,

SEK ID NO: 384'ün 35. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin glutamik asit olması,

- 10 SEK ID NO: 384'ün 35. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin aspartik asit olması,

SEK ID NO: 384'ün 71. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin treonin olması,

SEK ID NO: 384'ün 71. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin sistein olması,

SEK ID NO: 384'ün 194. kalıntısında serinin eşdeğerindeki amino asidin histidin olması,

- 15 (b) SEK ID NO: 384'e ait amino asit sekansında aşağıdaki değişikliklerden birini ya da daha fazlasını içermesi:

amino asit pozisyonu 4'teki treoninin, lösin olması,

amino asit pozisyonu 9'daki serinin, prolin olması,

amino asit pozisyonu 10'daki glutaminin, serin olması,

- 20 amino asit pozisyonu 13'teki treoninin, fenilalanin olması,

amino asit pozisyonu 13'teki treoninin, tirozin olması,

amino asit pozisyonu 13'teki treoninin, izolösin olması,

amino asit pozisyonu 13'teki treoninin, triptofan olması,

amino asit pozisyonu 14'teki asparajinin, histidin olması,

- 25 amino asit pozisyonu 18'deki tirozinin, fenilalanin olması,

amino asit pozisyonu 25'teki serinin, glutamik asit olması,

amino asit pozisyonu 25'teki serinin, prolin olması,

amino asit pozisyonu 30'daki asparajinin, valin olması,

amino asit pozisyonu 34'teki glutaminin, sistein olması,
 amino asit pozisyonu 34'teki glutaminin, histidin olması,
 amino asit pozisyonu 34'teki glutaminin, lösin olması,
 amino asit pozisyonu 35'teki serinin, glutamik asit olması,
 5 amino asit pozisyonu 35'teki serinin, aspartik asit olması,
 amino asit pozisyonu 71'deki serinin, treonin olması,
 amino asit pozisyonu 71'deki serinin, sistein olması ya da
 amino asit pozisyonu 194'teki serinin, histidin olmasıdır.

8. İstem 6 ya da 7'deki bir polipeptidi içeren bir kompozisyon olup, özelliği;

10 bu kompozisyonun isteğe bağlı olarak, bir farmasötik kompozisyon, bir deterjan kompozisyonu, bir kontakt lens solüsyonu, bir atık arıtma kompozisyonu, bir katı ya da sıvı sabun ya da bir sakız, pastil ya da şeker olması,

bu kompozisyonun isteğe bağlı olarak, bir alkol olması, alkolün isteğe bağlı olarak etanol olması,

15 bu kompozisyonun isteğe bağlı olarak, bir kağıt, atık kağıt, geri dönüştürülmüş kağıt ürünü, gazete, kağıt küspesi, tahta, tahta ürünü, tahta atığı, tahta küspesi, Kraft küspesi, lignoselüloz küspesi, tekstil, kumaş, iplik ya da bir giysi olması,

bu kompozisyonun isteğe bağlı olarak, bir içecek, bir gıda, bir yem ya da bir besin takviyesi olması,

20 isteğe bağlı olarak gıdanın, bir hamur ya da bir ekmek olması,

isteğe bağlı olarak içecek, gıda, yem ya da besin takviyesinin bir hayvana yönelik olmasıdır.

9. Bir rekombinant polipeptit üretmeye yönelik bir yöntem olup, özelliği; (I) (a)

nükleik asidin istem 1 ya da 2'nin bir sekansını içerdiği bir nükleik asidin sağlanması

25 ve (b) polipeptidin ekspresyonuna olanak sağlayan koşullar altında (a) adımıdaki nükleik asidin eksprese edilmesi, böylece rekombinant bir polipeptidin üretilmesi adımlarını içermesi, ve bu yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir konak hücrenin (a) adımıdaki nükleik asit ile dönüştürülmesini, bunu takiben (a) adımıdaki nükleik asidin eksprese edilmesini, böylece dönüştürülmüş bir hücre içinde bir rekombinant proteinin

üretilmesini ya da (II) (a) istem 1'deki nükleik asidi içeren bir vektörün sağlanması ve (b) (a)'daki vektörün eksprese edilmesini içermesi, burada ekspresyonun isteğe bağlı olarak yüksek aktiviteli bir promotörün, bir disistronik vektörün kullanımı ya da vektörün gen amplifikasyonu ile gerçekleştirilmesidir.

5 **10.** Bir kimerik polipeptit olup, özelliği; (a) istem 6 ya da 7'ye ait bir sekans içeren bir polipeptit ya da peptit ve (b) (i) istem 6 ya da 7'ye ait bir polipeptidin 1 ila 12, 1 ila 13, 1 ila 14, 1 ila 15, 1 ila 16, 1 ila 17, 1 ila 18, 1 ila 19, 1 ila 20, 1 ila 21, 1 ila 22, 1 ila 23, 1 ila 24, 1 ila 25, 1 ila 26, 1 ila 27, 1 ila 28, 1 ila 28, 1 ila 30, 1 ila 31, 1 ila 32, 1 ila 33, 1 ila 34, 1 ila 35, 1 ila 36, 1 ila 37, 1 ila 38, 1 ila 39, 1 ila 40, 1 ila 41, 1 ila 42, 1 ila 10 43, 1 ila 44, 1 ila 45, 1 ila 46, 1 ila 47, 1 ila 48, 1 ila 49 ya da 1 ila 50 arasındaki kalıntılarında ortaya koyulan gibi bir sekans; (ii) Tablo 4'te ortaya koyulan gibi bir sekans ya da (iii) bir heterolog karbonhidrat bağlama modülü (CBM) içermesi; burada CMB'nin isteğe bağlı olarak bir CBM3a, CBM3b, , CBM4, CBM6, CBM22 ya da X14 ya da Tablo 9'da ortaya koyulan gibi bir X14 içeren bir karbonhidrat bağlama alt 15 sekansı içermesidir.

11. Bir ksilan içeren kompozisyonu hidrolize etmek, sıvılaştırmak, ayırmak ya da parçalamak için yöntem olup, özelliği; aşağıdaki adımları içermesidir:

(a) istem 6 ya da 7'nin bir ksilanazının ya da istem 1 ya da 2'nin bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptidin temin edilmesi;

20 (b) bir ksilan içeren bir kompozisyonun temin edilmesi; ve

(c) ksilanazın, ksilan içeren kompozisyonu hidrolize ettiği, sıvılaştırdığı, ayırdığı ya da parçaladığı koşullar altında (a) adımıdaki polipeptidin (b) adımıdaki kompozisyon ile temas ettirilmesi,

25 burada kompozisyonun isteğe bağlı olarak bir bitki hücresi, bir bakteriyel hücre, bir maya hücresi, bir böcek hücresi ya da bir hayvan hücresi içermesidir.

12. Gıda, yem, besin takviyesi ya da içecek üretimine yönelik bir yöntem olup, özelliği; istem 6 ya da 7'nin en az bir ksilanazının kullanımını içermesi ya da polipeptidin, istem 1 ya da 2'nin bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanmasıdır.

30 **13.** Kompozisyonun, istem 6 ya da 7'ye ait bir ksilanaz ile ya da istem 1 ya da 2'nin bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir ksilanaz ile temas

ettirilmesini içeren, bir kompozisyonun ağartılması, renksizleştirilmesi ya da mürekkepten arındırılmasına yönelik bir yöntem olup, özelliği;

5 burada kompozisyonun isteğe bağlı olarak bir kağıt, atık kağıt, geri dönüştürülmüş kağıt ürünü, gazete, kağıt küspesi, tahta, tahta ürünü, tahta atığı, tahta küspesi, Kraft küspesi, lignoselüloz küspesi, tekstil, kumaş, iplik ya da bir giysi olması,

yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir ağartma ajanı ile temas ettirmeyi içermesi, burada ağartma ajanının isteğe bağlı olarak oksijen ya da hidrojen peroksit içermesi;

yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir filtreleme adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, bir filtratın üretilmesi,

10 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, filtratın geri dönüştürülmesini içermesi ve ince tanelerin isteğe bağlı olarak filtrattan toplanması;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir karıştırma adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, ksilanaz, bir mannaz ve / veya bir glukanazın çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi,

15 ve isteğe bağlı olarak ksilanazın farklı zamanlarda ya da ağartma prosesinde adım adım eklenmesi;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, ek enzimlerin ilave edilmesini içermesi ve ek enzimlerin isteğe bağlı olarak çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi;

20 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi ve yöntemin isteğe bağlı olarak, ksilanaz, bir mannaz ve / veya bir glukanaz ile ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak yüksek sıcaklık ve yüksek pH koşulları içermesidir.

14. Kompozisyonun, istem 6 ya da 7'ye ait bir ksilanaz ile ya da istem 1 ya da 2'nin
25 bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptit ile temas ettirilmesini içeren, bir kompozisyondaki ligninin azaltılması, serbest bırakılması ya da çözülmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği;

30 burada kompozisyonun isteğe bağlı olarak bir kağıt, atık kağıt, geri dönüştürülmüş kağıt ürünü, gazete, kağıt küspesi, tahta, tahta ürünü, tahta atığı, tahta küspesi, Kraft küspesi, lignoselüloz küspesi, tekstil, kumaş, iplik ya da bir giysi olması,

yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir filtreleme adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, bir filtratın üretilmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, filtratın geri dönüştürülmesini içermesi ve ince tanelerin isteğe bağlı olarak filtrattan toplanması;

5 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir karıştırma adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, ksilanazın çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ağartma prosesi içermesi ve isteğe bağlı olarak ksilanazın farklı zamanlarda ya da ağartma prosesinde adım adım eklenmesi;

10 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, ek enzimlerin ilave edilmesini içermesi ve ek enzimlerin isteğe bağlı olarak çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi ve yöntemin isteğe bağlı olarak, ksilanaz ile ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi;

15 ve yöntemin isteğe bağlı olarak yüksek sıcaklık ve yüksek pH koşulları içermesi;

ve yöntemin ardından isteğe bağlı olarak küspenin, yaklaşık % 10'luk bir kıvama sahip olmasıdır.

15. Bir tahta, bir tahta küspesi, bir Kraft küspesi, bir kağıt ürünü, bir kağıt ya da bir kağıt küspesine muamele etmek için bir yöntem olup, özelliği; yöntemin aşağıdaki adımları içermesidir:

(a) istem 6 ya da 7'nin en az bir ksilanazının ya da istem 1 ya da 2'nin bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir ksinalazın temin edilmesi;

(b) bir tahta, bir tahta küspesi, bir Kraft küspesi, bir kağıt ürünü, bir kağıt ya da bir kağıt küspesinin temin edilmesi; ve

25 (c) tahta, tahta küspesi, Kraft küspesi, kağıt ürünü, kağıt ya da kağıt küspesinin, (a) adımındaki polipeptit ile temas ettirilmesi,

burada, polipeptidin tahta, tahta küspesi, Kraft küspesi, kağıt ürünü, kağıt ya da kağıt küspesinin içindeki bileşiklerin hidrolizini katalize etmesi,

30 ve isteğe bağlı olarak tahta, tahta küspesi, Kraft küspesi, kağıt ürünü, kağıt ya da kağıt küspesinin bir yumuşak kereste ve sert kereste içermesi veya tahta, tahta küspesi,

Kraft küspesi, kağıt ürünü, kağıt ya da kağıt küspesinin bir yumuşak kereste ve sert keresteden türetilmesi;

ve muamelenin ardından, küspenin isteğe bağlı olarak en az yaklaşık % 10 ya da en az yaklaşık % 32'lik bir kıvama sahip olması;

5 yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir filtreleme adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, bir filtratın üretilmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, filtratın geri dönüştürülmesini içermesi ve ince tanelerin isteğe bağlı olarak filtrattan toplanması;

10 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir karıştırma adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, ksilanazın çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ağartma prosesi içermesi ve isteğe bağlı olarak ksilanazın farklı zamanlarda ya da ağartma prosesinde adım adım eklenmesi;

15 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, ek enzimlerin ilave edilmesini içermesi ve ek enzimlerin isteğe bağlı olarak çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi ve yöntemin isteğe bağlı olarak, ksilanaz ile ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesidir.

20 **16.** Bir kompozisyonun, (a) istem 6 ya da 7'ye ait bir ksilanaz ile ya da istem 1 ya da 2'nin bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptit ile temas ettirilmesini içeren, bir alkol yapmaya yönelik yöntem olup, özelliği;

kompozisyonun isteğe bağlı olarak, bir sakkarit, bir hemiselüloz, bir selüloz, bir lignin ya da bunların bir kombinasyonunu içermesi;

ve alkolün isteğe bağlı olarak bir etanol içermesi;

25 ve yöntemin isteğe bağlı olarak, yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları içermesi;

yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir filtreleme adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, bir filtratın üretilmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, filtratın geri dönüştürülmesini içermesi ve ince tanelerin isteğe bağlı olarak filtrattan toplanması;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir karıştırma adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, ksilanaz, bir mannaz ve / veya bir glukanaazın çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi,

5 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ağartma prosesi içermesi ve isteğe bağlı olarak ksilanaz, bir mannaz ve / veya bir glukanaazın farklı zamanlarda ya da ağartma prosesinde adım adım eklenmesi;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, ek enzimlerin ilave edilmesini içermesi ve ek enzimlerin isteğe bağlı olarak çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi;

10 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi ve yöntemin isteğe bağlı olarak, ksilanaz ile ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesidir.

17. (a) istem 6 ya da 7'ye ait en az bir enzim ve bir veya daha fazla başka enzimi (enzimleri) içeren bir enzim karışımı ya da kokteyli; (b) (a)'nın karışımı ya da kokteyli
15 olup, özelliği; bir ya da daha fazla diğer enzimin (enzimlerin) bir başka ksilanaz, glukanaazlar, selülazlar, lipazlar, esterazlar, proteazlar ya da endoglikosidazlar, endo-beta-1,4-glukanaazlar, beta-glukanaazlar, endo-beta-1,3(4)-glukanaazlar, kütinazlar, peroksidazlar, katalazlar, lakkazlar, amilazlar, glukoamilazlar, pektinazlar, redüktazlar, oksidazlar, fenoloksidazlar, ligninazlar, pullulanazlar, arabinanazlar, hemiselülazlar,
20 mannanazlar, ksiloglukonazlar, pektin asetil esterazlar, ramnogalakturonan asetil esterazlar, poligalakturonazlar, ramnogalakturonazlar, galaktanazlar, pektin lizazlar, pektin metilesterazlar, sellobiyohidrolazlar ve / veya transglutaminazlar olmasıdır.

18. İstem 17'deki bir enzim karışımının ya da kokteylinin, istem 6 ya da 7'deki ksilanazın ya da istem 1 ya da 2'deki nükleik asit tarafından kodlanan polipeptidin
25 kullanımını içeren, herhangi bir organik bileşik, bitki ya da tahta veya tahta ürünü ya da tahta küspesi ya da yan ürünü, tahta atığı, kağıt, kağıt küspesi, kağıt ürünü ya da atık kağıt ya da yan ürünü içindeki bir hemiselüloz, selüloz, lignin ya da sakkaritin hidrolize edilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği;

yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir filtreleme adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak,
30 bir filtratın üretilmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, (ince taneleri yakalamak için) filtratın geri dönüştürülmesini içermesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir karıştırma adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, ksilanazın çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi, ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ağartma prosesi içermesi ve isteğe bağlı olarak ksilanazın farklı zamanlarda ya da ağartma prosesinde adım adım eklenmesi;

5 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, ek enzimlerin ilave edilmesini içermesi ve ek enzimlerin isteğe bağlı olarak çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi ve yöntemin isteğe bağlı olarak, ksilanaz ile ön yıkama adımı ya da bir
10 ön muamele adımı içermesidir.

19. Yüksek (alkalin) bir pH'ta bir ksilanazın performansını arttırmaya yönelik bir yöntem olup, özelliği; (a) bir ksilanaz sekansının C' terminali ucundaki ya da yakınındaki amino asit kalıntılarının "EGG" (ya da eş değerinin) uzaklaştırılmasını; (b) "EGG" (ya da eş değerinin), modifiye edilecek olan ksilanazın glikosil hidrolaz etki alanından (hemen) sonra uzaklaştırıldığı (a)'daki yöntemi ya da (c) artırılmış performansa sahip ksilanazın, istem 6 ya da 7'deki bir polipeptidi içerdiği (a) ya da (b)'deki yöntemi içermesidir.

20. Bir tahta, bir tahta küspesi, bir tahta ürünü, bir Kraft küspesi, bir kağıt, bir kağıt küspesi, bir kağıt ürünü, ya da geri dönüştürülmüş kağıt prosesindeki ağartma kimyasalının miktarını azaltmaya yönelik bir yöntem olup, özelliği;

(a) istem 6 ya da 7'nin en az bir ksilanazının ya da istem 1 ya da 2'nin bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptidin temin edilmesini;

(b) bir tahta, tahta küspesi, tahta ürünü, Kraft küspesi, kağıt, kağıt küspesi, kağıt ürünü ya da geri dönüştürülmüş kağıdın temin edilmesini; ve

25 (c) tahta, tahta küspesi, tahta ürünü, Kraft küspesi, kağıt, kağıt küspesi, kağıt ürünü ya da geri dönüştürülmüş kağıdın (a) adımıdaki polipeptit ile temas ettirilmesini içermesi,

burada, ağartma kimyasalının isteğe bağlı olarak bir klorin, bir klorin dioksit, bir kostik, bir peroksit ya da bunların herhangi bir kombinasyonunu içermesi,

30 yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca bir filtreleme adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, bir filtratın üretilmesi,

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, filtratın geri dönüştürülmesini içermesi ve ince tanelerin isteğe bağlı olarak filtrattan toplanması;

ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir karıştırma adımı içermesi ve isteğe bağlı olarak, ksilanazın çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi,

- 5 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, ek enzimlerin ilave edilmesini içermesi ve ek enzimlerin isteğe bağlı olarak çoklu zaman noktalarında ya da yöntemde adım adım eklenmesi;

- 10 ve yöntemin isteğe bağlı olarak ayrıca, bir ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi ve yöntemin isteğe bağlı olarak, ksilanaz ile ön yıkama adımı ya da bir ön muamele adımı içermesi,

- ve isteğe bağlı olarak, ksilanaz enzimi ile bir oksijen delignifikasyonu adımının (bir O₂ sonrası küspe) ardından muamele koşullarının: yaklaşık 6 ila 7 arasında pH, yaklaşık 0.3 birim/g enzim dozu, yaklaşık 20 ila 25 dakika arasında muamele zamanı içermesi, ve yöntemin isteğe bağlı olarak, parlaklığı arttıran daha sonraki ClO₂ kullanımını azaltmak için O₂ sonrası ladin/ çam/ köknar (SPF) küspesinin, yaklaşık 2 birim/g ksilanaz ile bir ön işlemini içermesi,
- 15

- ve yöntemin isteğe bağlı olarak, parlaklığı arttıran daha sonraki ClO₂ kullanımını azaltmak için O₂ öncesi kahverengi yığın SPF'nin yaklaşık 0.5 birim/g ksilanaz ile bir ön işlemini içermesi,

- 20 ve yöntemin isteğe bağlı olarak, parlaklığı arttıran daha sonraki ClO₂ kullanımını azaltmak için O₂ öncesi Kavak küspesinin, yaklaşık 0.5 birim/g ksilanaz ile bir ön işlemini içermesi,

- ve yöntemin isteğe bağlı olarak, parlaklığı arttıran daha sonraki ClO₂ kullanımını azaltmak için O₂ öncesi Douglas Fir/Hemlock küspesinin, yaklaşık 0.5 birim/g ksilanaz ile bir ön işlemini içermesidir.
- 25

21. Mukavva üretimine yönelik bir yöntem olup, özelliği; bir ağartılmış ya da ağartılmamış küspenin veya geri dönüştürülmüş kağıt küspesinin istem 6 ya da 7'deki bir ksilanaz veya istem 1 ya da 2'deki bir sekansı içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptit ile temas ettirilmesini içermesidir.

- 30 **22.** Mukavva üretiminde pişirmedeki alkaliyi azaltmak ya da pişirmeyi düşürmek için bir yöntem olup, özelliği; bir ağartılmış ya da ağartılmamış küspenin veya geri

dönüştürülmüş kağıt küspesinin istem 6 ya da 7'deki bir ksilanaz veya istem 1 ya da 2'deki bir sekansı içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptit ile temas ettirilmesini içermesidir.

5 **23.** Mukavva üretiminde pişirme sırasındaki Kappa sayısını arttırmak ya da küspe dayanımını arttırmak için bir yöntem olup, özelliği; bir ağartılmış ya da ağartılmamış küспенin veya geri dönüştürülmüş kağıt küspesinin istem 6 ya da 7'deki bir ksilanaz veya istem 1 ya da 2'deki bir sekansı içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptit ile temas ettirilmesini içermesidir.

24. Bir şeker yapmaya yönelik bir yöntem olup, özelliği;

10 (a) polisakkarit içeren bir kompozisyon ile istem 6 ya da 7'nin bir ksilanazı veya istem 1 ya da 2'deki bir sekansı içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptidin temas ettirilmesini içermesi, burada temasın bir şekerin üretilmesi ile sonuçlanması;

15 (b) polisakkarit içeren kompozisyonun bir sakkarit, bir hemiselüloz, bir selüloz, bir lignin ya da bunların bir kombinasyonunu içerdiği, (a)'ya ait yöntem;

(c) istem 17'nin bir enzim karışımını ya da kokteylinin kullanımını içeren (a) ya da (b)'ye ait yöntem; veya

(d) ayrıca, bir alkol üretmek için şekerin fermente edilmesini içeren (a), (b) ya da (c)'ye ait yöntemi içermesidir.

20 **25.** Bir polisakkaritin enzimatik hidrolizi için bir proses olup, özelliği;

(a) polisakkarit içeren bir kompozisyon ile istem 6 ya da 7'nin bir ksilanazı veya istem 1 ya da 2'deki bir sekansı içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptidin temas ettirilmesini içermesi, burada temasın bir şekerin üretilmesi için polisakkaritin hidrolizi ile sonuçlanması;

25 (b) polisakkarit içeren bir kompozisyonun, bir organik bileşik, bir bitki ya da tahta ya da tahta ürünü ya da yan ürünü, bir tahta atığı, bir kağıt küspesi, bir kağıt ürünü veya bir atık kağıt ya da bir yan ürünü içerdiği (a)'ya ait yöntem;

(c) istem 17'nin bir enzim karışımını ya da kokteylinin kullanımını içeren (a) ya da (b)'ye ait yöntemi; veya

- (d) polisakkaritin hidrolizinin bir monomerik şekerin üretilmesi ile sonuçlandığı (a), (b) ya da (c)'ye ait yöntemi; ya da
- (e) ayrıca, bir alkol üretmek için karbonhidratın ya da şekerin fermente edilmesini içeren (a), (b), (c) ya da (d)'ye ait yöntemi içermesidir.
- 5 **26.** Bir fermantasyon prosesi (bir karbonhidratın bir alkole dönüştürülmesi için bir proses) olup, özelliği;
- (a) (i) karbonhidrat içeren bir kompozisyon ile istem 6 ya da 7'nin bir ksilanazı veya istem 1 ya da 2'deki bir sekansı içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptidin temas ettirilmesini içermesi, burada temasın karbonhidratın enzimatik hidrolizi ile sonuçlanması; (ii) bir alkol üretmek için (i) adımımda üretilen karbonhidratın fermente edilmesi;
- 10 (b) karbonhidrat içeren bir kompozisyonun, bir organik bileşik, bir bitki ya da tahta ya da tahta ürünü ya da yan ürünü, bir tahta atığı, bir kağıt küspesi, bir kağıt ürünü veya bir atık kağıt ya da bir yan ürünü içerdiği (a)'ya ait yöntem;
- 15 (c) istem 17'nin bir enzim karışımını ya da kokteylinin kullanımını içeren (a) ya da (b)'ye ait yöntemi; veya
- (d) (a)(ii) adımımdaki fermantasyonun (karbonhidratın alkole dönüşümü), etanolün üretilmesi ile sonuçlandığı (a), (b) ya da (c)'ye ait yöntemi içermesidir.

TARİFNAME

KSİLANAZLAR, BUNLARI KODLAYAN NUKLEİK ASİTLER VE BUNLARI YAPMAK VE KULLANMAK İÇİN YONTEMLER

BULUŞUN ALANI

5 Bu buluş genel olarak enzimlerle, enzimleri kodlayan polinükleotitlerle, bu tür polinükleotitlerin ve polipeptitlerin kullanımıyla ve daha özel olarak ksilanaz aktivitesine örn, dahili β -1,4-ksilosidik bağlarının veya endo- β -1,4-glukanaz bağlarının hidrolizini katalize eden ve/veya bir lineer polisakkarit beta-1,4-ksilani ksiloza ayırıştırıran veya bir glukanaz aktivitesine örn, bir endoglukanaz aktivitesine, örneğin dahili endo- β -1,4-
10 ve/veya 1,3-glukanaz bağlarının hidrolizini katalize eden, bir ksilanaz aktivitesine ve/veya bir mannaz aktivitesine sahip olan enzimlerle ilgilidir. Dolayısıyla mevcut buluş bitkilerin hücre duvarının önemli bir bileşeni olan hemiselülozun parçalanmasına yönelik yöntemler ve işlemler sağlamakta olup, hemiselülozların herhangi bir organik bileşikte, bitkide veya ağaçta veya ağaç ürününde veya yan ürününde, artık ağaçta,
15 kağıt hamurunda, kağıt ürününde veya kağıt atığında veya yan ürününde hidrolize edilmesine yönelik yöntemleri ve işlemleri içermektedir.

ARKA PLAN

Ksilanaz (örn, endo-1,4-beta-ksilanaz, EC 3.2.1.8) daha küçük moleküler ağırlıklı ksiloz ve ksilo-oligomerleri üretmek için ksilandaki dahili β -1,4-ksilosidik bağları
20 hidrolize eder. Ksilanlar 1,4- β -glisosit bağlı D-ksilopiranozlardan oluşturulan polisakkaritlerdir. Ksilanazlar pişirme ve meyve ve sebze işleme, tarımsal atığın parçalanması için gıda endüstrisinde, hayvan yemi üretiminde ve kağıt hamuru ve kağıt üretiminde kullanılmakta olan önemli bir ticari değerdedir. Ksilanazlar mantar ve bakterilerden oluşur.

25 Arabinoksilanlar tahılların çeşit ve büyüme koşullarına bağlı olarak % 2,5-7,1 w/w temsil eden ana nişasta olmayan polisakkaritleridir. Bu polisakkaritin fizikokimyasal özellikleri oksidatif koşullar altında viskoz solüsyonlara veya hatta jellere sebep olacağı şekildedir. Ek olarak arabinoksilanlar yüksek su bağlama kapasitesine sahiptir ve protein köpüğü stabilitesinde bir role sahip olabilir. Bu karakteristiklerin hepsi
30 mayalama, pişirme, hayvan beslenmesi ve kağıt üretimi dahil olmak üzere çeşitli endüstriler için problem teşkil eder. Mayalama uygulamalarında ksilan mevcudiyeti malt filtrelenebilirliği ve bulanıklık oluşumu konularına neden olur. Pişirme

uygulamalarında (özellikle kurabiyeler ve krakerler için) bu arabinoksilanlar üretimi zor olan yapışkan hamurlar oluşturur ve bisküvi büyüklüğünü düşürür. Ek olarak bu karbonhidrat pişirilmiş ürünün hızlı yeniden hidrasyonunu içermekte olup, bu da gevreklik ve azalan raf ömrü ile sonuçlanır. Tahıl diyetleriyle monogastrik hayvan yemi uygulamaları için arabinoksilan bağırsak içeriğinin viskozitesine katkıda bulunan önemli bir faktördür ve bu sayede yemin hazmedilebilirliğini ve hayvan büyüme oranını tersine etkiler. Geviş getiren hayvanlar için bu polisakkaritler fiber alımının esas bileşenlerini temsil eder ve arabinoksilanların tam hazmı daha yüksek yem çevrim etkinliklerini kolaylaştırır.

10 Ksilanazların kimyasal ağaç hamurunun biyolojik ağartılmasında ve işlenmesinde (bkz, örneğin U.S. 5,202,249 sayılı patent belgesi), tahta veya kağıt hamurlarının biyolojik ağartılmasında ve işlenmesinde (bkz, örneğin U.S. 5,179,021, 5,116,746, 5,407,827, 5,405,769, 5,395,765, 5,369,024, 5,457,045, 5,434,071, 5,498,534, 5,591,304, 5,645,686, 5,725,732, 5,759,840, 5,834,301, 5,871,730 ve 6,057,438 sayılı patent
15 belgeleri), ağaçta ligninin azaltılmasında ve ahşabın modifiye edilmesinde (bkz, örneğin U.S. 5,486,468 ve 5,770,012 sayılı patent belgeleri), un, hamur ve ekmek geliştiricilerinde (bkz, örneğin U.S. 5,108,765 ve 5,306,633 sayılı patent belgelerinde), yukarıda belirtildiği gibi besin katkı maddeleri ve/veya destekleri olarak (bkz, örneğin U.S.5,432,074, 5,429,828, 5,612,055, 5,720,971, 5,981,233, 5,948,667, 6,099,844, 6
20 ,132,727 ve 6,132,716 sayılı patent belgelerinde), selüloz solüsyonlarının üretiminde (bkz, örneğin U.S. 5,760,211 sayılı patent belgesinde) faydalı olduğu gösterilmiştir. Ksilanaz aktivitesine sahip olan deterjan bileşimleri meyve, sebze ve/veya balçık ve kil bileşikleri için kullanılır (bkz, örneğin U.S. Pat. No. 5,786,316 sayılı patent belgesi). Ksilanazlar ayrıca özellikle selüloz mevcudiyetinde seçici olduğu hemiselülozun
25 hidrolizinde kullanılabilir. Ek olarak selülaz açısından zengin retentat selülozun hidrolizi için uygundur (bkz, örneğin U.S. Pat. No. 4,725,544 sayılı patent belgesi).

WO 2004/066945 sayılı patent belgesi başvuru sahibinin ısı toleranslı veya ısıya dayanıklı olabilen ksilanazları tartışan önceki bir yayınıdır.

Teknikte ksilanazların enzimin 65 °C ila 75 °C sıcaklık aralığında ve yaklaşık olarak
30 10'luk bir pH değerinde aktif olduğu kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılmasına yönelik bir ihtiyaç vardır. Ek olarak kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanışlı bir enzim klorin dioksit gibi ağartma kimyasallarına yönelik ihtiyacı azaltacaktır.

BULUŞUN ÖZETİ

Buluş ksilanaz aktivitesine sahip olan örn, dahili β -1,4-ksilosidik bağları veya endo- β -1,4-glukanaz bağlarını katalize eden enzimler ve bunları kodlayan nükleik asitler, bunları içeren vektörler ve hücreler, bu ksilanaz kodlayan nükleik asitleri amplifiye etmek ve tanımlamak için proplar ve bu polipeptitleri ve peptitleri yapmak ve kullanmak için yöntemler sağlar.

Orneğin buluş bir ağaç, ağaç ürünü, kağıt hamuru, kağıt ürünü veya atık kağıtta dahili β -1,4-ksilosidik bağları veya endo- β -1,4-glukanaz bağlarını hidrolize etmek için ksilanaz aktivitesine sahip olan enzimler ve bunları içeren bileşimler ve yöntemler sağlar. Bir yönde ksilanaz aktivitesi ksilanın katalize edilmesini, örn, bir lineer polisakkarit beta-1,4-ksilanın bir ksiloza ayrışmasını içermektedir. Dolayısıyla buluş bir ksilan içeren bileşimin ve/veya bitkilerin hücre duvarının önemli bir bileşeni olan bir hemiselülozun parçalanmasına yönelik yöntemler ve işlemler sağlar.

Buluş hücreler, bitkiler ve/veya ağaç veya ağaç ürünleri, atık ağaç, kağıt hamuru, kağıt ürünleri veya atık kağıt veya yan ürünler dahil olmak üzere herhangi bir organik maddede hemiselülozu hidrolize etmek için enzimler, bileşimler, yöntemler ve işlemler sağlar.

Başka bir yönde buluş bir ksilanaz aktivitesine sahip olan lignoselüolitik (lignoselüozik) aktiviteye, örn, bir ligninolitik ve selülotik aktiviteye sahip olan polipeptitleri ve bunlar kodlayan nükleik asitleri ve bunları yapmaya ve kullanmaya yönelik yöntemleri sağlar. Buluş herhangi bir biyokütlenin örn, bir lignoselüozik kalıntının fermente edilebilen şekerlere veya polisakkaritlere biyolojik çevrimine yönelik enzimler sağlar ve bu şekerler veya polisakkaritler etanol, propanol, bütanol ve/veya metanol gibi alkollerin üretimi için ve yakıtların, örn, sentetik sıvılar veya singaz gibi gazlar benzeri biyolojik yakıtların üretiminde bir kimyasal ham madde olarak kullanılabilir.

Bir yönde buluşun enzimleri substrat hidroliz (örn, bir lignoselüozik kalıntı, selüloz, küspe) işlemini geliştirmek için yüksek bir katalitik hıza sahiptir. Katalitik hızdaki bu artan verimlilik örn, bir biyolojik yakıt veya etanol, propanol, bütanol ve/veya metanol gibi bir alkol yapmak için endüstriyel, tarım veya medikal uygulamalarda faydalı olabilen şekerleri veya polisakkaritleri üretmekte artan bir verimliliğe neden olur. Bir yönde buluşun enzimlerini kullanarak hidroliz vasıtasıyla üretilen şekerler alkol (örn,

etanol, propanol, bütanol ve/veya metanol) üretimi ve/veya yakıt (örn, biyolojik yakıt) üretimi için mikroorganizmalar aracılığıyla kullanılabilir.

Buluş buluşun azalan enzim maliyetlerine, örn, biyokütle ile biyolojik yakıt çevrim işlemlerinde azalan maliyetlere sahip olan enzimlerini kullanarak endüstriyel, tarımsal veya medikal uygulamalar: örn, biyokütle ile biyolojik yakıt sağlar. Dolayısıyla buluş herhangi bir biyokütleden bir biyoloji alkol içeren sentetik, sıvı veya gaz yakıtlar dahil olmak üzere biyolojik alkoller, biyolojik yakıtlar ve/veya biyolojik yakıt (örn, bioetanol-, propanol-, bütanol- ve/veya metanol-) içeren bileşimler üretmek için verimli işlemler sağlar.

10 Bir yönde buluşun enzim "kokteylleri" dahil olmak üzere ("kokteyller" bu buluşun en az bir enzimini içeren enzimlerin karışımları anlamına gelmektedir) buluşun enzimleri bir lignoselülozik biyokütlenin ana bileşenlerini veya selüloz ve/veya hemiselüloz (lignoselülozik biyokütle ayrıca lignin içermektedir), örn, tohumlar, tahıllar, kökleri, bitki atığı (örn, saman veya hanız, örn, bir pirinç hanızı veya bir buğday hanızı veya herhangi bir tahıl bitkisinin kuru gövdesi) veya endüstriyel işleme veya gıda işleme yan ürünlerini (örn, hanızlar), mısır (içeren herhangi bir bileşimi (mısır koçanı ve benzerleri dahil olmak üzere), otlar (örn, Hindistan otu örneğinin Sorghastrum nutans veya dallı darı örneğinin Panicum virgatum), ağaç (ağaç kabuğu parçaları dahil olmak üzere, atık ağaç gibi atıkların işlenmesi), kağıt, kağıt hamuru, geri dönüştürülmüş kağıt (örn, gazete) içeren herhangi bir bileşimi hidrolize etmek için kullanılmakta olup, ayrıca bir tek çenekli veya bir çift çenekli bitki veya bir tek çenekli mısır, şeker pancarı veya bunların parçalarını (örn, kamışın üstünü), pirinci, buğdayı, arpayı, dallı darıyı veya Miscanthus veya bir çift çenekli yağ tohumu mahsullünü, soyayı, kanolayı, keteni, palm yağını, şeker pancarını, kolza tohumunu, yemişi, pamuğu, kavağı, acı baklayı veya ağaç atığı gibi ağaç işlemede, kağıt hamuru ve/veya kağıt endüstrisinde, tekstil üretiminde ve ev eşyalarında ve endüstriyel temizleme ajanlarında ve/veya biyokütle atığı işlemedeki ağaç veya ağaç işleme yan ürünlerini içermektedir.

30 Bir yönde buluşun enzimleri β -1,4-bağlı glikoz kısımlarının lineer bir zincirini içeren hemiselülozu ve/veya bitkiden bitkiye değişiklik gösteren bir kompleks yapı olarak hidrolize etmek için kullanılır. Bir yönde buluşun enzimleri arabinoz, galaktoz, glukuronik asit ve/veya mannozun aralıklı bölümleriyle β -1,4-bağlı ksilozun bir omurgasını içeren hemiselülozları hidrolize etmek için kullanılır. Bir yönde buluşun enzimleri ksiloz üzerinde asetil grupları ve arabinoz üzerinde ferulik asit esterleri gibi

karbonhidrat olmayan bileşenleri içeren hemiselülozu hidrolize etmek için kullanılır. Bir yönde buluşun enzimleri lignine kovalent olarak bağlanan ve/veya diğer hemiselüloz sarmallarına diferulat çapraz bağları aracılığıyla kenetlenen hemiselülozları hidrolize etmek için kullanılır.

5 Bir yönde buluşun bileşimleri ve yöntemleri biyokütlenin enzimatik parçalanmasında kullanılır ve selülozlar ve hemiselülozlar dahil olmak üzere birçok farklı enzimin kullanımını içerebilir. Buluşu uygulamak için kullanılan lignoselülozik enzimler selülozu likoz dahil monomeril şekerlere parçalayabilir. Bir yönde buluşu uygulamak için kullanılan bileşimler enzimlerin, örn, glikosil hidrolazlar, glikoz oksidazlar, ksilanazlar, 10 ksilosidazlar (örn, β -ksilosidazar), sellobiohidrolazlar ve/veya arabinofuranosidazlar veya hemiselülozu monomer şekerlere parçalayabilen diğer enzimlerin karışımlarını içerebilir. Buluşun karışımları bu buluşun enzimlerini içerebilir veya sadece bunlardan oluşabilir veya bu buluşun en az bir enzimini ve ayrıca bir lignoselülozik enzim ve/veya başka bir enzim olabilen başka bir enzimi içerebilir.

15 Alternatif uygulamalarda buluş en az bir koruyucu amino asit ornatımına sahip olan ve kendi ksilanaz aktivitesini koruyan polipeptitler (ve bunları kodlayan nükleik asitler) sağlar veya burada en az bir koruyucu amino asit ornatımı bir amino asidin benzer özelliklerde başka bir amino asitle ornatımını içerir veya bir koruyucu ornatım bir alifatik amino asidin başka bir alifatik amino asitle yer değiştirmesini; bir Serin ile bir Treoninin 20 yer değiştirmesini veya tersini; bir asidik kalıntıyla başka bir asidik kalıntının yer değiştirmesini; bir amid grubu taşıyan bir kalıntı ile bir amid grubu taşıyan başka bir kalıntının değiştirilmesini; bir bazik kalıntı ile başka bir bazik kalıntının değişimini veya bir aromatik kalıntı ile başka bir aromatik kalıntının yer değiştirmesini içerir.

25 Alternatif uygulamalarda buluş bir ksilanaz aktivitesine sahip olan ancak bir sinyal sekansından, bir prepro alanından, bir dokkerin alanından ve/veya bir karbonhidrat bağlama modülünden (CBM) muaf olan polipeptitler sağlar ve bir yönde karbonhidrat bağlama modülü (CBM) bir ksilan bağlama modülü, bir selüloz bağlama modülü, bir lignin bağlama modülü, bir ksiloz bağlama modülü, bir mannaz bağlama modülü, bir ksiloglukana özgü modül ve/veya bir arabinofuranosidaz bağlama modülü içerir veya 30 bunlardan oluşur.

Alternatif uygulamalarda buluş ayrıca bir heterolog sekans içeren bir ksilanaz aktivitesine sahip olan polipeptitler sağlar ve bir yönde heterolog sekans (i) bir

heterolog sinyal sekansını, bir heterolog karbonhidrat bağlama modülünü, bir heterolog dokkerin alanını, bir heterolog katalitik alanı (CD) veya bunların bir kombinasyonunu; (ii) (ii)'nin sekansını, burada heterolog sinyal sekansı, karbonhidrat bağlama modülü veya katalitik alan (CD) bir heterolog enzimden türetilir veya (iii) bir etiketi, bir epitopu, bir hedef peptiti, bir yarılabilen sekansı, bir tespit edilebilir kısmı veya bir enzimi kodlayan bir sekansı içerir veya bunlardan oluşur ve bir yönde heterolog karbonhidrat bağlama molekülü (CBM) bir ksilan bağlama modülü, bir selüloz bağlama modülü, bir lignin bağlama modülü, bir ksiloz bağlama modülü, bir mannaz bağlama modülü, bir ksiloglukana özgü modül ve/veya bir arabinofuranosidaz bağlama modülü içerir ve bir yönde heterolog sinyal sekansı kodlanmış proteini bir vakuole, endoplazmik retikuluma, bir kloroplasta veya bir nişasta granülüne hedefler.

Buluş bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asit içeren izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlamakta olup, burada nükleik asit (i) SEK ID NO: 383 veya (ii) SEK ID NO: 481'in sekansını içerir.

Bir yönde (isteğe bağlı olarak) sekans özdeşlikleri bir sekans karşılaştırma algoritması ile analiz vasıtasıyla veya görsel bir incelemeyle belirlenir ve bir yönde (isteğe bağlı olarak) sekans karşılaştırma algoritması bir filtreleme düzeneğinin blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F olarak ayarlandığı ve bütün diğer opsiyonların ön tanımlı ayarlandığı bir BLAST sürüm 2.2.2 algoritmasıdır.

Buluş bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asit içeren izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlamakta olup, burada polipeptit (i) SEK ID NO: 384 veya (ii) SEK ID NO: 482'nin sekanslarını içerir.

Buluş buluşun nükleik asit sekansları tamamen tamamlayıcı sekansları (tamamlayıcı (kodlamayan) ve kodlama sekansları ayrıca bundan sonra birlikte buluşun nükleik asit sekansları olarak anılacaktır) içeren izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlar.

Buluş ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlamakta olup, burada nükleik asit buluşun örnek bir sekansının veya buluşun herhangi bir sekansının en az bir sekans modifikasyonuna sahiptir.

Buluş ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlamakta olup, burada nükleik asit buluşun örnek

bir nükleik asidinin en az bir sekans modifikasyonuna sahiptir, burada sekans modifikasyonu en az aşağıdaki değişikliklerin birini, ikisini, üçünü, dördünü beşini, altısını, yedisini, sekizini, dokuzunu, onunu, on birini, on ikisini, on üçünü, on dördünü, on beşini, on altısını, on yedisini, on sekizini, on dokuzunu veya tamamını içerir: SEK ID NO: 383'ün 10 ila 12 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CCT, TTA, TTG, CTC, CTA veya CTG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 25 ila 27 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CCC, CCG, CCA veya CCT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 28 ila 30 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TCA; TCC, TCT, TCG, AGT veya AGC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TTT veya TTC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri ATA, ATT veya ATC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TGG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 40 ila 42 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CAC veya CAT'e değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 52 ila 54 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TTC veya TTT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 73 ila 75 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GAG veya GAA'ya değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 73 ila 75 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CCC, CCG, CCA veya CCT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 88 ila 90 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GTG, GTC, GTA veya GTT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TGT veya TGC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CAT veya CAC'e değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TTG, TTA, CTT, CTC, CTA veya CTG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 103 ila 105 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GAG veya GAA'ya değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 103 ila 105 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GAT veya GAC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 211 ila 213 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CA, ACT, ACC veya ACG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 211 ila 213 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TGT veya TGC'ye değiştirilir veya SEK ID NO: 383'ün 508 ila 582 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CAT veya CAC'ye değiştirilir.

Buluş ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlamakta olup, burada nükleik asit SEK ID NO: 383'ün en az bir sekans modifikasyonuna veya SEK ID NO: 383'ün en az bir sekans modifikasyonunun eş değerine sahiptir ve SEK ID NO: 383'ün en az bir modifikasyonu 10 ila 12 kalıntılarındaki nükleotitlerin CCT, TTA, TTG, CTC, CTA veya CTG olduğu,

25 ila 27 kalıntılarındaki nükleotitlerin CCC, CCG, CCA veya CCT olduğu, 28 ila 30 kalıntılarındaki nükleotitlerin TCA, TCC, TCT, TCG, AGT veya AGC olduğu, 37 ila 39 kalıntılarındaki nükleotitlerin TAC veya TAT olduğu, 37 ila 39 kalıntılarındaki nükleotitlerin ATA, ATT veya ATC olduğu, 37 ila 39 kalıntılarındaki nükleotitlerin TGG olduğu, 52 ila 54 kalıntılarındaki nükleotitlerin TTC veya TTT olduğu, 73 ila 75 kalıntılarındaki nükleotitlerin GAG veya GAA olduğu, 73 ila 75 kalıntılarındaki nükleotitlerin CCC, CCG, CCA veya CCT olduğu, 88 ila 90 kalıntılarındaki nükleotitlerin GTG, GTC, GTA veya GTT olduğu, 100 ila 102 kalıntılarındaki nükleotitlerin TGT veya TGC olduğu, 100 ila 102 kalıntılarındaki nükleotitlerin TTG, TTA, CTT, CTC, CTA veya CTG olduğu, 103 ila 105 kalıntılarındaki nükleotitlerin GAG veya GAA olduğu, 103 ila 105 kalıntılarındaki nükleotitlerin GAG veya GAA olduğu, 130 ila 105 kalıntılarındaki nükleotitlerin GAT veya GAC olduğu, 211 ila 213 kalıntılarındaki nükleotitlerin ACA, ACT, ACC veya ACG olduğu, 211 ila 213 kalıntılarındaki nükleotitlerin TGT veya TGC olduğu veya 508 ila 582 kalıntılarındaki nükleotitlerin CAT veya CAC olduğu bir değişikliği içerir. Alternatif yönlerde sekans modifikasyonu değişimlerin en az ikisini, değişimlerin en az üçünü, değişimlerin en az dördünü, değişimlerin en az beşini, değişimlerin en az altısını, yedisini, sekizini, dokuzunu, onunu, on birini, on ikisini, on üçünü, on dördünü, on beşini, on altısını, on yedisini, on sekizini, on dokuzunu veya tamamını içerir.

Patent hakkı bildirimini ayrıca bunların "X14" modülünü yeni bir ksilanaz alt dizisi veya içeren bir kladını kodladığı yaygın bir yenilikle enzim kodlayan nükleik asitler sağlar (J Bacteriol. 2002 August; 184(15): 4124-4133). Patent hakkı bildirimini ayrıca bunların "X14" modülünü yeni bir ksilanaz alt dizisi veya içeren bir kladını kodladığı yaygın bir yenilikle enzim kodlayan nükleik asitler sağlar. Bu kladın X14 içeren ksilanaz elemanları aşağıdaki Tablo 9'da listelenmiştir. Yeni bir ksilanaz takımı aşağıdaki Tablo 9'da listelenen kladın ksilanaz elemanlarını ve ilgili enzimleri (örn, aşağıdaki Tablo 9'da listelendiği şekilde buluşun örnek bir enzimi ile bir sekans özdeşliğine sahip olan ksilanazlar) içerebilir.

Buluşun izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitleri tarafından kodlanan polipeptitler bir ksilanaz aktivitesine sahiptir, örn, burada ksilanaz aktivitesi dahili β -1,4-ksilosidik bağlarının katalize edilmesini içerir; bir endo-1,4-beta-ksilanaz aktivitesini içerir; daha küçük moleküler ağırlıklı ksiloz ve ksilo-oligomer üretmek için bir ksilan veya bir arabinoksilanın hidrolize edilmesini içerir; bir 1,4- β -glikosit-bağlı D-

ksilopiranoz içeren bir polisakkaritin hidrolize edilmesini içerir; bir selüloz veya bir hemiselülozun hidrolize edilmesini içerir; bir ağaç, ağaç ürünü, kağıt hamuru, kağıt ürünü veya kağıt atığında bir selüloz veya bir hemiselülozun hidrolize edilmesini içerir; bir besin veya bir gıda ürününde bir ksilanın veya bir arabinoksilanın hidrolizinin katalize edilmesini içerir veya bir mikrobiyal hücre veya bir bitki hücresinde bir ksilanın veya bir arabinoksilanın hidrolizinin katalize edilmesini içerir. Bir yönde ksilan aktivitesi 1,4-β-glikosit-bağlı D-ksilopiranozları içeren polisakkaritlerin hidrolize edilmesini veya hemiselülozların hidrolize edilmesini, örn, bir ağaç, ağaç ürünü, kağıt hamuru, kağıt ürünü veya atık kağıtta hemiselülozların hidrolize edilmesini içerir. Bir yönde arabinoksilan bir buğday arabinoksilanı gibi bir tahıl arabinoksilanıdır.

Bir yönde ksilanaz aktivitesi ksilanların bir tahıl tabanlı hayvan yeminde, bir maya veya bir birada, bir süt veya bir süt ürününde, bir meyve veya bir sebze de hidrolizinin katalize edilmesini içerir. Bir yönde ksilanaz aktivitesi ksilanların bir mikrobiyal hücrede veya bir bitki hücresinde hidrolizinin katalize edilmesini içerir.

Ksilanaz aktivitesi ısıya dayanıklı olabilir, örn, burada polipeptit yaklaşık 1 °C ile yaklaşık 5 °C arasında, yaklaşık 5 °C ile yaklaşık 15 °C arasında, yaklaşık 15 °C ile yaklaşık 25 °C arasında, yaklaşık 25 °C ile yaklaşık 37 °C arasında, 37 °C ile 95 °C veya yaklaşık 55 °C ile yaklaşık 85 °C arasında veya yaklaşık 70 °C ile yaklaşık 75 °C arasında veya yaklaşık 70 °C ile yaklaşık 95 °C arasında, yaklaşık 90 °C ile yaklaşık 95 °C arasında, yaklaşık 95 °C ile yaklaşık 105 °C arasında veya yaklaşık 95 °C ile yaklaşık 110 °C arasında bir sıcaklık aralığı içeren koşullar altında bir ksilanaz aktivitesini korur. Polipeptit yaklaşık 1 °C ile yaklaşık 5 °C arasında, yaklaşık 5 °C ile yaklaşık 15 °C, yaklaşık 15 °C ile yaklaşık 25 °C arasında, yaklaşık 25 °C ile yaklaşık 37 °C arasında bir sıcaklık aralığını içeren koşullar altında bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir veya buluşun polipeptitleri 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103,5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C'ye kadar veya daha fazla sıcaklıklarda aktiviteyi korur veya buluşun polipeptitleri 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103,5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C'ye kadar veya daha fazla sıcaklıklara maruz kalmanın ardından aktiviteyi korur.

Bir yönde ksilanaz aktivitesi ısı toleranslıdır, örn, burada protein 37 °C'den fazlası ile yaklaşık 95 °C veya yaklaşık 55 °C ile yaklaşık 85 °C arasında veya yaklaşık 70 °C ile

yaklaşık 75 °C arasında veya yaklaşık 70 °C ile yaklaşık 95 °C arasında, yaklaşık 90 °C ile yaklaşık 95 °C arasında, yaklaşık 95 °C ile yaklaşık 105 °C arasında veya yaklaşık 95 °C ile yaklaşık 110 °C arasında bir sıcaklığa maruz kalmasından sonra bir ksilanaz aktivitesini korur. Polipeptit yaklaşık 1 °C ile yaklaşık 5 °C arasında, yaklaşık 5 °C ile yaklaşık 15 °C arasında, yaklaşık 15 °C ile yaklaşık 25 °C arasında, yaklaşık 25 °C ile yaklaşık 37 °C arasında bir sıcaklık aralığı içeren koşullara maruz kalmasının ardından bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir. Buluşun polipeptitleri 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C veya daha fazla bir sıcaklığa maruz kalmasının ardından bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir.

Buluşun nükleik asitleri tarafından kodlanan ksilanaz polipeptitleri yaklaşık pH 6.5, pH 6, pH 5.5, pH 5, pH 4.5 veya pH 4 veya daha azını (daha asidik) içeren asidik koşullar altında aktiviteyi koruyabilir veya yaklaşık pH 6.5, pH 6, pH 5.5, pH 5, pH 4.5 veya pH 4 veya daha azını (daha asidik) içeren asidik koşullara maruz kalmasının ardından bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir veya yaklaşık pH 7, pH 7.5 pH 8.0, pH 8.5, pH 9, pH 9.5, pH 10, pH 10.5, pH 11, pH 11.5, pH 12, pH 12.5 veya daha fazlasını (daha bazik) içeren bazik koşullar altında aktiviteyi koruyabilir veya yaklaşık pH 7, pH 7.5 pH 8.0, pH 8.5, pH 9, pH 9.5, pH 10, pH 10.5, pH 11, pH 11.5, pH 12, pH 12.5 veya daha fazlasını (daha bazik) içeren bazik koşullara maruz kalmasının ardından bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir. Buluşun nükleik asitleri tarafından kodlayan polipeptitler en az yaklaşık 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C veya daha fazla bir sıcaklıkta ve en az yaklaşık pH 7.5 pH 8.0, pH 8.5, pH 9, pH 9.5, pH 10, pH 10.5, pH 11, pH 11.5, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (daha bazik) bir bazik pH'ta aktiviteyi koruyabilir.

Buluş buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asidi içeren ekspresyon kasetleri, klonlama araçları veya bir vektör (örn, ekspresyon vektörü) sağlar. Klonlama aracı bir viral vektör, bir faj, bir plazmid, bir kozmid, bir fosmid, bir bakteriyofaj veya bir yapay kromozom içerebilir. Viral vektör bir adeno vektör, bir retroviral vektör veya bir adeno ilişkili viral vektör içerebilir. Klonlama aracı bir bakteriyel yapay kromozom (BAC), bir bakteriyofaj P1- türevi vektör (PAC), bir maya yapay kromozomu (YAC) veya bir memeli yapay kromozomu (MAC) içeren bir yapay kromozom içerebilir.

Bir ksilanaz aktivitesi olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidi tanımlamaya yönelik nükleik asit problemleri buluşun örnek bir sekansını veya buluşun herhangi bir sekansını içeren bir nükleik asidin en az yaklaşık 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 veya daha fazla ardışık bazını içerebilmekte olup, burada isteğe bağlı olarak prob en az yaklaşık 10 ila 300, yaklaşık 25 ila 250, yaklaşık 10 ila 50, yaklaşık 20 ila 60, yaklaşık 30 ila 70, yaklaşık 40 ila 80, yaklaşık 60 ila 100 veya yaklaşık 50 ila 150 arasında ardışık baz içeren bir oligonükleotit içerir.

Bir ksilanaz aktivitesini kodlayan bir nükleik asidi amplifiye etmeye yönelik amplifikasyon primer çiftleri buluşun örnek bir sekansını veya buluşun herhangi bir sekansını (burada tanımlandığı gibi) veya bunun bir alt sekansını içeren bir nükleik asidi amplifiye edebilmekte olup, burada isteğe bağlı olarak amplifikasyon primer sekans çiftinin bir elemanı sekansın en az yaklaşık 10 ila 50 ardışık bazını veya sekansın yaklaşık 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 veya daha fazla ardışık bazını içeren bir oligonükleotiti içerir. Primer çifti buluşun örnek bir sekansının veya buluşun herhangi bir sekansının (burada tanımlandığı şekliyle) yaklaşık birinci (5') 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 veya daha fazla kalıntısı tarafından belirtilen bir sekansa sahip olan bir birinci elemanı ve birinci elemanın tamamlayıcı sarmalının yaklaşık birinci (5') 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 veya daha fazla kalıntısı tarafından belirtilen bir sekansa sahip olan bir ikinci elemanı içerebilir.

Ksilanaz- veya bir glukanaz-kodlayan nükleik asitler bu tür bir amplifikasyon primer çifti kullanarak bir polinükleotitin amplifikasyonu vasıtasıyla oluşturulabilmekte olup, burada isteğe bağlı olarak amplifikasyon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) vasıtasıyla olur. Nükleik asit bir gen kütüphanesinin amplifikasyonu vasıtasıyla oluşturulabilir ve isteğe bağlı olarak gen kütüphanesi bir çevresel kütüphanedir. İzole edilmiş, sentetik veya rekombinant ksilanazlar bu tür bir amplifikasyon primer çifti kullanarak bir polinükleotitin amplifikasyonu ile üretilen bir ksilanaz- ve/veya bir glukanaz-kodlayan nükleik asit vasıtasıyla kodlanabilir. Bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidi amplifiye etmeye ilişkin yöntemler bir şablon nükleik asidin buluşun örnek bir sekansını veya buluşun herhangi bir sekansını (burada tanımlandığı

şekliyle) veya bunun bir alt sekansını amplifiye edebilen bir amplifikasyon primer sekansla amplifikasyon adımını içerebilir.

Buluş buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit içeren ekspresyon kaseti, bir vektör veya bir klonlama aracı sağlamakta olup, burada isteğe bağlı olarak klonlama aracı bir viral vektör, bir plazmid, bir faj, bir fajemid, bir kozmid, bir fosmid, bir bakteriyofaj veya bir yapay kromozom içerir. Viral vektör bir adenovirüs vektörü, bir retroviral vektör veya bir adeno ilişkili viral vektör içerebilir veya yapay kromozom aracı bir bakteriyel yapay kromozom (BAC), bir bakteriyofaj PI- türevi vektör (PAC), bir maya yapay kromozomu (YAC) veya bir memeli yapay kromozomu (MAC) içeren bir yapay kromozom içerebilir.

10 Buluş buluşun bir nükleik asidini veya vektörünü veya buluşun bir ekspresyon kasetini veya klonlama aracını içeren dönüştürülmüş hücreler sağlar. Dönüştürülmüş hücre bir bakteriyel hücre, bir memeli hücresi, bir mantar hücresi, bir maya hücresi, bir böcek hücresi veya bir bitki hücresi olabilir.

Buluş buluşun bir sekansını içeren transjenik insan olmayan hayvanlar sağlar.

15 Transjenik insan olmayan hayvan bir fare, bir sıçan, bir tavşan, bir koyun, bir domuz, bir tavuk, bir keçi, bir balık, bir köpek veya bir inek olabilir. Buluş buluşun bir sekansını içeren transjenik bitkiler sağlamakta olup, örn, burada bitki bir mısır bitkisi, bir sorgum bitkisi, bir patates bitkisi, bir domates bitkisi, bir buğday bitkisi, bir yağ tohumu bitkisi, bir kolza tohumu bitkisi, bir soya fasulyesi bitkisi, bir pirinç bitkisi, bir arpa bitkisi, bir 20 çim veya bir tütün bitkisidir. Buluş buluşun bir sekansını içeren transjenik tohumlar sağlamakta olup, örn, burada tohum bir mısır tohumu, bir buğday tanesi, bir yağ tohumu, bir kolza tohumu, bir soya fasulyesi tohumu, bir palm tanesi, bir ayçiçeği tohumu, bir susam tohumu, bir pirinç, bir arpa, bir yemiş veya bir tütün bitkisi tohumudur.

25 Antisens oligonükleotitler buluşun bir sekansı (örn, buluşun örnek sekansları dahil olmak üzere) veya bunun bir alt sekansı için katı koşullar altında hibritlenebilen veya bunlara tamamlayıcı bir nükleik asit sekansını içerebilmekte olup, burada isteğe bağlı olarak antisens oligonükleotit uzunlukça yaklaşık 10 ila 50, yaklaşık 20 ila 60, yaklaşık 30 ila 70, yaklaşık 40 ila 80 veya yaklaşık 60 ila 100 baz arasındadır ve isteğe bağlı olarak katı koşullar yaklaşık 65 °C'lik bir sıcaklıkta yaklaşık 15 dakika boyunca 0.2X 30 SSC'de bir yıkama içeren bir yıkama adımı içerir.

Bir hücrede bir ksilanaz mesajının çevrilmesini inhibe etme yöntemleri buluşun bir sekansı (örn buluşun örnek sekansları dahil olmak üzere) için katı koşullar altında hibritlenebilen veya buna tamamlayıcı bir nükleik asit sekansı içeren bir antisens oligonükleotiti hücreye uygulamayı veya hücrede eksprese etmeyi içerebilir.

- 5 Çift sarmallı inhibitör RNA (RNAi) molekülleri buluşun bir sekansının (örn, buluşun örnek sekansları dahil olmak üzere) bir alt sekansını içerebilir. Çift sarmallı inhibitör RNA (RNAi) molekülü uzunlukça yaklaşık 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya 30 veya daha fazla çift yönlü nükleotit olabilir. Bir hücrede bir ksilanazın ekspresyonunu inhibe etme yöntemleri bir çift sarmallı inhibitör
- 10 RNA'nın (iRNA) hücreye uygulanmasını veya hücrede eksprese edilmesini içerebilmekte olup, burada RNA buluşun bir sekansının (örn, buluşun örnek sekansları dahi olmak üzere) bir alt sekansını içerir.

Buluş izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler veya bir ksilanaza özgü bir immün tepki oluşturabilen bir ksilanaz aktivitesine sahip olan polipeptitler (örn, bir epitop) sağlamakta olup, (i) SEK ID NO: 384 veya SEK ID NO: 482 sekansına sahip olan bir amino asit sekansı içerir. Buluşun polipeptit veya peptit sekansları burada açıklanan bir antikor tarafından spesifik olarak bağlanan polipeptitleri veya peptitleri (örn, epitopları) veya patent hakkı bildiriminin bir antikorunu üretebilen polipeptitleri veya peptitleri içerir.

- 20 Buluşun çeşitli ksilanaz enzimleri SEK ID NO: 384'ün (üç amino asit kalıntısı daha sonra SEK ID NO: 382'nin polipeptitinin karboksi terminal ucundan uzaklaştırılmış olup, bu da SEK ID NO: 384 ile sonuçlanmıştır) ve SEK ID NO: 482'nin sekanslarını içerir (bkz, aşağı). Buluş ksilanaz aktivitesine sahip olan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlamakta olup, burada polipeptit buluşun örnek bir
- 25 sekansının bir sekans modifikasyonunu içeren bir sekansa sahiptir, burada sekans modifikasyonu şu değişimlerin en az birini, ikisini, üçünü, dördünü, beşini, altısını, yedisini, sekizini, dokuzunu, onunu, on birini, on ikisini, on üçünü, on dördünü, on beşini, on altısını, on yedisini, on sekizini, on dokuzunu veya tamamını içerir: SEK ID NO: 384'ün 4 kalıntısındaki treoninin eş değerindeki amino asit lösindir, SEK ID NO:
- 30 384'ün 9 kalıntısındaki serinin eş değerindeki amino asit prolindir, SEK ID NO: 384'ün 10 kalıntısındaki glutaminin eş değerindeki amino asit serindir, SEK ID NO: 384'ün 13 kalıntısındaki treoninin eş değerindeki amino asit fenilamindir, SEK ID NO: 384'ün 13 kalıntısındaki treoninin eş değerindeki amino asit tirozindir, SEK ID NO: 384'ün 13

kalıntısındaki treoninin eş değerindeki amino asit izolösindir, SEK ID NO: 384'ün 13 kalıntısındaki treoninin eş değerindeki amino asit triptofandır, SEK ID NO: 384'ün 14 kalıntısındaki asparjinin eş değerindeki amino asit histidindir, SEK ID NO: 384'ün 18 kalıntısındaki tirozinin eş değerindeki amino asit fenilalanindir, SEK ID NO: 384'ün 25 kalıntısındaki serininin eş değerindeki amino asit glutamik asittir, SEK ID NO: 384'ün 25 kalıntısındaki serininin eş değerindeki amino asit prolindir, SEK ID NO: 384'ün 30 kalıntısındaki asparjinnin eş değerindeki amino asit valindir, SEK ID NO: 384'ün 34 kalıntısındaki glutaminin eş değerindeki amino asit sisteindir, SEK ID NO: 384'ün 34 kalıntısındaki glutaminin eş değerindeki amino asit histidindir, SEK ID NO: 384'ün 34 kalıntısındaki glutaminin eş değerindeki amino asit histidindir, SEK ID NO: 384'ün 34 kalıntısındaki glutaminin eş değerindeki amino asit lösindir, SEK ID NO: 384'ün 35 kalıntısındaki serinin eş değerindeki amino asit glutamik asittir, SEK ID NO: 384'ün 71 kalıntısındaki serinin eş değerindeki amino asit treonindir, SEK ID NO: 384'ün 71 kalıntısındaki serinin eş değerindeki amino asit sisteindir veya SEK ID NO: 384'ün 194 kalıntısındaki serinin eş değerindeki amino asit histidindir.

Buluş ksilanaz aktivitesine sahip olan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlamakta olup, burada polipeptit SEK ID NO: 384'ün amino asit sekansı için aşığıdaki değişikliklerin birini veya daha fazlasını içeren bir sekansa sahiptir: amino asit pozisyonu 4'teki treonin lösindir; amino asit pozisyonu 9'daki serin prolindir; amino asit pozisyonu 10'daki glutamin serindir; amino asit pozisyonu 13'teki treonin tirozindir; amino asit pozisyonu 13'teki treonin izolösindir; amino asit pozisyonu 13'teki treonin triptofandır; amino asit pozisyonu 14'teki asparjin histidindir; amino asit pozisyonu 18'deki tirozin fenilalanindir; amino asit pozisyonu 25'teki serin glutamik asittir; amino asit pozisyonu 25'teki serin prolindir; amino asit pozisyonu 30'daki asparjin sisteindir; amino asit pozisyonu 34'teki glutamin sisteindir; amino asit pozisyonu 4'teki glutamin histidindir; amino asit pozisyonu 34'teki glutamin lösindir; amino asit pozisyonu 35'teki serin glutamik asittir; amino asit pozisyonu 4'teki serin aspartik asittir; amino asit pozisyonu 71'deki serin treonindir; amino asit pozisyonu 71'deki serin sisteindir veya amino asit pozisyonu 194'teki serin histidindir. Alternatif yönlerde sekans modifikasyonu değişimlerin en az ikisini, değişimlerin en az üçünü içerir veya sekans değişimi değişimlerin en az dördünü, değişimlerin en az beşini, değişimlerin en az altısını, yedisini, sekizini, dokuzunu, onunu, on birini, on ikisini, on

üçünü, on dördünü, on beşini, on altısını, on yedisini, on sekizini, on dokuzunu veya tamamını içerir.

Buluşun izole edilmiş, sentetik veya rekombinant peptitleri bir ksilanaz aktivitesine sahiptir, örn, burada ksilanaz aktivitesi dahili β -1,4-ksilosidik bağlarının katalize edilmesini içerir; bir endo-1,4-beta-ksilanaz aktivitesini içerir; daha küçük moleküler ağırlıklı ksiloz ve ksilo-oligomer üretmek için bir ksilan veya bir arabinoksilanın hidrolize edilmesini içerir; bir 1,4- β -glikosit-bağlı D-ksilopiranoz içeren bir polisakkaritin hidrolize edilmesini içerir; bir selüloz veya bir hemiselülozun hidrolize edilmesini içerir; bir ağaç, ağaç ürünü, kağıt hamuru, kağıt ürünü veya kağıt atığında bir selüloz veya bir hemiselülozun hidrolize edilmesini içerir; bir besin veya bir gıda ürününde bir ksilanın veya bir arabinoksilanın hidrolizinin katalize edilmesini içerir veya bir mikrobiyal hücre veya bir bitki hücresinde bir ksilanın veya bir arabinoksilanın hidrolizinin katalize edilmesini içerir. Ksilan bir arabinoksilan, örn, bir suda çözünebilen arabinoksilan, örn, bir hamur veya bir ekmek ürünündeki bir suda çözülebilen arabinoksilan içerebilir.

Bir yönde aktivite örneğin 1,4- β -glikosit-bağlı D-ksilopiranozları içeren polisakkaritlerin hidrolize edilmesini veya hemiselülozların hidrolize edilmesini, örn, bir ağaç, ağaç ürünü, kağıt hamuru, kağıt ürünü veya atık kağıtta hemiselülozların hidrolize edilmesini içerir.

Bir yönde ksilanaz aktivitesi polisakkaritlerin, örn, ksilanların bir tahıl tabanlı hayvan yeminde, bir maya veya bir birada, bir süt veya bir süt ürününde, bir meyve veya bir sebze de hidrolizinin katalize edilmesini içerir. Bir yönde ksilanaz aktivitesi ksilanların bir mikrobiyal hücrede veya bir bitki hücresinde hidrolizinin katalize edilmesini içerir.

Buluş buluşun bir polipeptitini içeren ve bir sinyal sekansından veya bir prepro sekanstan muaf olan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlar. Buluş buluşun bir polipeptitini içeren ve bir sinyal sekansından veya bir heterolog sinyal sekansına veya bir heterolog prepro sekansa sahip olan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlar.

Buluşun bir polipeptiti bir miligram protein başına yaklaşık 100 ila yaklaşık 1000 birim, bir miligram protein başına yaklaşık 500 ila yaklaşık 750 birim, bir miligram protein başına yaklaşık 500 ila yaklaşık 1200 birim, bir miligram protein başına yaklaşık 750 ila yaklaşık 1000 birim arasında yaklaşık 37 °C'de spesifik bir aktivite içeren ksilanaz aktivitesine sahip olabilir. Birimler kağıt hamurunun 0,1 ila 20 birim/g olarak

tanımlanabilmekte olup, burada aşağıda detaylı şekilde açıklanan, Nelson Somogyi analizinde açıklandığı şekliyle bir substrat olarak arabinoksilan kullanarak bir birim bir mg enzim başına dakikada salınan ksilozun umolüne eşittir. Buluşun polipeptitleri bir gram kağıt hamuru başına yaklaşık 0,05 ila 20 birim veya bir gram kağıt hamuru başına

5 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 veya 20 birim aralığında ksilanaz aktivitesine sahip olabilir (burada Nelson Somogyi analizinde açıklandığı şekliyle bir substrat olarak arabinoksilan kullanarak bir birim bir mg enzim başına dakikada salınan ksilozun umolüne eşittir).

10 Polipeptitlerin ısı toleransı yüksek bir sıcaklığa ısıtıldıktan sonra 37 °C'de spesifik ksilanaz aktivitesinin en azından yarısının korunmasını içerebilir. Isı toleransı yüksek bir sıcaklığa ısıtıldıktan sonra bir miligram protein başına yaklaşık 500 ila yaklaşık 1200 birim aralığında 37 °C'de spesifik aktivitenin korunmasını içerir.

Buluşun polipeptitleri en az bir glikosilasyon alanı içerebilir veya ayrıca bir polisakkarit

15 içerebilir. Glikosilasyon bir N-bağlı glikosilasyon olabilir, örn, burada polipeptit bir P. pastoris veya bir S. pombe eksprese edildikten sonra glikosilatlanabilir.

Buluşun polipeptitleri yaklaşık pH 6.5, pH 6, pH 5.5, pH 5, pH 4.5 veya pH 4 veya daha azını (daha asidik) içeren asidik koşullar altında aktiviteyi koruyabilir veya yaklaşık pH

20 6.5, pH 6, pH 5.5, pH 5, pH 4.5 veya pH 4 veya daha azını (daha asidik) içeren asidik koşullara maruz kalmasının ardından bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir veya yaklaşık pH 7, pH 7.5 pH 8.0, pH 8.5, pH 9, pH 9.5, pH 10, pH 10.5, pH 11, pH 11.5, pH 12, pH 12.5 veya daha fazlasını (daha bazik) içeren bazik koşullar altında aktiviteyi koruyabilir veya yaklaşık pH 7, pH 7.5 pH 8.0, pH 8.5, pH 9, pH 9.5, pH 10, pH 10.5, pH 11, pH 11.5, pH 12, pH 12.5 veya daha fazlasını (daha bazik) içeren bazik koşullara maruz

25 kalmasının ardından bir ksilanaz aktivitesini koruyabilir. Buluşun polipeptitleri en az yaklaşık 80 °C, 81 °C, 82 °C, 83 °C, 84 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C veya 90 °C'lik bir sıcaklıkta veya en az yaklaşık pH 7.5 pH 8.0, pH 8.5, pH 9, pH 9.5, pH 10, pH 10.5, pH 11, pH 11.5, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla bir bazik pH' ta aktiviteyi koruyabilir.

30 Buluşun buluşun bir polipeptitini içeren protein preparasyonu sağlamakta olup, burada protein preparasyonu bir sıvı, bir bulamaç, bir katı veya bir jel içerir. Heterodimerler

buluşun bir polipeptitini ve bir ikinci alanı içerebilir. İkinci alan bir polipeptit olabilir ve heterodimer bir füzyon proteindir. İkinci alan bir epitop veya bir etiket olabilir.

Homodimerler veya heterodimerler buluşun bir polipeptitini içerebilir. İmmobilize polipeptitler buluşun bir sekansını, bunun bir alt sekansını, buluşun bir nükleik asidi 5 tarafından kodlanan bir polipeptiti veya buluşun bir polipeptitini ve bir ikinci alanı içeren bir polipeptiti içerebilmekte olup, örn, burada polipeptit bir hücre, bir araç, bir lipozom, bir film, bir membran, bir metal, bir reçine, bir polimer, bir seramik, bir cam, bir mikroelektrot, bir grafitik parçacık, bir ekmek, bir boncuk, bir jel, bir plaka, bir dizi, bir kapiler tüp, bir kristal, bir tablet, bir hap, bir kapsül, bir toz, bir aglomera, bir yüzey, bir 10 gözenekli yapı veya ağaç kabuğu parçaları, kağıt hamuru, kağıt ve bunlardan üretilen malzemeler içinde veya üzerinde hareketsiz hale getirilir.

Buluşun ksilanazları tek başına veya ksilanaz ve/veya bir glukanaaz ve selülaz, mannaz, proteaz, lipaz, amilaz gibi başka hidrolitik enzimlerin veya lakkaz, peroksidaz, katalaz, oksidaz veya redüktaz gibi redoks enzimlerinin karışımı (bir "kokteyli") olarak 15 kullanılabilir veya formüle edilebilir. Bunlar bir toz, bir liyofilize preparasyon, bir granül, bir tablet, bir çubuk, bir kristal, bir kapsül, bir hap, bir pelet gibi bir katı formda veya bir sulu solüsyon, bir aerosol, bir jel, bir macun, bir bulamaç, bir sulu/yağ emülsiyonu, bir krem, bir kapsül veya bir veziküler veya misel süspansiyon gibi bir sıvı formunda formüle edilebilir. Buluşun formülasyonları aşağıdaki bileşenlerin herhangi birini veya 20 bir kombinasyonunu içerebilir: bir polietilen glikol, bir polivinil alkol, bir gliserol gibi polioller, bir sükroz, bir sorbitol, bir trehaloz, bir glikoz, bir fruktoz, bir maltoz, bir mannoz gibi bir şeker, bir arap sakızı, bir karajenan, bir alginat, bir dekstran, bir selülozik türev, bir pektin gibi bir jelleştirici, bir sodyum klorür, bir sodyum sülfat, bir amonyum sülfat, bir kalsiyum klorür, bir magnezyum klorür, bir çinko klorür, bir çinko 25 sülfat, bir yağ asidinin veya bir yağ asidi türevinin bir tuzu gibi bir tuz, bir EDTA, bir EGTA, bir sodyum sitrat gibi bir metal şelatörü, bir yağ asidi veya bir yağ asidi türevi, bir paraben, bir sorbat, bir benzoat gibi bir antimikrobiyal ajan, bir proteaz gibi bir enzimin etkisini bloke etmek için ilave bir modüle edici bileşik, bir BSA, bir buğday hidrolizati, bir borat bileşiği, bir amino asit veya bir peptit gibi bir yarı protein, uygun pH 30 veya sıcaklık modüle edici bileşik, bir iyonik olmayan ve/veya bir iyonik deterjan gibi bir emülgatör, bir sistin/sistein, bir glutatyonin, oksitlenmiş bir glutatyonin gibi bir redoks ajanı veya bir askorbik asit gibi bir antioksidan bileşik veya bir dağıtıcı. Çapraz bağlama

ve pegilasyon gibi protein modifikasyonu, yağ asidi modifikasyonu, glikosilasyon ayrıca enzim stabilitesini geliştirmek için kullanılabilir.

Diziler buluşun immobilize polipeptitini (polipeptitlerini) ve/veya nükleik asitlerini ve buluşun bir immobilize oligonükleotitini içeren dizileri içerebilir. Enzimler, bunların
5 fragmanları ve enzimleri kodlayan nükleik asitler veya buluşun probları ve bunların fragmanları bir katı desteğe sabitlenebilir ve bu uygulamalar buluşun enzimlerinin ve nükleik asitlerinin endüstriyel, medikal, araştırma, farmasötik, gıda ve yem ve gıda ve yem desteği işleme ve diğer uygulama ve işlemlerde kullanımı ekonomik ve verimli olabilir. Örneğin spesifik bir kimyasal reaksiyonda kullanılan bir enzim konsorsiyumu
10 veya kokteyli (veya bunların aktif fragmanları) bir katı desteğe eklenebilir ve bir işlem fıçısına koyulabilir. Enzimatik reaksiyon meydana gelebilir. Daha sonra katı destek, tekrar kullanım için buraya sabitlenen enzimlerle birlikte fıçıdan çıkartılır. İzole edilmiş nükleik asit bir katı desteğe sabitlenebilir. Katı destek bir jel, bir polimer, bir seramik, bir cam, bir mikro elektrot ve bunların herhangi bir kombinasyonundan oluşan gruptan
15 seçilebilir.

Örneğin kullanışlı katı destekler jelleri içerir. Jellere ilişkin bazı örnekler sefaroze, jelatin, glutaraldehit, kitosan işlenmiş glutaraldehit, albumin-glutaraldehit, kitosan-Ksantan, toyo inci jel (polimer jel), alginat, alginat-polilizin, karajenan, agaroz, glikosil agaroz, manyetik agaroz, dekstran-agaroz, poli(Karbomoil Sülfonat) hidrojen, BSA-PEG
20 hidrojel, fosforlanmış polivinil alkol (PVA), monoaminoetil-N-aminoetil (MANA), amino veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir. Başka bir faydalı katı destek reçine veya polimerlerdir. Reçinelere veya polimerlere ilişkin bazı örnekler selüloz, akrilamid, naylon, rayon, polyester, anyon değişim reçinesi, AMBERLITE™ XAD-7, AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50, polivinil,
25 poliakrilik, polimetakrilat veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir. Başka bir faydalı katı destek tipi seramiktir. Bazı örnekler gözenekli olmayan seramik, gözenekli seramik, SiO₂, Al₂O₃ içerir. Başka bir faydalı katı destek tipi camdır. Bazı örnekler gözenekli olmayan camı, gözenekli camı, aminopropil camı veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir. Kullanılan başka bir katı destek türü bir mikro elektrottur. Bir
30 örnek polietilenimin kaplı bir magnetittir. Grafitik parçacıklar bir katı destek olarak kullanılabilir. Başka bir katı destek örneği bir kırmızı kan hücresi gibi bir hücredir.

Enzimleri veya bunların fragmanlarını veya nükleik asitleri bir katı destek üzerinde hareketsiz hale getirmek için teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen birçok yöntem

vardır. Bu yöntemlere ilişkin bazı örnekler adzorpasyon aracılığıyla, kovalent bağlama aracılığıyla, çapraz bağlama aracılığıyla, bir kimyasal reaksiyon veya işlem aracılığıyla, kapsülleme aracılığıyla, hapsedme aracılığıyla, kalsiyum aljinat aracılığıyla veya poli (2-hidroksietil metakrilat) aracılığıyla kalsiyumelektrostatik damla oluşumunu, elektro kimyasal araçları, Benzer yöntemler Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C. 1987. Academic Press. S.P. Colowick ve N. O. Kaplan tarafından gözden geçirilen Volume 136; and Immobilization of Enzymes and Cells. 1997. Humana Press. Edited by G. F. Bickerstaff. Series: Methods in Biotechnology, Edited by J. M. Walker yayınlarında açıklanmaktadır.

10 Patent hakkı bildiri buluşun bir polipeptitine spesifik olarak bağlanan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant antikolar sağlar. Antikor bir monoklonal veya bir poliklonal antikor olabilir veya bir tek zincirli antikordur. Hibridomalar buluşun bir polipeptitine spesifik olarak bağlanan bir antikor içerebilir.

Bir ksilanaz aktivitesi olan bir polipeptiti izole etme veya tanımlama yöntemleri (a) bu tür bir antikor sağlanması; (b) polipeptitleri içeren bir örnek sağlanması ve (c) (b) adımıdaki örneğin (a) adımıdaki antikorla antikorun polipeptite spesifik olarak bağlanabildiği, bu sayede bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti izole edebildiği veya tanımlayabildiği koşullar altında temas ettirilmesi adımlarını içerebilir. Bir anti-ksilanaz antikor yapma yöntemleri bir insan olmayan hayvana buluşun bir nükleik asidinin veya bunun bir alt sekansının bir hümmoral immün tepki oluşturmak, bu sayede bir anti-ksilanaz antikor yapmak için yeterli bir miktarda uygulanmasını içerir. Bir anti-ksilanaz antikor yapma yöntemleri bir insan olmayan hayvana buluşun bir polipeptitin veya bunun bir alt sekansının bir hümmoral immün tepki oluşturmak, bu sayede bir anti-ksilanaz antikor yapmak için yeterli bir miktarda uygulanmasını içerir.

25 Buluş bir rekombinant polipeptit üretme yöntemleri sağlamakta olup, (a) faal olarak bir promotöre bağlı bir nükleik asit sağlanması, burada nükleik asit buluşun bir sekansını içerir ve (b) (a) adımıdaki nükleik asidin polipeptitin ekspresyonuna olanak sağlayan, bu sayede bir rekombinant polipeptit üretilmesine olanak sağlayan koşullar altında eksprese edilmesi adımlarını içerir. Yöntem ayrıca (a) adımıdaki nükleik asit ile bir konak hücrenin transforme edilmesini, ardından (a) adımıdaki nükleik asidin eksprese edilmesini, bu sayede transforme edilmiş bir hücrede bir rekombinant polipeptit üretilmesini içerir.

Buluş bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti tanımlamak için yöntemler sağlamakta olup, (a) buluşun bir polipeptitinin sağlanması; (b) bir ksilanaz substratın sağlanmasını ve (c) (b) adımıdaki substrat ile polipeptitin temas ettirilmesi ve substrat miktarında bir azalma veya bir reaksiyon ürünü miktarında bir artış tespit edilmesi adımını içerir, burada substratın miktarındaki bir azalma veya reaksiyon ürününün miktarındaki bir artış bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti tespit eder.

Bir ksilanaz, bir mannaz ve/veya bir glukanz substratı tanımlamak için şu adımları içerir: (a) buluşun bir polipeptitinin sağlanması; (b) bir test substratının sağlanmasını ve (c) (b) adımıdaki test substratı ile polipeptitin temas ettirilmesi ve substrat miktarında bir azalma veya bir reaksiyon ürünü miktarında bir artış tespit edilmesi adımını içerir, burada substratın miktarındaki bir azalma veya reaksiyon ürününün miktarındaki bir artış test substratını bir ksilanaz, bir mannaz ve/veya bir glukanz substratı olarak tanımlar.

Bir test bileşiğinin spesifik olarak bir polipeptite bağlanıp bağlanmadığını belirlemeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) bir nükleik asidin veya nükleik asidi içeren bir vektörün nükleik asidin bir polipeptite çevrimi için uygun koşullar altında eksprese edilmesi, burada nükleik asit buluşun bir sekansına sahiptir; (b) bir test bileşiğinin sağlanması; (c) polipeptitin test bileşiği ile temas ettirilmesi ve (d) (b) adımıdaki test bileşiğinin spesifik olarak polipeptite bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi.

Bir test bileşiğinin spesifik olarak bir polipeptite bağlanıp bağlanmadığını belirlemeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) buluşun bir polipeptitinin sağlanması; (b) bir test bileşiğinin sağlanması; (c) test bileşiği ile polipeptitin temas ettirilmesi ve (d) (b) adımıdaki test bileşiğinin spesifik olarak polipeptite bağlanıp bağlanmadığının belirlenmesi.

Bir ksilanaz aktivitesinin bir modülatörünü tanımlamak için yöntemler şu adımları içerir: (a) buluşun bir polipeptitinin sağlanması; (b) bir test bileşiğini sağlanması; (c) (a) adımıdaki polipeptit ile (b) adımıdaki test bileşiğinin temas ettirilmesi ve bir ksilanazın bir aktivitesinin ölçülmesi, burada test bileşiği olmadan aktiviteyle karşılaştırılan test bileşiğinin mevcudiyetindeki ksilanaz aktivitesi test bileşiğinin ksilanaz aktivitesini modüle ettiğine dair bir belirleme sağlar. Ksilanaz aktivitesi bir ksilanaz substratın sağlanması ve substratın miktarında bir azalma veya bir reaksiyon ürününün miktarında bir artış, substratın miktarında bir artış veya bir reaksiyon

ürünün miktarında bir azalmanın tespit edilmesi vasıtasıyla ölçülebilir. Substratın veya reaksiyon ürünün test bileşiği olmaksızın miktarıyla karşılaştırıldığında substratın miktarında bir azalma veya reaksiyon ürünün miktarında bir artış test bileşiğini bir ksilanaz aktivitesinin bir aktüatörü olarak tanımlar. Substratın veya reaksiyon ürünün

5 test bileşiği olmaksızın miktarıyla karşılaştırıldığında substratın miktarında bir artış veya reaksiyon ürünün miktarında bir azalma test bileşiğini bir ksilanaz aktivitesinin bir inhibitörü olarak tanımlar.

Bilgisayar sistemleri bir işlemci ve bir veri deposu içermekte olup, burada söz konusu veri deposu üzerinde bir polipeptit sekansı veya bir nükleik asit sekansı depolanmıştır,

10 burada polipeptit sekansı buluşun bir sekansını, buluşun bir nükleik asidi vasıtasıyla kodlanan bir polipeptiti içerir. Bilgisayar sistemleri ayrıca bir sekans karşılaştırma algoritması ve üzerinde depolanmış en az bir referans sekansa sahip olan bir veri deposu içermektedir. Sekans karşılaştırma algoritması polimorfizmleri belirten bir bilgisayar programı içerir. Bilgisayar sistemi ayrıca söz konusu sekansta bir veya daha

15 fazla özelliği tanımlayan bir tanımlayıcı içerebilir. Bir sekansta bir özelliği tanımlamaya yönelik yöntemler: (a) sekansın bir sekanstaki bir veya daha fazla özelliği tanımlayan bir bilgisayar programı kullanarak okunması, burada sekans bir polipeptit sekansı veya buluşun bir nükleik asit sekansını içerir ve (b) bilgisayar programı ile sekanstaki bir veya daha fazla özelliğin tanımlanması adımlarını içerir. Bir birinci sekans ile bir ikinci

20 sekansı karşılaştırmaya ilişkin yöntemler: (a) birinci sekansın ve ikinci sekansı sekansları karşılaştıran bir bilgisayar programı kullanımı aracılığıyla okunması, burada birinci sekans buluşun bir polipeptit sekansını veya bir nükleik asit sekansını içerir ve (b) birinci sekans ve ikinci sekans arasındaki farkların bilgisayar programı ile belirlenmesi adımlarını içerir. Birinci sekans ve ikinci sekans arasındaki farkların

25 belirlenmesi adımı ayrıca polimorfizmlerin belirlenmesi adımını içerebilir. Yöntem ayrıca söz konusu sekansta bir veya daha fazla özelliği tanımlayan bir tanımlayıcı içerebilir. Yöntem ayrıca bir bilgisayar programı kullanarak birinci sekansın okunmasını ve sekanstaki bir veya daha fazla özelliğin tanımlanmasını içerir.

Çevresel bir örnekten bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir

30 nükleik asidi izole etmeye veya geri kazanmaya yönelik yöntemler: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidi amplifiye etmek için bir amplifikasyon primer sekansı çiftinin sağlanması, burada primer çift buluşun bir nükleik asidini amplifiye edebilir; (b) çevresel örnekten bir nükleik asidin izole edilmesi veya

çevresel örneğin örnekteki nükleik asidin amplifikasyon primer çiftine hibridizasyon için erişilebilir olacağı şekilde işlenmesi ve (c) (b) adımındaki amplifikasyon primer çiftinin ve çevresel örnekten nükleik asidin kombine edilmesi, bu sayede bir çevresel örnekten bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidin izole edilmesi veya geri kazanılması adımlarını içerir. Amplifikasyon primer sekansı çiftinin bir veya her bir elemanı buluşun bir sekansının en az yaklaşık 10 ila 50 ardışık bazını içeren bir oligonükleotiti içerebilir.

Çevresel bir örnekten bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidi izole etmeye veya geri kazanmaya yönelik yöntemler: (a) buluşun bir nükleik asidini veya bunun bir alt sekansını içeren bir polinükleotit probun sağlanması; (b) çevresel örnekten bir nükleik asidin izole edilmesi veya çevresel örneğin örnekteki nükleik asidin (a) adımındaki bir polinükleotit için erişilebilir olacağı şekilde işlenmesi ve (c) (a) adımındaki polinükleotit probu ile (b) adımındaki izole edilmiş nükleik asidin veya işlenmiş çevresel örneğin kombine edilmesi ve (d) (a) adımındaki polinükleotit probu ile spesifik olarak hibritlenen bir nükleik asidin izole edilmesi, bu sayede bir çevresel örnekten bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidin izole edilmesi veya geri kazanılması adımlarını içerir. Çevresel örnek bir su örneği, bir sıvı örneği, bir toprak örneği, bir hava örneği veya bir biyolojik örnek içerebilir. Biyolojik örnek bir bakteriyel hücre, bir protozoan hücre, bir mantar hücresi, bir maya hücresi, bir böcek hücresi, bir bitki hücresi veya bir memeli hücrelerinden türetilir.

Bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidin bir varyantını oluşturmaya ilişkin yöntemler: (a) buluşun bir nükleik asidini içeren bir şablon nükleik asidin sağlanması ve (b) şablon nükleik asidin bir varyantını oluşturmak için şablon sekanstaki bir veya daha fazla nükleotitin modifiye edilmesi, silinmesi veya eklenmesi veya bunların bir kombinasyonu adımlarını içerir. Yöntem ayrıca bir varyant ksilanaz polipeptit oluşturmak için varyant nükleik asidin eksprese edilmesini içerebilir. Modifikasyonlar, eklemeler veya silmeler hata eğilimli PCR, karıştırma, oligonükleotide yönelik mutagenез, düzenek PCR, cinsel PCR mutagenез, in vivo mutagenез, kaset mutagenез, tekrarlanan topluluk mutagenезi, üssel topluluk mutagenезi, alana özgü mutagenез, yeniden gen düzenlenmesini (örn, GeneReassembly, bkz, örn, U.S. 6,537,776), Gen Alan Doygunluk Mutagenезi (GSSM), sentetik ligasyon yeniden düzenlenmesi (SLR) veya bunların bir kombinasyonunu içeren bir yöntem vasıtasıyla

gerçekleştirilebilir Modifikasyonlar, eklemeler veya silmeler rekombinasyon, tekrarlamalı sekans rekombinasyonu, fosfotiyolat modifiye edilmiş DNA mutagenesi, urasil içeren şablon mutagenез, aralıklı çift mutagenез, nokta eşleşme onarım mutagenesi, onarımı eksik konak tür mutagenesi, kimyasal mutagenез, radyojenik mutagenез, silme mutagenesi, kısıtlama seçim mutagenesi, kısıtlama saflaştırma mutagenesi, yapay gen sentezi, topluluk mutagenesi, kimerik nükleik asit multimer oluşumu ve bunların bir kombinasyonunu içeren bir yöntem vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

Yöntem şablon nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptitinkinden değiştirilmiş veya farklı bir aktiviteye veya değiştirilmiş veya farklı bir stabiliteye sahip olan bir ksilanaz üretilene kadar sürekli tekrarlanabilir. Varyant ksilanaz polipeptit sıcaklığa dayanıklı olabilir ve yüksek bir sıcaklığa maruz kaldıktan sonra bazı aktivitelerini koruyabilir. Varyant ksilanaz polipeptit bir şablon nükleik asit tarafından kodlanan ksilanazla karşılaştırıldığında artan glikosilasyona sahip olabilir. Alternatif olarak varyant ksilanaz polipeptit yüksek bir sıcaklık altında bir ksilanaz aktivitesine sahip olup, burada şablon nükleik asit tarafından kodlanan ksilanaz yüksek sıcaklık altında aktif değildir. Yöntem şablon nükleik asidinkinden değiştirilmiş bir kodon kullanımına sahip olan bir ksilanaz kodlama sekansı üretilene kadar sürekli olarak tekrarlanabilir. Yöntem şablon nükleik asidinkinden daha yüksek veya daha düşük seviyede mesaj ekspresyonuna veya stabilitesine sahip olan bir ksilanaz geni üretilene kadar sürekli olarak tekrarlanabilir. Nihai ksilanaz ürününün formülasyonu üründeki ksilanazın performansına ilişkin bir artış veya modülasyon sağlar.

Bir konak hücrede ekspresyonunu arttırmak için bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asitteki kodonları modifiye etmeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan buluşun bir nükleik asidinin sağlanması ve (b) (a) adımıdaki nükleik asitteki tercih edilmeyen ve az tercih edilen bir kodonun tanımlanması ve bunun değiştirilmiş kodon olarak aynı amino asidi kodlayan tercih edilen veya nötr olarak kullanılan bir kodonla değiştirilmesi, burada tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında fazla sunulan bir kodondur ve tercih edilmeyen veya az tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında az sunulan bir kodondur, bu sayede bir konak hücredeki ekspresyonunu arttırmak üzere nükleik asit modifiye edilir.

Bir ksilanaz aktiviteye sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asitteki kodonları modifiye etmeye yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) buluşun bir nükleik asidinin sağlanması ve (b) (a) adımıdaki nükleik asitteki bir kodonun tanımlanması ve bunun değiştirilen kodon olarak aynı amino asidi kodlayan farklı bir kodonla değiştirilmesi, bu sayede bir ksilanazı kodlayan bir nükleik asitteki kodonların modifiye edilmesi.

Bir konak hücrede ekspresyonunu arttırmak için bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asitteki kodonları modifiye etmeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz polipeptiti kodlayan buluşun bir nükleik asidinin sağlanması ve (b) (a) adımıdaki nükleik asitteki tercih edilmeyen ve az tercih edilen bir kodonun tanımlanması ve bunun değiştirilmiş kodon olarak aynı amino asidi kodlayan tercih edilen veya nötr olarak kullanılan bir kodonla değiştirilmesi, burada tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında fazla sunulan bir kodondur ve tercih edilmeyen veya az tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında az sunulan bir kodondur, bu sayede bir konak hücredeki ekspresyonunu arttırmak üzere nükleik asit modifiye edilir.

Bir konak hücrede ekspresyonunu azaltmak için bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asitteki kodonları modifiye etmeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) buluşun bir nükleik asidinin sağlanması ve (b) (a) adımıdaki nükleik asitteki tercih edilen bir kodonun tanımlanması ve bunun değiştirilmiş kodon olarak aynı amino asidi kodlayan tercih edilmeyen veya az tercih edilen kodonla değiştirilmesi, burada tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında fazla sunulan bir kodondur ve tercih edilmeyen veya az tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında az sunulan bir kodondur, bu sayede bir konak hücredeki ekspresyonunu azaltmak üzere nükleik asit modifiye edilir.

Konak hücre bir bakteriyel hücre, bir memeli hücresi, bir mantar hücresi, bir maya hücresi, bir böcek hücresi veya bir bitki hücresi olabilir.

Birden çok modifiye edilmiş ksilanaz aktivite alanları veya substrat bağama alanları kodlayan nükleik asitlerin bir kütüphanesi, burada modifiye edilmiş aktif alanlar veya substrat bağlama alanları bir birinci aktif alanı veya bir substrat bağlama alanını kodlayan bir sekans içeren bir birinci nükleik asitten türetilir, aşağıdaki adımlar vasıtasıyla üretilebilir: (a) bir birinci aktif alanı veya birinci substrat bağlama alanını kodlayan bir birinci nükleik asidin sağlanması, burada birinci nükleik asit sekansı buluşun bir sekansı veya bunun bir alt sekansı için katı koşullar altında hibritlenen bir

sekans içerir ve nükleik asit bir ksilanaz aktivite alanı veya bir ksilanaz substrat bağlama alanını kodlar; (b) birinci nükleik asitteki birden çok hedeflenmiş kodonda doğal olarak meydana gelen amino asit varyantlarını kodlayan bir dizi mutagenik oligonükleotit sağlanması ve (c) mutagenize olmuş her bir amino asit kodonunda bir amino asit varyantı aralığını kodlayan bir dizi aktif alan kodlayan veya substrat bağlama alanı kodlayan varyant nükleik asitler üretmek için mutagenik oligonükleotit dizisinin kullanılması, bu sayede birden çok modifiye edilmiş ksilanaz aktif alanı veya substrat bağlama alanını kodlayan bir nükleik asit kütüphanesi üretilmesi. Yöntem bir optimize yönlendirilmiş evrim sistemi, Gen Alan Doygunluk Mutagenesi (GSSM) veya bir sentetik ligasyon yeniden düzenlemesi (SLR) içeren bir T yöntem vasıtasıyla (a) adımının birinci nükleik asidinin mutageneze tabi tutulmasını içerebilir. Yöntem (a) adımının birinci nükleik asidinin veya varyantlarının hata eğilimli PCR, karıştırma, oligonükleotide yönelik mutagenez, düzenek PCR, cinsel PCR mutagenez, in vivo mutagenez, kaset mutagenez, tekrarlanan topluluk mutagenesi, üssel topluluk mutagenesi, alana özgü mutagenez, yeniden gen düzenlenmesini (örn, GeneReassembly, bkz, örn, U.S. 6,537,776), Gen Alan Doygunluk Mutagenesi (GSSM), sentetik ligasyon yeniden düzenlenmesi (SLR) veya bunların bir kombinasyonunu içeren bir yöntem vasıtasıyla mutageneze tabi tutulmasını içerebilir. Yöntem (a) adımının birinci nükleik asidinin veya varyantlarının rekombinasyon, tekrarlamalı sekans rekombinasyonu, fosfotiyolat modifiye edilmiş DNA mutagenesi, urasil içeren şablon mutagenez, aralıklı çift mutagenez, nokta eşleşme onarım mutagenesi, onarımı eksik konak tür mutagenesi, kimyasal mutagenez, radyojenik mutagenez, silme mutagenesi, kısıtlama seçim mutagenesi, kısıtlama saflaştırma mutagenesi, yapay gen sentezi, topluluk mutagenesi, kimerik nükleik asit multimer oluşumu ve bunların bir kombinasyonunu içeren bir yöntem vasıtasıyla mutageneze tabi tutulmasını içerir.

Bir küçük molekül yapmaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir küçük molekülü sentezleyebilen veya modifiye edebilen birden çok biyosentetik enzim sağlanması, burada enzimlerin biri buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanaz enzimi içerir; (b) (a) adımındaki enzimlerin en az biri için bir substrat sağlanması ve (c) (b) adımındaki substratın bir dizi biyokatalitik reaksiyon vasıtasıyla bir küçük molekül üretmek için birden çok biyokatalitik reaksiyonu kolaylaştıran koşullar altında enzimlerle reaksiyona sokulması. Bir küçük molekülü modifiye etmeye yönelik

yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz enzimi sağlanması, burada enzim buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti veya bunun bir alt sekansını içerir; (b) bir küçük molekül sağlanması ve (c) (a) adımıdaki enzimin ksilanaz enzim tarafından katalize edilen bir enzimatik reaksiyonu kolaylaştıran koşullar altında (b) adımıdaki küçük molekül ile reaksiyona sokulması, bu sayede bir küçük molekülün bir ksilanaz enzimatik reaksiyon vasıtasıyla modifiye edilmesi. Yöntem (b) adımıdaki birden çok enzim için küçük moleküllü substratı içerebilir, bu sayede ksilanaz enzimi tarafından katalize edilen en az bir enzimatik reaksiyon vasıtasıyla üretilen bir modifiye edilmiş küçük molekül oluşturulur. Yöntem birden çok enzimatik reaksiyon vasıtasıyla üretilen bir modifiye edilmiş küçük molekül kütüphanesi oluşturmak için enzimler tarafından birden çok biyokatalitik reaksiyonu kolaylaştıran koşullar altında birden çok ilave enzim içerebilir. Yöntem ayrıca istenen bir aktiviteyi sergileyen belirli bir modifiye edilmiş küçük molekülün kütüphane içinde bulunup bulunmadığını test etmeye ilişkin adım içerebilir. Kütüphaneyi test etme adımı ayrıca modifiye edilmiş küçük molekülün bir kısmının istenen bir aktiviteye sahip modifiye edilmiş belirli küçük molekülün mevcudiyeti veya yokluğuna yönelik olarak test edilmesi vasıtasıyla kütüphane içindeki birden çok modifiye edilmiş küçük molekülün bir kısmını üretmek için kullanılan biyokatalitik reaksiyonların biri hariç hepsinin sistematik olarak elimine edilmesi ve istenen aktiviteli belirli modifiye edilmiş küçük molekülü üreten en az bir spesifik biyokatalitik reaksiyonun tanımlanması adımlarını içerebilir.

Bir ksilanaz enziminin fonksiyonel bir fragmanını belirlemeye yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz enziminin sağlanması, burada enzim buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptitini veya bunların bir alt sekansını içerir ve (b) (a) adımının sekansından birden çok amino asit kalıntısının silinmesi ve geriye kalan alt sekansın bir ksilanaz aktivitesi için test edilmesi, bu sayede bir ksilanaz enziminin fonksiyonel bir fragmanının belirlenmesi. Bir yönde silanaz aktivitesi bir ksilanaz substratın sağlanması ve substratın miktarında bir azalma veya bir reaksiyon ürününün miktarında bir artış tespit edilmesi vasıtasıyla ölçülebilir.

Gerçek zamanlı metabolik akış analizi kullanılarak yeni veya modifiye edilmiş fenotiplerin tam hücre üretimine yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir hücrenin genetik bileşiminin modifiye edilmesi vasıtasıyla modifiye edilmiş bir hücrenin

yapılması, burada genetik bileşim buluşun bir nükleik asidinin hücrelerine ekleme vasıtasıyla modifiye edilir; (b) birden çok modifiye edilmiş hücre oluşturmak için modifiye edilmiş hücrenin kültürlenmesi; (c) (b) adımındaki hücre kültürünün gerçek zamanda gözlemlenmesi vasıtasıyla hücrenin en az bir metabolik parametresinin ölçülmesi ve (d) ölçülen parametrenin benzer koşullar altında modifiye edilmiş hücredeki karşılaştırılabilir bir ölçümden farklılık gösterip göstermediğinin analiz edilmesi, bu sayede gerçek zamanlı metabolik akış analizi kullanarak hücredeki üretilmiş bir fenotipin tanımlanması. Hücrenin genetik bileşimi hücredeki bir sekansın modifikasyonunu veya bir sekansın silinmesini içeren bir yöntem veya bir genin ekspresyonunun bitirilmesi vasıtasıyla modifiye edilebilir. Yöntem ayrıca yeni üretilmiş bir fenotipi içeren bir hücrenin seçilmesini içerebilir. Yöntem seçilen hücrenin kültürlenmesini, bu sayede yeni üretilmiş bir fenotipi içeren yeni bir hücre suşu oluşturulmasını içerebilir.

İzole edilmiş, sentetik veya rekombinant sinyal sekansları buluşun örnek polipeptit sekansları dahil olmak üzere buluşun bir polipeptidinin 1 ila 12, 1 ila 13, 1 ila 14, 1 ila 15, 1 ila 16, 1 ila 17, 1 ila 18, 1 ila 19, 1 ila 20, 1 ila 21, 1 ila 22, 1 ila 23, 1 ila 24, 1 ila 25, 1 ila 26, 1 ila 27, 1 ila 28, 1 ila 28, 1 ila 30, 1 ila 31, 1 ila 32, 1 ila 33, 1 ila 34, 1 ila 35, 1 ila 36, 1 ila 37, 1 ila 38, 1 ila 40, 1 ila 41, 1 ila 42, 1 ila 43 veya 1 ila 44 kalıntılarında belirtilen bir sekansını içerebilir veya bunlardan oluşabilir. İzole edilmiş, sentetik veya rekombinant sinyal sekansları aşağıda Tablo 4'te belirtilen sekansları içerebilir veya bunlardan oluşabilir.

Kimerik polipeptitler bir sinyal peptidi (SP) içeren en az bir birinci alan ve bir heterolog peptit veya buluşun bir sekansını veya bunun bir alt sekansını içeren peptidi içeren en az bir ikinci alan içerebilmekte olup, burada heterolog polipeptit veya peptit sinyal peptidiyle (SP) doğal olarak ilişkili değildir. Sinyal peptidi (SP) bir ksilanazdan türetilmeyebilir. Heterolog polipeptit veya peptit sinyal peptidin (SP) veya bir ksilanaz katalitik alanının (CD) her iki ucuna amino terminal, karboksi terminal olabilir veya bunların üzerinde olabilir. İzole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler bir kimerik polipeptiti kodlamakta olup, burada kimerik polipeptit bir sinyal peptidi (SP) içeren en az bir birinci alan ve bir heterolog peptit veya buluşun bir sekansını veya bunun bir alt sekansını içeren peptidi içeren en az bir ikinci alan içerir, burada heterolog polipeptit veya peptit sinyal peptidiyle (SP) doğal olarak ilişkili değildir.

Bir ksilanaz polipeptitin ısı toleransını veya sıcaklığa dayanıklılığını arttırmaya ilişkin yöntemler bir ksilanaz polipeptitinin glikosilatlanmasını içermekte olup, burada polipeptit buluşun bir polipeptitinin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptitin en az otuz ardışık amino asidini içerir, bu sayede ksilanaz polipeptitin ısıya toleransı ve ısı dayanıklılığı artırılır. Ksilanaz spesifik aktivitesi yaklaşık 37 °C'den fazlası ile yaklaşık 85 °C, 90 °C, 95 °C, 97 °C aralığında veya daha fazla bir sıcaklıkta ısı toleranslı veya sıcaklığa dayanıklı olabilir.

Bir hücrede bir rekombinant ksilanaz polipeptitini fazla eksprese etmeye yönelik yöntemler buluşun bir nükleik asidini veya buluşun bir nükleik asit sekansını içeren bir vektörün eksprese edilmesini içermekte olup, burada sekans özdeşlikleri bir sekans karşılaştırma algoritması ile analiz vasıtasıyla veya görsel inceleme aracılığıyla belirlenir, burada fazla ekspresyon bir yüksek aktiviteli promotörün, bir disistronik vektörün kullanılması veya vektörün gen amplifikasyonu vasıtasıyla gerçekleşir.

Bir transjenik bitki veya tohum yapmaya ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) bir heterolog nükleik asit sekansının hücre içine dahil edilmesi, burada heterolog nükleik asit sekansı buluşun bir nükleik asit sekansını içerir, bu sayede transforme edilmiş bir bitki veya tohum hücresi üretilir ve (b) transforme edilmiş hücre veya tohumdan bir transjenik bitki üretilmesi. (a) adımı ayrıca bitki hücresi protoplastlarının mikro enjeksiyonu veya elektroporasyon vasıtasıyla heterolog nükleik asit sekansı eklenmesini içerebilir. (a) adımı ayrıca DNA parçacık bombardımanı vasıtasıyla heterolog nükleik asit sekansının doğrudan bitki dokusuna dahil edilmesini içerebilir. Alternatif olarak (a) adımı ayrıca bir *Agrobacterium tumefaciens* konak kullanılarak heterolog nükleik asit sekansının bitki hücresi DNA'sına dahil edilmesini içerebilir. Bitki hücresi bir patates, mısır, pirinç, buğday, tütün veya arpa hücresi olabilir.

Bir bitki hücresinde bir heterolog nükleik asit sekansını eksprese etmeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) bitki hücresinin bir promotöre faal olarak bağlı bir heterolog nükleik asit sekansı ile transforme edilmesi, burada heterolog nükleik asit sekansı buluşun bir nükleik asidini içerir; (b) bitkinin heterolog nükleik asit sekansının bitki hücresinde eksprese edildiği koşullar altında büyütülmesi. Bir bitki hücresinde bir heterolog nükleik asit sekansını eksprese etmeye ilişkin yöntemler şu adımları içerir: (a) bitki hücresinin bir promotöre faal olarak bağlı bir heterolog nükleik asit sekansı ile transforme edilmesi, burada heterolog nükleik asit sekansı buluşun bir sekansını içerir;

(b) bitkinin heterolog nükleik asit sekansının bitki hücresinde eksprese edildiği koşullar altında büyütülmesi.

Ksilan içeren bir bileşimi hidrolize etmeye, parçalamaya veya bozmaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitinin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptitin sağlanması; (b) bir ksilan içeren bir bileşimin sağlanması ve (c) (a) adımıdaki polipeptitin ksilanazın ksilan içeren bileşimi hidrolize ettiği, parçaladığı veya bozduğu koşullar altında (b) adımıdaki bileşimle temas ettirilmesi. Bileşim bir bitki hücresini, bir bakteriyel hücreyi, bir maya hücresini, bir böcek hücresini veya bir hayvan hücresini içerebilir. Dolayısıyla bileşim herhangi bir bitki veya bitki parçası ve ksilan içeren gıda veya yem, bir atık ürünü ve benzerlerini içerebilir.

Ksilan içeren bir bileşimi sıvılaştırmaya veya uzaklaştırmaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitinin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptitin sağlanması; (b) bir ksilan içeren bir bileşimin sağlanması ve (c) (a) adımıdaki polipeptitin ksilanazın ksilan içeren bileşimi sıvılaştırdığı veya uzaklaştırıldığı koşullar altında (b) adımıdaki bileşimle temas ettirilmesi.

Deterjan bileşimleri buluşun bir polipeptitini, buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içermekte olup, burada polipeptit bir ksilan aktivitesine sahiptir. Ksilanaz yüzey aktif olmayan bir ksilanaz veya yüzey aktif bir ksilanaz olabilir. Ksilanaz sulu olmayan bir sıvı bileşim, bir döküm katı, bir granüler form, bir partikül form, bir sıkıştırılmış tablet, bir jel form, bir macun veya bir bulamaç formunda formüle edilebilir. Ksilan içeren bir bileşimi yıkamaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içeren bir bileşim sağlanması; (b) bir nesne sağlanması ve (c) (a) adımıdaki polipeptitin ksilanazın ksilan içeren bileşimi yıkadığı koşullar altında (b) adımıdaki nesneyle temas ettirilmesi.

Orn, iplikler dahil olmak üzere kumaşlar veya tekstiller buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içerir. Tekstiller veya kumaşlar ksilan içeren fiberler içerir. Bir tekstil veya kumaşı işlemeye (örn, bir bileşimden bir lekenin çıkartılmasına) yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi

tarafından kodlanan bir polipeptiti içeren bir bileşim sağlanması; (b) bir ksilan içeren bir tekstil veya kumaş sağlanması ve (c) (a) adımıdaki polipeptitin ksilanazın tekstilin veya kumaşın işlenebildiği (örn, lekenin çıkartılabildiği) koşullar altında (b) adımıdaki bileşimle temas ettirilmesi. Bir kumaşın bitirişini geliştirmeye yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içeren bir bileşim sağlanması; (b) bir kumaş sağlanması ve (c) (a) adımıdaki polipeptit ve polipeptitin kumaşı işleyebildiği, bu sayede kumaşın bitirişini geliştirebildiği koşullar altında (b) adımıdaki kumaşın temas ettirilmesi. Kumaş bir yün veya bir ipek olabilir. Kumaş bir selülozik fiber veya bir doğal fiber ve bir sentetik fiberin bir karışımı olabilir.

Yemler veya gıdalar buluşun bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içerir. Bir yemdeki veya bir gıdadaki ksilanların bir hayvan tarafından tüketimden önce hidrolize edilmesine yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) buluşun bir ksilanazını veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazı içeren bir besin malzemesi elde edilmesi ve (b) (a) adımıdaki polipeptitin yeme veya gıdaya ksilanın hidrolizine ve işlenmiş bir gıda veya yem oluşumuna neden olmaya, bu sayede gıda veya yemdeki ksilanların hayvan tarafından tüketimden önce hidrolize edilmesine yeterli bir zaman periyodu boyunca yeterli bir miktarda eklenmesi. Bir yemdeki veya bir gıdadaki ksilanların bir hayvan tarafından tüketimden sonra hidrolize edilmesine yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) buluşun bir ksilanazını veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazı içeren bir besin malzemesi elde edilmesi ve (b) (a) adımıdaki polipeptitin yem veya gıda malzemesine eklenmesi ve (c) yem veya besin malzemesinin hayvana uygulanması, burada tüketimden sonra ksilanaz hayvanın sindirim yolundaki yemdeki veya gıdadaki ksilanların hidrolizine neden olur. Gıda veya yem, örn, bir tahıl, bir hububat, bir mısır ve benzerleri olabilir.

Hamur veya ekmek ürünleri bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti içerebilmekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır. Hamur koşullandırma yöntemleri polipeptit hamurun koşullandırılması için yeterli koşullar altında bir hamur veya bir ekmek ürününün bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit ile temas ettirilmesini içermekte

olup, burada buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır.

İçecekler bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti içerebilmekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır. İçecek 5 üretimine ilişkin yöntemler bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptitin içeceğin viskozitesini azaltmak için yeterli koşullar altında bir içeceğe veya bir içecek öncülüne uygulanmasını içermekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik 10 olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır, burada bir yönde (isteğe bağlı olarak) içecek veya içecek öncülü bir malt veya bir biradır.

Bir hayvan için gıda veya besin destekleri buluşun bir polipeptitini, örn, buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içerir. Gıda veya besin takviyesindeki polipeptit glikosilatlanabilir. Yenilebilir enzim iletim matrisleri buluşun bir polipeptitini 15 veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içerebilir. İletim matrisi bir pelet içerebilir. Polipeptit glikosilatlanabilir.

Ksilan aktivitesi ısı toleranslı veya ısıya dayanıklı olabilir.

Bir gıda, bir yem veya bir besin takviyesi buluşun bir polipeptitini içerir. Bir hayvan diyetinde bir besin takviyesi olarak bir ksilanaz kullanmaya yönelik yöntemler: buluşun 20 bir polipeptitinin en az otuz ardışık amino asidini içeren bir ksilanaz enzimi ihtiva eden bir besin takviyesi hazırlanmasını ve hayvan tarafından sindirilen bir yemde veya bir gıdada bulunan bir ksilanın kullanımını arttırmak için besin takviyesinin bir hayvana uygulanmasını içerir. Hayvan bir insan, bir geviş getiren veya bir monogastrik hayvan olabilir. Ksilanaz enzimi ksilanazı kodlayan bir polinükleotitin bir bakterisi, bir maya, bir 25 bitki, bir böcek, bir mantar ve bir hayvandan oluşan gruptan seçilen bir organizmada ekspresyonu vasıtasıyla hazırlanabilir. Organizma bir *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus sp.* ve *Lactobacillus sp.*'den oluşan gruptan seçilebilir.

Yenilebilir enzim iletim matrisi ısı toleranslı bir rekombinant enzim, örn, buluşun bir polipeptitini içerir. Bir ksilanaz takviyesini bir hayvana iletmeye yönelik yöntemler: bir 30 granül yenilebilir taşıyıcı ve ısı toleranslı bir rekombinant ksilanaz enzim içeren peletler formunda yenilebilir bir enzim iletim matrisi hazırlanması, burada peletler içinde

bulunan ksilanaz enzimini sulu ortam içinde kolaylıkla dağıtır ve yenilebilir enzim iletim matrisinin hayvana uygulanmasını içerir. Rekombinant ksilanaz enzimi buluşun bir polipeptitini içerebilir. Granül şeklinde yenilebilir taşıyıcı bir hububat çekirdeğinden, bir samanın, bir kaba yoncanın, bir çayır otunun, bir soya kabuğunun, bir ayçiçeği tohumu yemeğinin ve bir buğdayın harcandığı hububat çekirdeğinden oluşan gruptan seçilir. Yenilebilir taşıyıcı yağ harcayan hububat çekirdeği içerebilir. Ksilan enzimi peletleme koşullarında ısı stabilitesini sağlamak için glikosilatlanabilir. İletim matrisi bir hububat çekirdeği ve bir ksilanaz içeren bir karışımın peletlenmesi vasıtasıyla oluşturulabilir. Peletleme koşulları buhar uygulaması içerebilir. Peletleme koşulları en fazla yaklaşık 80 °C'lik bir sıcaklık için 5 dakika boyunca uygulanmasını içerebilir ve enzim bir miligram enzim başına en az yaklaşık 350 ila yaklaşık 900 birimlik spesifik bir aktiviteyi korur.

Bir süt ürününün dokusunu ve aromasını geliştirmeye yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptitin veya buluşun bir nükleik asidi vasıtasıyla kodlanan bir ksilanaz sağlanması; (b) bir süt ürünü sağlanması ve (c) (a) adımındaki polipeptit ve (b) adımındaki süt ürününün ksilanazın süt ürününün dokusunu veya aromasını geliştirebildiği koşullar altında temas ettirilmesi. Süt ürünleri bir peynir veya bir yoğurt içerebilir. Süt ürünleri buluşun ksilanazını içerebilir veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanır.

Yağ açısından zengin bir bitki malzemesinden yağın ekstraksiyonunu arttırmaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitinin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazın sağlanması; (b) yağ açısından zengin bir bitki malzemesinin sağlanması ve (c) (a) adımındaki polipeptit ve yağ açısından zengin bitki malzemesinin temas ettirilmesi. Yağ açısından zengin bitki malzemesi yağ açısından zengin bir tohum içerebilir. Yağ bir soya fasulyesi yağı, bir zeytinyağı, bir kolza tohumu (kanola) yağı veya bir Ayçiçek yağı olabilir.

Bir meyve veya sebze suyu, şurubu, püresi veya ekstraktı hazırlamaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitinin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazın sağlanması; (b) bir meyve veya sebze malzemesi içeren bir bileşim veya bir sıvı sağlanması ve (c) (a) adımındaki polipeptit ve bileşimin temas ettirilmesi, bu sayede meyve veya sebze suyunun, şurubunun, püresinin veya ekstraktının hazırlanması.

Buluş buluşun bir ksilanazını veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti içeren kağıtlar veya kağıt ürünleri veya kağıt hamuru sağlar. Buluş bir kağıdı veya bir kağıdı veya ağaç hamurunu işlemek için yöntemler sağlamakta olup, şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan buluşun bir polipeptitinin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazın sağlanması; (b) bir kağıt veya bir kağıt veya ağaç hamuru içeren bir bileşim sağlanması ve (c) (a) adımının polipeptitinin ve (b) adımının bileşiminin ksilanazın kağıt veya kağıt veya ağaç hamurunu işleyebildiği koşullar altında temas ettirilmesi.

10 Bir kağıt veya kağıt ürününde, bir kağıt atığında, bir ahşapta, ağaç hamurunda veya ağaç ürününde veya bir ağaç veya kağıt geri dönüşüm bileşiminde ligninin miktarını azaltmaya (delignifikasyon) veya bir lignini çözmeye yönelik yöntemler kağıt veya kağıt ürününün, ağacın, ağaç ürününün veya ağaç veya kağıt geri dönüşüm bileşiminin buluşun bir polipeptiti veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı ile temas ettirilmesini içerir.

15 Bir ağaç, ağaç ürünü, kağıt hamuru, kağıt ürünü veya kağıt atığındaki hemiselülozları hidrolize etmeye ilişkin yöntem ağacın, ağaç ürününün, kağıt hamurunun, kağıt ürününün veya kağıt atığının buluşun bir polipeptiti veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı ile temas ettirilmesini içerir.

20 Kağıt, kenevir veya keten hamurunun enzimatik ağartılmasına yönelik yöntemler kağıt, kenevir veya keten hamurunun bir ksilanaz ve bir ağartma ajanı ile temas ettirilmesini içermekte olup, burada ksilanaz buluşun bir polipeptitini veya enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerir. Ağartma ajanı oksijen veya hidrojen peroksit içerebilir.

Bir lignoselüloz hamurunu ağartmaya ilişkin yöntemler lignoselüloz hamuru ile bir ksilanaz temas ettirmeyi içermekte olup, burada ksilanaz buluşun bir polipeptitini veya 25 bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerir.

Kağıt, kağıt atığı, kağıdı geri dönüştürülmüş ürünün enzimatik mürekkep gidermesine, temassız basılı atık kağıttan veya temassız ve temaslı basılı atık kağıttan tonerin giderilmesine yönelik yöntemler kağıdın, kağıt atığının, kağıdı geri dönüştürülmüş ürünün, temassız basılı atık kağıdın veya temaslı basılı atık kağıdının bir ksilanaz ile 30 temas ettirilmesini içermekte olup, burada ksilanaz buluşun bir polipeptitini veya bunun aktif olarak enzimatik bir fragmanını içerir.

Bir ipliği, kumaşı, dikiş ipini, kıyafeti veya tekstili ağartmaya yönelik yöntemler kumaşın, ipin, kıyafetin veya tekstilin tekstili beyazlatmak için uygun koşullar altında bir ksilanaz ile temas ettirilmesini içermekte olup, burada ksilanaz buluşun bir polipeptitini veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerir. İplik, kumaş, dikiş ipini, kıyafet veya tekstil pamuk olmayan bir selülozik iplik, kumaş, ip, kıyafet veya tekstil içerebilir. Kumaşlar, iplikler, kumaşlar veya tekstiller buluşun bir sekansına sahip olan bir polipeptiti veya buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptiti veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içermekte olup, burada bir yönde (isteğe bağlı olarak) kumaş, iplik, kumaş veya tekstil pamuk olmayan selülozik bir kumaş, iplik, kıyafet veya tekstil içerir.

Gazeteyi ağartmaya veya mürekkebi gidermeye yönelik yöntemler gazetenin temas ettirilmesini içermekte olup, burada ksilanaz buluşun bir polipeptitini veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerir.

Ağaç, ağaç kabuğu parçaları, ağaç hamuru, ağaç ürünleri, kağıt hamurları, kağıt ürünleri, gazeteler veya kağıt atığı buluşun bir polipeptitini veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerir. İplik, kumaş, dikiş ipi veya tekstil buluşun bir polipeptitini veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerir.

Bir ağaç veya ağaç ürünündeki lignini azaltmaya ilişkin yöntemler ağaç veya ağaç ürününün bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptitle temas ettirilmesini içermekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır.

Bir ağaçta, bir ağaç hamurunda, bir Kraft hamurunda, bir kağıtta, bir kağıt ürününde veya bir kağıt hamurunda yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları altında bir lignini azaltmaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 90 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır; (b) lignin içeren bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) ağacın, ağaç

hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun (a) adımının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir, burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki, kağıt ürünündeki veya kağıt hamurundaki lignini azaltır.

Bir ağacı bir ağaç hamurunu, bir Kraft hamurunu, bir kağıdı, bir kağıt ürününü veya bir kağıt hamurunu yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları altında işlemeye yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 90 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır; (b) bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun (a) adımının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir, burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki, kağıt ürünündeki veya kağıt hamurundaki bileşiklerin hidrolizini katalize eder ve burada bir yönde (isteğe bağlı olarak) ağaç, ağaç hamuru, Kraft hamuru, kağıt, kağıt ürünü veya kağıt hamuru bir yumuşak ağaç ve sert ağaç içerir veya ağaç, ağaç hamuru, Kraft hamuru, kağıt veya kağıt hamuru yumuşak ağaçtan ve sert ağaçtan türetilir ve burada bir yönde (isteğe bağlı olarak) hamurun işlenmesinden sonra en az yaklaşık % 10 veya en az yaklaşık % 32'lik tutarlılığa sahiptir.

Bir ağacın, bir ağaç hamurunun, bir Kraft hamurunun, bir kağıdın, bir kağıt ürününün veya bir kağıt hamurunun yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları altında rengini açmaya yönelik yöntemler olup, yöntem şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 90 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı

tarafından kodlanır; (b) bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun (a) adımının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir, burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki, kağıt ürünündeki veya kağıt hamurundaki bileşikleri katalize eder, bu sayede ağacı, ağaç hamurunu, Kraft hamurunu, kağıdı, kağıt ürününü veya kağıt hamurunu ağartır.

Bir ağaç, bir ağaç hamuru, bir Kraft hamuru, bir kağıt, bir kağıt ürünü veya bir kağıt hamuru ağartma işleminde ağartma kimyasallarının kullanımını yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları altında azaltmaya yönelik yöntemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır; (b) bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun (a) adımının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir, burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki, kağıt ürünündeki veya kağıt hamurundaki bileşikleri katalize eder ve ağartma işlemindeki ağartma kimyasallarının kullanımını azaltır, burada isteğe bağlı olarak ağartma kimyasalı bir klorin, bir klorin dioksit, bir kostik, bir peroksit veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir.

Bir kağıdın veya hamurun yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları altında mürekkebini gidermeye yönelik yöntemler olup, şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 90 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır; (b) mürekkep içeren bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun (a) adınının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C, 91 °C , 92 °C , 93 °C , 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C , 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 10.5, pH 11, pH 12, pH 12.5 veya daha fazla (bazik) bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir, burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki, kağıt ürünündeki veya kağıt hamurundaki bileşikleri katalize eder, bu sayede ağacı, ağaç hamurunu, Kraft hamurunu, kağıdı, kağıt ürününü veya kağıt hamurunu ağartır.

Bir ağaç, bir ağaç hamuru, bir Kraft hamuru, bir kağıt, bir kağıt ürünü veya bir kağıt hamuru ağartma işleminde ağartma kimyasallarının kullanımını yüksek sıcaklık ve bazik pH koşulları altında azaltmaya yönelik işlemler şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C , 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 11'lik bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır; (b) bir lignin içeren bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun (b) adınının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C, 91 °C , 92 °C , 93 °C , 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108

5 109 °C veya 110 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 11'lik bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir, burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki, kağıt ürünündeki veya kağıt hamurundaki bileşikler katalize eder; burada isteğe bağlı olarak hamurun işlenmesinden sonra yaklaşık % 10'luk bir tutarlılığa sahiptir.

10 Bileşimler bir ağaç, bir ağaç hamuru, bir Kraft hamuru, bir kağıt, bir kağıt ürünü veya bir kağıt hamuru ve buluşun bir ksilanaz aktivitesine sahip olan veya buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptiti veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanını içerebilir. İsteğe bağlı olarak ağaç, ağaç hamuru, Kraft hamuru, kağıt ürün veya kağıt ürünü bir sert ağaç ve yumuşak ağaç veya bir sert ağaçtan ve yumuşak ağaçtan türetilen ağaç, ağaç hamuru, Kraft hamuru, kağıt, kağıt ürünü veya kağıt hamuru içerir.

15 Etanol yapmaya ilişkin yöntemler nişasta içeren bir bileşimin bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptitle temas ettirilmesini içermekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır. Bileşimler bir etanol ve bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti içerebilmekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır. Yüksek sıcaklık ve 20 bazik pH koşulları altında etanol yapmaya yönelik yöntemler olup, yöntem şu adımları içerir: (a) bir ksilanaz aktivitesine sahip olan en az bir polipeptit sağlanması, burada polipeptit en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C veya daha fazla bir sıcaklık 25 ve en az yaklaşık pH 11'lik bir bazik pH içeren koşullar altında ksilanaz aktivitesini korur, burada polipeptit buluşun bir sekansına sahip olan bir ksilanaz içerir veya ksilanaz buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır; (b) bir nişasta içeren bir ağacın, ağaç hamurunun, Kraft hamurunun, kağıdın, kağıt ürününün veya kağıt hamurunun sağlanması ve (c) 30 (b) adımının bileşiminin (a) adımının polipeptiti ile 80 °C, 85 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C ve daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 11'lik bir bazik pH içeren koşullar altında temas ettirilmesini içerir,

burada polipeptit ağaçtaki, ağaç hamurundaki, Kraft hamurundaki, kağıttaki veya kağıt hamurundaki bileşikleri katalize eder, bu sayede ağaçtan, ağaç hamurundan, Kraft hamurundan, kağıttan, kağıt ürününden veya kağıt hamurundan etanol üretilir.

5 Farmasötik bileşimler bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti içerebilmekte olup, burada polipeptit buluşun bir sekansını içerir veya polipeptit buluşun bir sekansını içeren bir nükleik asit veya bunun enzimatik olarak aktif bir fragmanı tarafından kodlanır. Bir ksilan içeren bir mikroorganizmayı elimine etmeye veya hayvanları bundan korumaya yönelik yöntemler buluşun bir polipeptitinin uygulanmasını içerir. Mikroorganizma bir ksilan içeren bir bakteri, örn, Salmonella olabilir.

10 Farmasötik bileşim bir sindirim yardımcısı veya bir anti-mikrobiyal (örn, Salmonella karşı) olarak hareket edebilir. Tedavi profilaktik olabilir. Ağız bakım ürünleri buluşun bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazı içerebilir. Ağız bakım ürünü bir diş macunu, bir diş kremi, bir jel veya bir diş tozu, bir odontik, bir gargara, bir fırçalama öncesi veya sonrası durulama
15 formülasyonu, bir sakız, bir pastil veya bir şeker içerebilir. Kontak lens temizleme bileşimleri buluşun bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptitini veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir ksilanazı içerebilir.

Kimerik ksilanazlar buluşun bir polipeptit sekansını ve en az bir heterolog karbonhidrat bağlayan modülü (CBM) içermekte olup, burada isteğe bağlı olarak CBM bir CBM3a,
20 CBM3b, CBM4, CBM6, CBM22 veya X14 veya aşağıda listelendiği ve tartışıldığı şekilde bir CBM içerir. Kimerik ksilanazlar en az bir heterolog karbonhidratı bağlama modülünü (CBM) içermekte olup, burada CBM buluşun bir ksilanaz sekansının karbonhidrat bağlayan bir alt sekansını veya Tablo 9'da belirtildiği gibi bir X14 içeren karbonhidrat bağlayan bir alt sekansı içerir. Yeni bir karbonhidrat bağlayan
25 spesifisiteye veya gelişmiş bir karbonhidrat bağlayan spesifisiteye sahip olan bir kimerik ksilanaz bir heterolog veya ilave bir endojen karbonhidrat bağlayan modülün (CBM) bir ksilanaz içine yerleştirilmesini içermekte olup, burada CBM buluşun bir ksilanazının karbonhidrat bağlayan bir alt sekansını veya Tablo 9'da belirtildiği gibi bir X14 içeren karbonhidrat bağlayan bir alt sekansı içerir veya alternatif olarak bir
30 heterolog CBM veya bir ilave CBM buluşun bir ksilanazı içine yerleştirilir.

Buluş buluşun en az bir enzimini ve başka bir ksilanaz veya herhangi başka bir enzim olabilen bir veya daha fazla enzimi içeren karışımlar veya "kokteyller" sağlar; örneğin

buluşun “kokteylleri”, bu buluşun en az bir enzimine ek olarak birkaç örnek vermek istersek ksilanaz (bu buluşun olmayan), selülaz, lipaz, esteraz, proteaz veya endoglikosidaz, endo-beta.-1,4-glukanaz, beta glukanaz, endo-beta-1,3(4)-glukanaz, kütinaz, peroksidaz, katalaz, lakkaz, amilaz, glukoamilaz, pektinaz, redüktaz, oksidaz, fenoloksidaz, ligninaz, pullulanaz, arabinanaz, hemiselülaz, mannaz, ksiloglukanaz, ksilanaz, pektin asetil esteraz, ramnogalakturonan asetil esteraz, poligalakturonaz, ramnogalakturonaz, galaktanaz, pektin lizaz, pektin metilesteraz, selobiyohidrolaz ve/veya transglutaminaz gibi herhangi başka bir enzim içerebilir. Alternatif uygulamalarda buluşun en az bir enzimini içeren bu enzim karışımları veya “kokteylleri” burada açıklanan herhangi bir işlemde veya yöntemde veya patent hakkı bildiriminin bileşimi, örn, gıda veya besinlerde, gıda ve besin takviyelerinde, tekstillerde, kağıtlarda, işlenmiş ağaçta, vs. ve bunları yapmaya yönelik yöntemlerde ve kağıdı, hamuru, ağacı, kağıt hamurunu veya ağaç atığını veya yan ürünler ve bunların nihai ürünlerini işlemek için bileşimlerde ve yöntemlerde kullanılabilir.

15 Buluşun diğer yönleri ekli istemlerde belirtilmektedir.

Buluşun bir veya daha fazla uygulamasına ilişkin detaylar ekli çizimlerde ve aşağıdaki açıklamada belirtilmektedir. Buluşun diğer özellikleri, amaçları ve avantajları açıklamadan ve çizimlerden ve istemlerden açık hale gelecektir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

20 Aşağıdaki çizimler buluşun yönlerini açıklayıcıdır ve istemler tarafından kapsanan buluşun kapsamını kısıtlamayı amaçlamamaktadır.

Şekil 1, bir bilgisayar sisteminin bir blok diyagramıdır.

Şekil 2, yeni sekans ve veri tabanındaki sekanslar arasındaki homoloji seviyelerini belirlemek üzere yeni bir nükleotiti veya protein sekansını bir sekans veri tabanı ile karşılaştırmak için bir işleme ilişkin bir yönü gösteren bir akış diyagramıdır.

Şekil 3, iki sekansın homolog olup olmadığını belirlemek için bir bilgisayardaki bir işleme ilişkin bir yönü gösteren bir akış diyagramıdır.

Şekil 4, bir sekansta bir özelliğin mevcudiyetini tespit etmek için bir tanımlayıcı işlemin (300) bir yönünü gösteren bir akış diyagramıdır.

Şekil 5, sokak türü sekansın (SEK ID NO: 189 ve 190) 8x mutantın (SEK ID NO: 375, 376), Tablo 1'deki mutantlar D, F, H, I, S, C, X ve AA'nın aktivitesini karşılaştıran bir grafiktir.

5 Şekil 6A, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi Gen Alanı Doygunluk Mutagenezi tarafından oluşturulan SEK ID NO: 378'in (SEK ID NO: 377 tarafından kodlanmıştır) dokuz tek alan amino asit mutantını göstermektedir.

10 Şekil 6B, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi her bir enzim için Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) vasıtasıyla belirlenen erime sıcaklığı geçiş orta noktası (T_m) deneylerinde SEK ID NO: 190 ve SEK ID NO: 378'in açılmasını göstermektedir.

Şekil 7A, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi enzimler SEK ID NO: 190 ve SEK ID NO: 378 için pH ve sıcaklık aktivite profillerini göstermektedir.

Şekil 7B, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi enzimler SEK ID NO: 190 ve SEK ID NO: 378 için oran/sıcaklık aktivite optimayı göstermektedir.

15 Şekil 7C, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi enzimler SEK ID NO: 190 ve SEK ID NO: 378 için ısı toleransı/kalıntı aktivitesini göstermektedir.

Şekil 8A, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi gelişmiş ısı toleransı ve aktivitesi olan varyantlar için yapılandırılmış ve taranmış 9 GSSM nokta mutasyonunun bütün muhtemel kombinasyonlarının GeneReassembly kütüphanesini göstermektedir.

20 Şekil 8B, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi optimum bir sıcaklık ve pH 6.0'da SEK ID NO: 190 ("sokak türü") karşılaştırılan "6X-2" varyantının ve "9X" varyantının (SEK ID NO: 378) bağıl aktivitesini göstermektedir.

25 Şekil 9A, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi oligoksilanlar (Xyl)₃, (Xyl)₄, (Xyl)₅ ve (Xyl)₆'nın SEK ID NO: 190 ("sokak türü") ve "9X" varyantı (SEK ID NO: 378) aracılığıyla hidrolizinden sonra elde edilen parmak izlerini göstermektedir.

Şekil 9B, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi Beechwood ksilanın SEK ID NO: 190 ("sokak türü") ve "9X" varyantı (SEK ID NO: 378) aracılığıyla hidrolizinden sonra elde edilen parmak izlerini göstermektedir.

30 Şekil 10A, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi SEK ID NO: 190 ("sokak türü") üzerinde GSSM değerlendirmesi vasıtasıyla elde edilen termal stabilite (T_m ile temsil edilmektedir) gelişiminin seviyesini gösteren bir şematik diyagramdır.

Şekil 10B, aşağıda Örnek 5'te detaylı şekilde açıklandığı gibi GSSM ve GeneReassembly teknolojilerinin kombine edilmesi vasıtasıyla elde edilen SEK ID NO: 378 ve SEK ID NO: 380 formundaki enzim gelişiminin bir "uygunluk diyagramını" göstermektedir.

- 5 Şekil 11, aşağıda Örnek 6'da detaylı şekilde açıklandığı gibi buluşun bir ksilanazının kağıt hamurunu önceden işlemekte faydalı olup olmadığını belirlemek için örnek bir rutin tarama protokolünün şematik bir akış diyagramıdır.

Şekil 12, aşağıda detaylı şekilde açıklandığı gibi buluşun örnek ksilanazlarını kullanan bir "biyolojik ağartma" çalışmasının sonuçlarını grafiksel olarak göstermektedir.

- 10 Şekil 13, aşağıda detaylı şekilde açıklandığı gibi SEK ID NO: 382 sekansına yapılan değişikliklerin bir özetini göstermektedir.

Şekil 14, aşağıda Örnek 9'da detaylı şekilde açıklandığı gibi bir endüstriyel biyolojik ağartma işlemini göstermektedir.

- 15 Şekil 15, aşağıda Örnek 10'da detaylı şekilde açıklandığı gibi buluşun örnek enzimlerinin enzimatik aktivitesini gösteren verileri özetleyen bir tablodur.

Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19, aşağıda Örnek 11'de detaylı şekilde açıklandığı gibi çeşitli koşullar altında Güney Yumuşak Ağacı (SSWB) üzerinde SEK ID NO: 382 aktivitesini grafiksel olarak gösteren ve bu veriyi özetleyen tablolarıdır.

- 20 Şekil 20, aşağıda Örnek 11'de detaylı şekilde açıklandığı gibi çeşitli pH aralıklarında O₂ sonrası Kuzey Sert Ağacı (NHW) üzerinde SEK ID NO: 382 aktivitesini grafiksel olarak gösteren bir tablodur.

Şekil 21, aşağıda Örnek 12'de detaylı şekilde açıklandığı gibi buluşun örnek enzimlerini kullanan bir azo-ksilan analizinin sonuçlarını grafiksel olarak göstermektedir.

- 25 Şekil 22 ve 23, aşağıda Örnek 12'de detaylı şekilde açıklandığı gibi Nir Nelson-Somogyi analizi kullanarak buğday arabinoksilan üzerinde buluşun örnek enzimlerini kullanan örnek bir enzim aktivitesi analizinin sonuçlarını grafiksel olarak göstermektedir.

- 30 Şekil 24 ve 25, aşağıda Örnek 12'de detaylı şekilde açıklandığı gibi bir azo-ksilan analizi kullanarak ksilanlara yönelik örnek bir ısı toleransı analizinin sonuçlarını grafiksel olarak göstermektedir.

Şekil 26, aşağıda Örnek 12'de detaylı şekilde açıklandığı gibi enzimlere yönelik örnek bir ısı toleransı analizinin, bir kalıntı aktivite yönteminin sonuçlarını grafiksel olarak göstermektedir.

5 Şekil 27A ve Şekil 27B, aşağıda Örnek 14'te detaylı şekilde açıklandığı gibi SEK ID NO: 382'nin "sokak türünün" ve SEK ID NO: 482'nin buluşun varyantı veya örnek "mutant" ksilanazının ısı inaktivasyonunu gösteren veriyi göstermektedir.

10 Şekil 28, aşağıda Örnek 14'te detaylı şekilde açıklandığı gibi SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482'nin inaktivasyon enerjisindeki farkı gösteren veriyi göstermekte olup, burada ısı inaktivasyonu çeşitli sıcaklıklarda ölçülmüştür ve veriler bir Arrhenius grafiği yapmak için kullanılmıştır.

Çeşitli çizimlerdeki benzer referans sembolleri benzer elemanları belirtmektedir.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

15 Buluş ksilanazlar ve bunları kodlayan polinükleotitler ve bunları yapmaya ve kullanmaya ilişkin yöntemler sağlar. Buluşun polipeptitleri bir polisakkaritteki glikosidik bağları, örneğin ksilanda bulunan bir glikosidik bağı hidrolize edebilen, örneğin dahili β -1,4-ksilosidik bağların hidrolizini katalize edebilen enzimleri kapsar. Buluşun ksilanazları gıdaları, yemleri, besin takviyelerini, tekstilleri, deterjanları ve benzerlerini yapmak ve/veya işlemek için kullanılabilir. Buluşun ksilanları farmasötik bileşimlerde ve diyet yardımcılarında kullanılabilir.

20 Buluşun ksilanazları pişirme, hayvan yemi, içecek ve ağaç, ağaç hamuru, Kraft hamuru, kağıt, kağıt ürünü veya kağıt hamuru işlemlerinde özellikle faydalıdır. Buluşun bir enzimi yüksek ve/veya düşük pH koşullarına toleranslı veya ısı toleranslı olabilir. Buluşun bir ksilanazı en az yaklaşık 80 °C, 85 °C, 86 °C, 87 °C, 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C, 98 °C, 99 °C, 100 °C, 101 °C, 102 °C, 25 103 °C, 103.5 °C, 104 °C, 105 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C veya 110 °C veya daha fazla bir sıcaklık ve en az yaklaşık pH 11 veya daha fazla bir bazik pH içeren koşullar altında aktiviteyi koruyabilir.

30 Buluş buluşun en az bir veya daha fazla baz çiftinde, kodonlarda, intronlarda, eksonlarda veya amino asit kalıntılarında modifiye edilmiş sekanslar içeren (sırasıyla) ancak halen buluşun bir ksilanazının biyolojik aktivitesini koruyan polinükleotitlerinin veya polipeptitlerinin varyantlarını sağlar. Varyantlar örneğin hata eğilimli PCR, karıştırma, oligonükleotide yönelik mutagenез, düzenek PCR, cinsel PCR

mutagenez, in vivo mutagenez, kaset mutagenez, tekrarlanan topluluk mutagenezi, üssel topluluk mutagenezi, alana özgü mutagenez, yeniden gen düzenlenmesini (örn, GeneReassembly, bkz, örn, U.S. 6,537,776), Gen Alan Doygunluk Mutagenezi (GSSM), sentetik ligasyon yeniden düzenlenmesi (SLR) veya bunların bir kombinasyonu gibi araçlar içeren bir yöntem vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

Tablo 1 ve Tablo 2 GSSM vasıtasıyla SEK ID NO: 189'un (SEK ID NO: 190'ı kodlamaktadır) mutasyona tabi tutulması ile elde edilen varyantları listelemektedir. Patent hakkı bildirim Tablolar 1 ve 2'de belirtilen sekansların birine veya daha fazlasına veya tamamına sahip olan nükleik asitleri, başka bir deyişle SEK ID NO: 189'un varyantları olan sekanslara sahip olan nükleik asitleri, burada varyasyonlar Tablo 1 ve Tablo 2'de belirtilmektedir ve bu varyantlar tarafından kodlanan polipeptitleri içerir.

Bu GSSM varyantları (Tablolar 1 ve 2'e belirtilmektedir) ısı toleransına yönelik test edilmiştir (bkz, aşağıdaki Örnekler). Mutantlar D, F, G, H, I, J, K, S, T, U, V, W, X, Y, Z, AA, DD ve EE'nin Tablo 1'deki mutantlar arasından en yüksek ısı toleransına sahip olduğu bulunmuştur. Mutantlar ayrıca daha "büyük" bir mutant oluşturmak için kombine edilebilir (başka bir deyişle, birden çok sekans varyasyonuna sahip olan bir polipeptit, ayrıca bkz. örn, aşağıda Tablo 10). Örneğin Tablo 1'deki mutantlar D, F, H, I, S, V, X ve AA SEK ID NO: 375'te (nükleik asidi kodlayan polipeptit) ve SEK ID NO: 376'da (amino asit sekansı) belirtildiği şekliyle bir sekansı olan "8x" olarak belirtilen daha büyük bir mutant oluşturmak için kombine edilmiştir. Şekil 5, sokak türü sekansın (SEK ID NO: 189 ve 190) 8x mutantın (SEK ID NO: 3259 ve 260), aktivitesini karşılaştıran bir grafikdir. Sokak türü ve 8x mutantın karşılaştırılmasında her ikisi için optimal sıcaklığın 65 °C olduğu ve her ikisi için optimal pH'nın 5.5 olduğu keşfedilmiştir. Sokak türü sekansın 65 °C'de stabilitesini 1 dakikadan az koruduğu bulunmuşken 8x mutantın (SEK ID NO: 3375, 376) stabilitesini 85 °C'de 10 dakikadan fazla koruduğu bulunmuştur. Kullanılan substrat azo-ksilan olmuştur (örn, Megazyme International Ireland Ltd.'den yulaf kavuzlu buğday). 8x mutantlar (SEK ID NO: 375, 376) GSSM vasıtasıyla değerlendirildi. Sokak türü ısı toleransı değerlendirmesi için bir GSMM soyu olabilir.

Tablo 1

| <u>Mutant</u> | <u>Mutasyon</u> | <u>Sokak türü Sek</u> | <u>GSSM Sek</u> |
|---------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| A | A2F | GCC | TTT |
| B | A2D | GCC | GAC |
| C | A5H | GCT | CAC |
| D | D8F | GAC | TTC |
| E | Q11L | CAA | CTC |
| F | Q11H | CAA | CAC |
| G | N12L | AAT | TTG |
| H | N12L | AAT | TTG |
| I | G17I | GGT | ATA |
| J | Q11H,T23T | CAA,ACC | CAT,ACG |
| K | Q11H | CAA | CAT |
| L | S26P | TCT | CCG |
| M | S26P | TCT | CCA |
| N | S35F | TCA | TTT |
| O | Değişim Yok | GTT | GTA |
| P | A51P | GCA | CCG |
| Q | A51P | GCA | CCG |

| <u>Mutant</u> | <u>Mutasyon</u> | <u>Sokak türü Sek</u> | <u>GSSM Sek</u> |
|---------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| R | G60R | GGA | CGC |
| S | G60H | GGA | CAC |
| T | G60H | GGA | CAC |
| U | P64C | CCG | TGT |
| V | P64V | CCG | GTA |
| W | P64V | CCG | GTT |
| X | S65V | TCC | GTG |
| Y | Q11H | CAA | CAT |
| Z | G68I | GGA | ATA |
| AA | G68A | GGA | GCT |
| BB | A71G | GCT | GGA |
| CC | Değişim Yok | AAT | AAC |
| DD | S79P | TCA | CCA |
| EE | S79P | TCA | CCC |
| FF | T95S | ACT | TCT |
| GG | Y98P | TAT | CCG |
| HH | T114S | ACT | AGC |

| <u>Mutant</u> | <u>Mutasyon</u> | <u>Sokak türü Sek</u> | <u>GSSM Sek</u> |
|---------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| II | Değişim Yok | AAC | AAC |
| JJ | Değişim Yok | AGG | AGA |
| KK | 1142L | ATT | CTG |
| LL | S151I | AGC | ATC |
| MM | S138T,S151A | TCG,AGC | ACG,GCG |
| NN | K158R | AAG | CGG |
| OO | K160V,V172I | AAA,GTA | GTT,ATA |

Isı toleransında “sokak türü” üzerinde gelişmeye veya en iyi varyasyona sahip varyantları (SEK ID NO: 189'un) üreten kodon varyantları Tablo 2’de gösterildiği gibi altı çizilerek belirtilmiştir.

5 Tablo 2

| Mutasyon | Sokak türü Sekansı | GSSM türü Sekansı | Ayrıca aynı değiştirilmiş amino asit için kodlanan diğer kodonlar |
|----------|--------------------|-------------------|---|
| A2F | GCC | TTT | TTC |
| A2D | GCC | GAC | GAT |
| A5H | GCT | CAC | CAT |
| D8F | GAC | TTC | TTT |
| Q11L | CAA | CTC | TTA, TTG, CTT, CTA, CTG |

| Mutasyon | Sokak Sekansı | türü | GSSM Sekansı | Ayrıca aynı değiştirilmiş amino asit için kodlanan diğer kodonlar |
|----------|---------------|------|--------------|---|
| Q11H | CAA | | CAC, CAT | - |
| N12L | AAT | | TTG | TTA, CTC, CTT, CTA, CTG |
| G17I | GGT | | ATA | ATT, ATC |
| T23T | ACC | | ACG | ACT, ACC, ACA |
| S26P | TCT | | CCG, CCA | CCC |
| S35F | TCA | | TTT | TTC |
| A51P | GCA | | CCG | CCC, CCA |
| G60R | GGA | | CGC | CGT, CGA, CGG, AGA, AGG |
| G60H | GGA | | CAC | CAT |
| P64C | CCG | | TGT | TGC |
| P64V | CCG | | GTA, GTT | GTC, GTG |
| S65V | TCC | | GTG | GTC, GTA, GTT |
| G68I | GGA | | ATA | ATT, ATC |
| G68A | GGA | | GCT | GCG, GCC, GCA |
| A71G | GCT | | GGA | GGT, GGC, GGG |
| S79P | TCA | | CCA, CCC | CCG |

| Mutasyon | Sokak Sekansı | türü | GSSM Sekansı | Ayrıca aynı değiştirilmiş amino asit için kodlanan diğer kodonlar |
|----------|---------------|------|--------------|---|
| T95S | ACT | | TCT | TCC, TCA, TCG, AGT, AGC |
| Y98P | TAT | | CCG | CCC, CCA |
| T114S | ACT | | AGC | TCC, TCA, TCG, AGT, TCT |
| I142L | ATT | | CTG | TTA, CTC, CTT, CTA, TTG |
| S151I | AGC | | ATC | ATT, ATA |
| S138T | TCG | | ACG | ACT, ACC, ACA |
| S151A | AGC | | GCG | GCT, GCC, GCA |
| K158R | AAG | | CGG | CGT, CGA, CGC, AGA, AGG |
| K160V | AAA | | GTT | GTC, GTA, GTG |
| V172I | GTA | | ATA | ATT, ATC |

Amino asit sekanslarının bir amino asit sekansının (SEK ID NO: 208) amino asit sekansı bir tekli amino asit mutasyonu vasıtasıyla modifiye edilebilir. Bu mutasyon asparjin ile aspartik asit mutasyonu olabilir. Meydana gelen amino asit sekansı ve karşılık gelen nükleik asit sekansı sırasıyla SEK ID NO: 252 ve SEK ID NO: 251'de belirtilmektedir. Enzimin optimum pH'ında bir gelişmeye sahip tekli amino asit mutasyonları, örneğin SEK ID NO: 208'in mutasyonunu teknikte ksilanazlarla ilişkili olarak gösterilmiştir. (Bkz, örn, Joshi, M., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G., Withers, S., McIntosh, L., J. Mol. Bio. 299, 255-279 (2000).) Ayrıca bu tekli amino asit mutasyonlarında sekans bölümlerinin alt klonlama işleminde uzaklaştırılabildiği not edilmektedir. Örneğin SEK ID NO: 207 ve SEK ID NO: 251 sekansın hizaladığı alan

5 üzerinde sadece bir nükleotitte farklılık gösterir. Ancak SEK ID NO: 207'nin N-terminalindeki bir 78 nükleotit alanının alt klonlamada SEK ID NO: 251'in N-terminalinden çıkartıldığı not edilmektedir. Ek olarak SEK ID NO: 251'deki ilk üç nükleotit ATG'ye çevrilmiştir ve daha sonra SEK ID NO: 251'deki altıncı nükleotitte nokta mutasyonu yapılmıştır.

“Doygunluk mutagenezi”, “gen alanı doygunluk mutagenezi” veya “GSSM” terimleri aşağıda detaylı şekilde açıklandığı üzere bir polinükleotide nokta mutasyonlar dahil etmek için dejenere oligonükleotit primerleri kullanan bir yöntem içerir.

10 “Optimize yönlendirilmiş evrim sistemi” veya “optimize yönlendirilmiş evrim” terimleri ilgili nükleik asit sekanslarının, örn, ilgili genlerin fragmanlarının yeniden düzenlenmesine yönelik bir yöntem içerir ve aşağıda detaylı şekilde açıklanmaktadır.

“Sentetik ligasyon yeniden düzenlemesi” veya “SLR” terimleri stokastik olmayan bir şekilde oligonükleotit fragmanlarını ligatlamaya ilişkin bir yöntem içerir ve aşağıda detaylı şekilde açıklanmaktadır.

15 **Nükleik Asitlerin Üretilmesi ve Manipüle Edilmesi**

Buluş buluşun polipeptitlerini kodlayan ekspresyon vektörleri gibi ekspresyon kasetleri dahil olmak üzere buluşun örnek bir amino asit sekansına ilişkin en az bir sekans modifikasyonuna sahip olan enzimler içeren, ksilanaz aktivitesine sahip olan polipeptitleri kodlayan nükleik asitler sağlamakta olup, burada nükleik asit buluşun 20 örnek bir nükleik asidinin en az bir sekans modifikasyonuna sahiptir, burada sekans modifikasyonu en az aşağıdaki değişikliklerin birini, ikisini, üçünü, dördünü beşini, altısını, yedisini, sekizini, dokuzunu, onunu, on birini, on ikisini, on üçünü, on dördünü, on beşini, on altısını, on yedisini, on sekizini, on dokuzunu veya tamamını içerir: SEK ID NO: 383'ün 10 ila 12 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CCT, TTA, TTG, CTC, 25 CTA veya CTG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 25 ila 27 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CCC, CCG, CCA veya CCT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 28 ila 30 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TCA; TCC, TCT, TCG, AGT veya AGC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TTT veya TTC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 kalıntısının eş değerindeki 30 nükleotitleri ATA, ATT veya ATC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 37 ila 39 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TGG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 40 ila 42 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CAC veya CAT'e değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 52 ila 54

kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TTC veya TTT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 73 ila 75 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GAG veya GAA'ya değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 73 ila 75 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CCC, CCG, CCA veya CCT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 88 ila 90 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GTG, GTC, GTA veya GTT'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TGT veya TGC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CAT veya CAC'e değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 100 ila 102 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TTG, TTA, CTT, CTC, CTA veya CTG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 103 ila 105 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GAG veya GAA'ya değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 103 ila 105 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri GAT veya GAC'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 211 ila 213 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CA, ACT, ACC veya ACG'ye değiştirilir, SEK ID NO: 383'ün 211 ila 213 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri TGT veya TGC'ye değiştirilir veya SEK ID NO: 383'ün 508 ila 582 kalıntısının eş değerindeki nükleotitleri CAT veya CAC'ye değiştirilir.

Yeni ksilanaz sekansları keşfetmek için yöntemler buluşun nükleik asitlerini kullanır. Ksilanaz genlerinin, transkriptlerinin ve polipeptitlerinin ekspresyonunu inhibe etmeye yönelik yöntemler buluşun nükleik asitlerini kullanır. Buluşun nükleik asitlerini modifiye etmeye yönelik yöntemler örn, sentetik ligasyon yeniden düzenlemesi, optimize yönlendirilmiş evrim sistemi ve/veya doygunluk mutagenesidir.

Buluşun nükleik asitleri örn, cDNA kütüphanelerinin klonlanması ve ekspresyonu, mesaj veya genomik DNA'nın PCR ve benzerleri vasıtasıyla amplifikasyonu ile yapılabilir, izole edilebilir ve/veya manipüle edilebilir. Örneğin aşağıdaki sekanslar başlangıçta aşağıdaki kaynaklardan türetilmiştir:

25 Tablo 3

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 1,2 | Bakteri |
| 101, 102 | Çevresel |
| 103, 104 | Bakteri |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 105, 106 | Çevresel |
| 107, 108 | Bakteri |
| 109, 110 | Çevresel |
| 11, 12 | Çevresel |
| 111, 112 | Çevresel |
| 113, 114 | Çevresel |
| 115, 116 | Çevresel |
| 117, 118 | Çevresel |
| 119, 120 | Çevresel |
| 121, 122 | Çevresel |
| 123, 124 | Çevresel |
| 125, 126 | Çevresel |
| 127, 128 | Çevresel |
| 129, 130 | Bakteri |
| 13, 14 | Çevresel |
| 131, 132 | Çevresel |
| 133, 134 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 135, 136 | Çevresel |
| 137, 138 | Çevresel |
| 139, 140 | Çevresel |
| 141, 142 | Çevresel |
| 143, 144 | Bakteri |
| 145, 146 | Okaryot |
| 147, 148 | Çevresel |
| 149, 150 | Çevresel |
| 15, 16 | Çevresel |
| 151, 152 | Çevresel |
| 153, 154 | Çevresel |
| 155, 156 | Çevresel |
| 157, 158 | Çevresel |
| 159, 160 | Çevresel |
| 161, 162 | Çevresel |
| 163, 164 | Çevresel |
| 165, 166 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 167, 168 | Çevresel |
| 169, 170 | Çevresel |
| 17, 18 | Bakteri |
| 171, 172 | Çevresel |
| 173, 174 | Çevresel |
| 175, 176 | Çevresel |
| 177, 178 | Çevresel |
| 179, 180 | Çevresel |
| 181, 182 | Çevresel |
| 183, 184 | Çevresel |
| 185, 186 | Çevresel |
| 187, 188 | Çevresel |
| 189, 190 | Çevresel |
| 19, 20 | Çevresel |
| 191, 192 | Çevresel |
| 193, 194 | Çevresel |
| 195, 196 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 197, 198 | Çevresel |
| 199, 200 | Çevresel |
| 201, 202 | Çevresel |
| 203, 204 | Çevresel |
| 205, 206 | Çevresel |
| 207, 208 | Çevresel |
| 209, 210 | Çevresel |
| 21, 22 | Çevresel |
| 211, 212 | Çevresel |
| 213, 214 | Çevresel |
| 215, 216 | Çevresel |
| 217, 218 | Çevresel |
| 219, 220 | Çevresel |
| 221, 222 | Çevresel |
| 223, 224 | Çevresel |
| 225, 226 | Çevresel |
| 227, 228 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 229, 230 | Çevresel |
| 23, 24 | Çevresel |
| 231, 232 | Bakteri |
| 233, 234 | Çevresel |
| 235, 236 | Çevresel |
| 237, 238 | Çevresel |
| 239, 240 | Çevresel |
| 241, 242 | Çevresel |
| 243, 244 | Çevresel |
| 245, 246 | Çevresel |
| 247, 248 | Çevresel |
| 249, 250 | Çevresel |
| 25, 26 | Çevresel |
| 251, 252 | Çevresel |
| 253, 254 | Çevresel |
| 255, 256 | Çevresel |
| 257, 258 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 259, 260 | Çevresel |
| 261, 262 | Çevresel |
| 263, 264 | Çevresel |
| 265, 266 | Çevresel |
| 267, 268 | Bakteri |
| 269, 270 | Çevresel |
| 27, 28 | Çevresel |
| 271, 272 | Çevresel |
| 273, 274 | Çevresel |
| 275, 276 | Çevresel |
| 277, 278 | Çevresel |
| 279, 280 | Çevresel |
| 281, 282 | Çevresel |
| 283, 284 | Çevresel |
| 285, 286 | Çevresel |
| 287, 288 | Çevresel |
| 289, 290 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 29, 30 | Arke |
| 291, 292 | Çevresel |
| 293, 294 | Çevresel |
| 295, 296 | Çevresel |
| 297, 298 | Çevresel |
| 299, 300 | Çevresel |
| 3,4 | Çevresel |
| 301, 302 | Çevresel |
| 303, 304 | Çevresel |
| 305, 306 | Bakteri |
| 307, 308 | Çevresel |
| 309, 310 | Çevresel |
| 31, 32 | Çevresel |
| 311, 312 | Çevresel |
| 313, 314 | Bakteri |
| 315, 316 | Çevresel |
| 317, 318 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 319, 320 | Çevresel |
| 321, 322 | Çevresel |
| 323, 324 | Çevresel |
| 325, 326 | Çevresel |
| 327, 328 | Çevresel |
| 329, 330 | Çevresel |
| 33, 34 | Çevresel |
| 331, 332 | Çevresel |
| 333, 334 | Çevresel |
| 335, 336 | Çevresel |
| 337, 338 | Çevresel |
| 339, 340 | Çevresel |
| 341, 342 | Çevresel |
| 343, 344 | Çevresel |
| 345, 346 | Çevresel |
| 347, 348 | Çevresel |
| 349, 350 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|----------|----------|
| 35, 36 | Çevresel |
| 351, 352 | Çevresel |
| 353, 354 | Çevresel |
| 355, 356 | Çevresel |
| 357, 358 | Çevresel |
| 359, 360 | Çevresel |
| 361, 362 | Çevresel |
| 363, 364 | Çevresel |
| 365, 366 | Çevresel |
| 367, 368 | Çevresel |
| 369, 370 | Çevresel |
| 37, 38 | Çevresel |
| 371, 372 | Çevresel |
| 373, 374 | Çevresel |
| 375, 376 | Yapay |
| 377, 378 | Yapay |
| 39, 40 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|--------|----------|
| 41, 42 | Çevresel |
| 43, 44 | Çevresel |
| 45, 46 | Çevresel |
| 47, 48 | Çevresel |
| 49, 50 | Çevresel |
| 5, 6 | Çevresel |
| 51, 52 | Çevresel |
| 53, 54 | Bakteri |
| 55, 56 | Çevresel |
| 57, 58 | Çevresel |
| 59, 60 | Çevresel |
| 61, 62 | Çevresel |
| 63, 64 | Çevresel |
| 65, 66 | Çevresel |
| 67, 68 | Çevresel |
| 69, 70 | Çevresel |
| 7, 8 | Çevresel |

| SEK ID | KAYNAK |
|---------|----------|
| 71, 72 | Çevresel |
| 73, 74 | Çevresel |
| 75, 76 | Çevresel |
| 77, 78 | Çevresel |
| 79, 80 | Çevresel |
| 81, 82 | Çevresel |
| 83, 84 | Çevresel |
| 85, 86 | Bakteri |
| 87, 88 | Çevresel |
| 89, 90 | Bakteri |
| 9, 10 | Çevresel |
| 91, 92 | Çevresel |
| 93, 94 | Çevresel |
| 95, 96 | Çevresel |
| 97, 98 | Çevresel |
| 99, 100 | Çevresel |

Burada açıklanan yöntemlerin uygulanmasında homolog genler burada açıklandığı gibi bir şablon nükleik asidin manipüle edilmesi vasıtasıyla modifiye edilebilir. Bu bilimsel ve patent literatüründe iyi açıklanan, teknikte bilinen herhangi bir yöntem veya protokol veya cihaz ile bağlantılı şekilde uygulanabilir.

- 5 İzole edilmiş bir nükleik asit patent hakkı bildiriminin sekanslarının birini ve bunlara büyük ölçüde özdeş sekansları, bunlara tamamlayıcı sekansları veya patent hakkı bildiriminin bir sekansının sekanslarının veya (buna tamamlayıcı sekansların) birinin en az 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 veya 500 ardışık bazını içeren bir fragmanı içerebilir. İzole edilmiş nükleik asitler cDNA, genomik DNA
- 10 ve sentetik DNA dahil olmak üzere DNA içerebilir. DNA çift sarmallı veya tek sarmallı olabilir ve eğer tek sarmallı ise kodlama sarmalı veya kodlamayan (anti-sens) sarmalı olabilir. Alternatif olarak izole edilmiş nükleik asitler RNA içerebilir.

Bir izole edilmiş nükleik asit buluşun polipeptitlerinin birini veya buluşun polipeptitlerinin birinin en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asidini

15 içeren fragmanlarını kodlayabilir. Bu nükleik asitlerin kodlama sekansları patent hakkı bildiriminin nükleik asitlerinin birinin kodlama sekanslarının biriyle veya bunun bir fragmanı ile özdeş olabilir veya genetik kodun çokluğunun veya dejenere olmasının bir sonucu olarak buluşun polipeptitlerini, buna büyük ölçüde özdeş sekanslarını ve buluşun polipeptitlerinin birinin en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya

20 150 ardışık amino asidine sahip olan fragmanlarını kodlayan farklı kodlama sekansları olabilir. Genetik kod teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinmektedir ve örn, B. Lewin, Genes VI, Oxford University Press, 1997, sayfa 214'te elde edilebilir.

Buluşun polipeptitlerinin birini ve buna büyük ölçüde özdeş sekansları kodlayan izole edilmiş nükleik asit: buluşun bir nükleik asidinin sadece kodlama sekansını ve buna

25 büyük ölçüde özdeş sekansları ve lider sekanslar veya proprotein sekansları ve kodlamayan sekanslar örneğin kodlama sekansının kodlamayan sekansları 5' ve/veya 3' gibi ilave kodlama sekanslarını içerebilir ancak bunlarla sınırlı değildir. Dolayısıyla burada kullanıldığı şekliyle "bir polipeptit kodlayan polinükleotit" terimi polipeptit için sadece kodlama sekansı içeren bir polinükleotiti aynı zamanda ilave kodlama ve

30 kodlamayan sekansı içeren bir polinükleotiti kapsar.

Alternatif olarak buluşun nükleik asit sekansları ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekanslar buluşun polinükleotitlerine ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekanslara

sessiz değişimler dahil etmek için alana yönlendirilmiş mutagenез gibi geleneksel teknikler veya teknikte uzman kişilerin aşına olduğu başka teknikler kullanılarak mutagenize edilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle “sessiz değişiklik” örneğin polinükleotit tarafından kodlanan amino asit sekansını değiştirmeyen değişimleri içerir.

- 5 Bu değişimler konak organizmasında sıklıkla meydana gelen kodonların veya kodon çiftlerinin dahil edilmesi vasıtasıyla polipeptiti kodlayan bir vektör içeren konak hücreleri tarafından üretilen polipeptit seviyesini arttırmak için istenebilir.

Buluş ayrıca buluşun polipeptitlerinde ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekanslarda amino asit ornatımları, eklemeleri, çıkarmaları, füzyonları ve tepe kesmeleri ile sonuçlanan nükleotit değişimlerine sahip olan polinükleotitlerle ilgilidir. Bu nükleotit değişimleri alana yönlendirilmiş mutagenез, rastgele kimyasal mutagenез, eksonükleaz III silinmesi ve diğer rekombinant DNA teknikleri gibi teknikler kullanılarak yapılabilir. Alternatif olarak bu oligonükleotit değişimler burada sağlandığı gibi yüksek, orta dereceli ve düşük katılıkta koşullar altında buluşun sekanslarının birinin en az 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 veya 500 ardışık bazını ve bunlarla büyük ölçüde özdeş olan sekansları (veya bunlara tamamlayıcı sekansları) içeren problara spesifik olarak hibritlenen nükleik asitlerin tanımlanması vasıtasıyla izole edilen doğal olarak meydana gelen alelik varyantlar olabilir.

Genel Teknikler

- 20 Bu buluşu uygulamak için kullanılan gerek RNA, iRNA, antisens nükleik asit, cDNA, genomik DNA, vektörler, virüsler veya bunların hibritleri gibi nükleik asitler çeşitli kaynaklardan izole edilebilir, genetik olarak üretilebilir, amplifiye edilebilir ve/veya eksprese edilebilir/rekombinant olarak oluşturulabilir. Bu nükleik asitlerden üretilen rekombinant polipeptitler münferit olarak izole edilebilir veya klonlanabilir veya istenen bir aktivite için test edilebilir. Herhangi bir rekombinant ekspresyon sistemi kullanılabilmekte olup, bakteriyel, memeli, maya, böcek veya bitki hücresi ekspresyon sistemlerini içerir.

Alternatif olarak bu nükleik asitler şu yayınlarda belirtildiği gibi iyi bilinen kimyasal sentez teknikleri vasıtasıyla in vitro sentezlenebilir, örn, Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang

(1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; U.S. 4,458,066.

Nükleik asitlerin manipülasyonuna yönelik örn, alt klonlama, problemleri etiketleme (örn, Klenow polimeraz, nick dönüşümü, amplifikasyon kullanan rastgele-primer etiketleme),
5 sekanslama, hibridizasyon ve benzerleri gibi teknikler bilim ve patent literatüründe iyi açıklanmaktadır, bkz, örn, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR
10 BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Nükleik asitleri elde etmeye ve manipüle etmeye ilişkin başka faydalı araçlar genomik örneklerden klonlama için ve eğer istenirse örn, genomik klonlardan veya cDNA klonlarından izole edilen veya amplifiye edilen ek parçaların taranması ve yeniden
15 klonlanması için kullanılır. Kullanılan nükleik asit kaynakları örn, yapay memeli kromozomlarında (MAC'ler), bkz, örn, U.S. 5,721,118; 6,025,155 sayılı patent belgesi; insan yapay kromozomlarında, bkz, örn, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335; yapay maya kromozomlarında (YAC); yapay bakteriyel kromozomlarda (BAC); P1 yapay kromozomlarında, bkz, örn, Woon (1998) Genomics 50:306-316; P1-türevi
20 vektörlerde (PACs), bkz, örn, Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; kozmidlerde, rekombinant virüslerde, fajlarda veya plazmidlerde bulunan genomik veya cDNA kütüphanelerini içerir

Buluşun bir polipeptitini kodlayan bir nükleik asit çevrilmiş polipeptitin veya bunun fragmanının sekresyonunu yönlendirebilen bir lider sekansı ile uygun fazda
25 düzenlenebilir.

Buluşun bir polipeptiti bir heterolog peptite veya polipeptite örneğin artan stabilite veya basitleştirilmiş saflaştırma gibi istenen özellikleri uygulayan N-terminal tanımlama peptitlerine kaynaştırılabilir. Buluşun peptitleri ve polipeptitleri ayrıca örn, daha immünojenik bir peptit üretmek için, rekombinant olarak sentezlenmiş bir peptiti daha
30 kolay izole etmek için, antikorları ve antikor eksprese eden B hücrelerini ve benzerlerini tanımlamak ve izole etmek için buraya bağlanan bir veya daha fazla ilave alanla füzyon proteinleri olarak sentezlenebilir ve eksprese edilebilir. Tespit ve saflaştırmayı

kolaylaştıran alanlar örn, polihistidin yolları gibi metal şelatlama peptitlerini ve immobilize metaller, immobilize immünoglobulin üzerinde saflaştırmaya olanak sağlayan protein A alanları ve FLAGS uzatma/afinite saflaştırma sisteminde (Immunex Corp, Seattle WA) kullanılan alan üzerinde saflaştırmaya olanak sağlayan histidin-
 5 triptofan modüllerini içerir. Saflaştırmayı kolaylaştırmak için Faktör Xa veya enterokinaz (Invitrogen, San Diego CA) gibi bir yarılabilen bağlayıcı sekansın bir saflaştırma alanı ve motif içeren peptit veya polipeptit arasına dahil edilmesi sağlanır. Orneğin bir ekspresyon vektörü altı histidin kalıntısına, ardından bir tiyoredoksin ve bir enterokinaz klevaj alanına bağlanan bir epitop kodlayan nükleik asit sekansını içerebilir
 10 (bkz, örn, Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:404-414). Histidin kalıntısı tespit ve saflaştırmayı kolaylaştırırken enterokinaz klevaj alanı epitopun füzyon proteininin geri kalanından saflaştırılması için bir araç sağlar. Füzyon proteinlerini kodlayan vektörleri sağlayan teknoloji ve füzyon proteinlerinin uygulanması bilimsel ve patent literatüründe iyi açıklanmaktadır, bkz,
 15 örn, Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53.

Burada kullanıldığı şekliyle “nükleik asit” veya “nükleik asit sekansı” ifadeleri bir oligonükleotiti, nükleotiti, polinükleotiti veya bunların herhangi birinin bir fragmanını, genomik ve sentetik orijinli tek sarmallı veya çift sarmallı olabilen ve bir sens veya antisens sarmalı temsil eden DNA ve RNA’yı, peptit nükleik asidini (PNA) veya doğal
 20 veya sentetik orijinli herhangi bir DNA benzeri veya rNA benzeri malzemeyi işaret eder. Burada kullanıldığı şekliyle “nükleik asit” veya “nükleik asit sekansı” ifadeleri bir oligonükleotiti, nükleotiti, polinükleotiti veya bunların herhangi birinin bir fragmanını, genomik ve sentetik orijinli tek sarmallı veya çift sarmallı olabilen ve bir sens veya antisens sarmalı temsil eden DNA ve RNA’yı (örn, mRNA, rRNA, tRNA, iRNA), peptit
 25 nükleik asidini (PNA) veya örn, iRNA, ribonükleoproteinler (örn, çift sarmallı iRNA, örn, iRNP’ler) doğal veya sentetik orijinli herhangi bir DNA benzeri veya rNA benzeri malzemeyi içerir. Terim doğal nükleotitlerin bilinen analoglarını içeren nükleik asitleri, başka bir deyişle oligonükleotitleri kapsar. Terim ayrıca sentetik omurgaları olan nükleik asit benzeri yapıları kapsar, bkz, örn, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
 30 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156. “Oligonükleotit” gerek tek sarmallı bir polideoksinükleotiti gerekse kimyasal olarak sentezlenebilen iki tamamlayıcı polideoksinükleotiti içerir. Bu sentetik oligonükleotitler 5’ fosfat içermez ve dolayısıyla

bir kinaz mevcudiyetinde bir ATP ile bir fosfat eklenmeden başka bir oligonükleotide ligatlanmayacaktır. Bir sentetik oligonükleotit fosforu uzaklaştırılmamış bir fragmana ligatlanabilir.

5 Belirli bir polipeptitin veya proteinin “bir kodlama sekansı” veya bir bunu “kodlayan nükleotit sekansı” uygun regülatör sekansların kontrolü altında yerleştirildiği zaman bir polipeptite veya proteine kopyalanan veya çevrilen bir nükleik asit sekansıdır.

10 “Gen” terimi bir polipeptit zinciri üretilmesine dahil olan DNA segmenti anlamına gelir; kodlama alanından (lider takip ve takip eden) aynı zamanda bireysel kodlama segmentleri (eksonlar) arasındaki müdahaleci sekanslardan (intronlar) önce gelen ve bunu takip eden bölgeleri içerir. Burada kullanıldığı şekliyle “faal olarak bağlı” iki veya daha fazla nükleik asit (örn, DNA) segmenti arasında bir fonksiyonel ilişkiye işaret eder. Tipik olarak transkripsiyonel regülatör sekansın bir transkribe edilen bir sekansla fonksiyonel ilişkisine işaret eder. Örneğin bir promotör eğer kodlama sekansının transkripsiyonunu uygun bir konak hücrede veya başka ekspresyon sisteminde stimüle ederse veya modüle ederse buluşun bir nükleik asidi gibi bir kodlama sekansına faal olarak bağlanır. Genel olarak transkribe edilen bir sekansa faal olarak bağlanan promotör transkripsiyonel regülatör sekanslar fiziksel olarak transkribe edilmiş sekansa bitişiktir, başka bir deyişle bunlar cis-etkilidir. Ancak arttırıcılar gibi bazı transkripsiyonel regülatör sekansların fiziksel olarak bitişik olması veya 20 transkripsiyonunu arttırdıkları kodlama sekanslarının civarına yerleşmesi gerekli değildir.

Burada açıklandığı şekliyle “ekspresyon kaseti” terimi bu tür sekanslarla uyumlu bir konakta bir yapısal genin ekspresyonunu etkileyebilen bir nükleotit sekansına işaret eder (başka bir deyişle, buluşun bir ksilanazı gibi protein kodlayan bir sekans). 25 Ekspresyon kasetleri polipeptit kodlama sekansına faal olarak bağlanan en az bir promotör ve isteğe bağlı olarak başka sekanslar, örn, transkripsiyon sonlandırma sinyalleri içerir. Ekspresyonu gerçekleştirmekte gerekli veya yardımcı ilave faktörler ayrıca kullanılabilir, örn, arttırıcılar. Dolayısıyla ekspresyon kasetleri ayrıca plazmidleri, ekspresyon vektörlerini, rekombinant virüsleri, rekombinant “çıplak DNA”nın herhangi 30 bir formunu ve benzerlerini içerebilir. Bir “vektör” bir hücreyi enfekte edebilen, transfekte edebilen, geçici veya kalıcı olarak aktarabilen bir nükleik asidi içerir. Bir vektörün bir çıplak nükleik asit veya protein veya lipitle kompleks haline gelen bir nükleik asit olabildiği ayırt edilecektir. Bir yönde vektör viral veya bakteriyel nükleik

asitler ve/veya proteinler ve/veya membranlar (örn, bir hücre membranı, bir viral lipid zarf, vs.) içerir. Vektörler DNA fragmanlarının takılabildiği ve kopyalanmış hale gelebildiği replikonları (örn, RNA replikonları, bakteriyofajlar) içerir ancak bunlarla sınırlı değildir. Dolayısıyla vektörler RNA, otonom kendi kendini çoğaltan dairesel veya lineer DNA veya RNA (örn, plazmidler, virüsler ve benzerleri, bkz, örn, U.S. 5,217,879) içerir ancak bunlarla sınırlı değildir ve hem ekspresyon hem de ekspresyon olmayan plazmidleri içerir. Bir rekombinant mikroorganizma veya hücre kültürü bir “ekspresyon vektörü” barındıran olarak tanımlandığında bu hem ekstra-kromozomal hem de lineer DNA ve konak kromozomlarına dahil edilmiş olan DNA'yı içerir. Bir vektör bir konak hücre tarafından korunmakta olduğunda vektör ya bir otonom yapı olarak mitoz sırasında hücreler tarafından stabil şekilde kopyalayabilir ya da konağın genomuna dahil edilir.

Burada kullanıldığı şekliyle “promotör” terimi bir hücrede, örn, bir bitki hücresinde bir kodlama sekansının transkripsiyonunu tahrik edebilen bütün sekansları içerir. Dolayısıyla yapılarda kullanılan promotörler cis-etkili transkripsiyonel kontrol elemanlarını ve bir genin transkripsiyonunun zamanlamasının ve/veya hızının regüle edilmesine veya modüle edilmesine dahil olan regülatör sekansları içerir. Örneğin bir promotör bir arttırıcı, bir promotör, bir transkripsiyon sonlandırıcı, bir replikasyon orijini, bir kromozomal entegrasyon sekansı, 5' ve 3' çevrilmemiş bölgeler veya bir intronik sekans dahil olmak üzere transkripsiyonel regülasyona dahil olan bir cis-etkili transkripsiyonel eleman olabilir. Bu cis-etkili sekanslar transkripsiyonu gerçekleştirmek (başlatmak/bitirmek, regüle etmek, modüle etmek, vs.) için tipik olarak proteinlerle veya diğer biyomoleküllerle etkileşir. “Ardışık” promotörler birçok çevresel koşul ve gelişim veya hücre farklılaşması durumu altında ekspresyonu tahrik edenlerdir. “İndüklenebilir” veya “regüle edilebilir” promotörler buluşun nükleik asidinin ekspresyonunu çevresel koşulların ve gelişimsel koşulların etkisi altında yönlendirir. İndüklenebilir promotörler aracılığıyla transkripsiyonu etkileyebilen çevresel koşullara ilişkin örnekler anaerobik koşulları, yüksek sıcaklığı, kuraklığı veya ışık mevcudiyetini içerir.

“Dokuya özgü” promotörler sadece belirli hücrelerde veya dokularda veya organlarda, örn, hayvanlarda veya bitkilerde aktif olan transkripsiyonel kontrol elemanlarıdır. Dokuya özgü regülasyona belirli bir dokuya özgü proteinleri kodlayan genlerin eksprese edilmesini sağlayan yapısal faktörler vasıtasıyla erişilebilir. Bu faktörlerin

spesifik dokuların gelişmesine olanak sağlamak için memeli hücrelerinde ve bitkilerde mevcut olduğu bilinmektedir.

Burada kullanıldığı şekliyle “izole edilmiş” terimi malzemenin (örn, bir nükleik asit, bir polipeptit, bir hücre) kendi orijinal ortamından (örn, doğal olarak meydana geliyorsa doğal çevreden) uzaklaştırılması anlamına gelir. Örneğin yaşayan bir hayvanda bulunan doğal olarak meydana gelen bir polinükleotit veya polipeptit izole edilmez ancak doğal sistemde birlikte bulunan malzemelerin bazılarında veya tamamından ayrılan aynı polinükleotit veya polipeptit izole edilir. Bu polinükleotitler bir vektörün parçası olabilir ve/veya bu polinükleotitler veya polipeptitler bir bileşimin parçası olabilir ve halen bu vektör veya bileşimin kendi doğal ortamının parçası olmamasından dolayı izole edilir. Burada kullanıldığı şekliyle “saflaştırılmış” terimi kesin saflığı gerektirmez, bunun yerine nisbi bir tanım olması amaçlanmaktadır. Bir kütüphaneden elde edilen münferit nükleik asitler geleneksel olarak elektroforetik homojeniteye saflaştırılmıştır. Bu klonlardan elde edilen sekanslar ne kütüphaneden ne de toplam insan DNA’sından doğrudan elde edilebilir. Buluşun saflaştırılmış nükleik asitleri organizmadaki genomik DNA’nın geri kalanından en az kat 10^4 - 10^6 saflaştırılmıştır. Ancak “saflaştırılmış” terimi ayrıca genomik DNA’nın geri kalanından veya bir kütüphanedeki veya başka bir ortamdaki diğer sekanslardan en az bir büyüklük kertesini, tipik olarak iki veya daha fazla kerte ve daha tipik olarak dört veya beş büyüklük kertesini saflaştırılmış olan nükleik asitleri içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle “rekombinant” terimi nükleik asidin kendi doğal ortamında bitişik olmadığı bir “omurga” nükleik aside bitişik olduğu anlamına gelir. Ek olarak nükleik asitleri “zenginleştirmek” bir nükleik asit omurga molekülü popülasyonundaki nükleik asit eklerinin sayısının % 5’ini veya daha fazlasını temsil edecektir. Omurga molekülleri ekspresyon vektörleri gibi nükleik asitleri, kendi kendini kopyalayan nükleik asitleri, virüsleri, entegre edici nükleik asitleri ve ilgili nükleik asit ekini korumak veya manipüle etmek için kullanılan diğer vektörleri veya nükleik asitleri içerir. Ek olarak zenginleştirilmiş nükleik asitler bir rekombinant molekül popülasyonundaki nükleik asit eklerinin sayısının % 15’ini veya daha fazlasını temsil edecektir. Ek olarak zenginleştirilmiş nükleik asitler bir rekombinant molekül popülasyonundaki nükleik asit eklerinin sayısının % 50’sini veya daha fazlasını temsil edecektir. Ek olarak zenginleştirilmiş nükleik asitler bir rekombinant molekül popülasyonundaki nükleik asit eklerinin sayısının % 90’ını veya daha fazlasını temsil edecektir.

“Plazmidler” öncesinde bir küçük “p” harfi vardır ve/veya bunları büyük harfler ve/veya rakamlarla takip eder. Burada başlangıç plazmidleri ya ticari olarak bulunabilir, kısıtlanmamış bir şekilde toplum tarafından ulaşılabilir şekilde bulunabilir ya da yayınlanan prosedürlere uygun olarak mevcut plazmidlerden yapılandırılabilir. Ek olarak burada açıklananlara eş değer plazmidler teknikte bilinmektedir ve teknikte sıradan uzmanlıkta kişiler için açık olacaktır. Plazmidler ticari olarak bulunabilir, kısıtlanmamış bir şekilde toplum tarafından ulaşılabilir şekilde bulunabilir ya da yayınlanan prosedürlere uygun olarak mevcut plazmidlerden yapılandırılabilir. Burada açıklananlara eş değer plazmidler teknikte bilinmektedir ve teknikte sıradan uzmanlıkta kişiler için açık olacaktır.

DNA'nın “parçalanması” DNA'nın sadece DNA'daki belirli sekanslarda işlev gören bir kısıtlama enzimi ile katalitik klevajına işaret eder. Burada kullanılan çeşitli kısıtlama enzimleri ticari olarak bulunabilir ve bunların reaksiyon koşulları, kofaktörleri ve diğer gereksinimleri sıradan uzmanlıkta bir kişinin bileceği şekilde kullanılmıştır. Analitik amaçlar doğrultusunda tipik olarak 1 µg'lik plazmid veya DNA fragmanı yaklaşık 20 µg'lik tampon solüsyonunda yaklaşık 2 birim enzimle kullanılır. Plazmid yapısı için DNA fragmanlarını izole etme amacı doğrultusunda tipik olarak 5 ila 50 µg'lik DNA daha büyük bir hacimde 20 ila 250 birim enzimle parçalanır. Belirli kısıtlama enzimleri için uygun tamponlar ve substrat miktarları üretici tarafından belirtilmektedir. 37 °C'de yaklaşık 1 saatlik inkübasyon süresi kullanılır ancak üreticinin talimatlarına göre değişiklik gösterebilir. Parçalanmadan sonra istenen fragmanı izole etmek için jel elektroforez gerçekleştirilebilir.

“Hibridizasyon” bir nükleik asit sarmalının baz eşleştirme aracılığıyla bir tamamlayıcı sarmalla birleştiği işleme işaret eder. Hibridizasyon reaksiyonları ilgili sekansın düşük konsantrasyonlarda bulunduğu örneklerde bile tanımlanabileceği şekilde duyarlı ve seçici olabilir. Uygun şekilde zorlayıcı koşullar örneğin tuzun veya formamidin ön hibridizasyon ve hibridizasyon solüsyonlarındaki konsantrasyonları aracılığıyla veya hibridizasyon sıcaklığı tarafından tanımlanabilir ve teknikte iyi bilinmektedir. Özellikle zorlayıcılık tuzun konsantrasyonunun azaltılması, formamidin konsantrasyonunun artırılması veya hibridizasyon sıcaklığının yükseltilmesi vasıtasıyla artırılabilir. Alternatif yönlerde nükleik asitler burada belirtildiği gibi çeşitli zorlayıcı koşullar (örn, yüksek, orta ve düşük) altında hibritlenme kabiliyetleri ile tanımlanır.

Orneğin yüksek zorlayıcı koşullar altında hibridizasyon yaklaşık % 50 formamidde yaklaşık 37 °C ila 42 °C'de gerçekleşebilir. Orneğin yüksek zorlayıcı koşullar altında hibridizasyon yaklaşık % 35 ila 525 formamidde yaklaşık 30 °C ila 35 °C'de gerçekleşebilir. Özellikle hibridizasyon yüksek zorlayıcı koşullar altında 42 °C'de % 50 formamid, 5X SSPE, % 0,3 SDS ve 200 n/ml denatüre somon sperm DNA'sında gerçekleşebilir. Hibridizasyon yukarıda açıklandığı gibi indirgenmiş zorlayıcı koşullar altında ancak 35 °C'lik bir indirgenmiş sıcaklıkta % 35 formamidde gerçekleşebilir. Belirli bir zorlayıcılık seviyesine karşılık gelen sıcaklık aralığı ayrıca ilgili nükleik asidin purin ila pirimidin oranının hesaplanması ve sıcaklığın bu doğrultuda ayarlanması vasıtasıyla daraltılabilir. Yukarıdaki aralıklar ve koşullar üzerinde varyasyonlar teknikte iyi bilinmektedir.

Transkripsiyonel ve translasyonel kontrol sekansları

Buluş RNA sentezini / ekspresyonunu yönlendirmek veya modüle etmek için ekspresyon (örn, transkripsiyonel veya translasyonel) kontrol sekansına (sekanslarına), örn, promotörlere veya arttırıcılara faal olarak bağlanan buluşun nükleik asit (örn, DNA) sekanslarını sağlar. Ekspresyon kontrol sekansı bir ekspresyon vektöründe olabilir. Örnek bakteriyel promotörler lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL ve trp içerir. Örnek ökaryotik promotörler CMV, HSV timidin kinazi erken ve geç SV40, retrovirüslerden LTR'ler ve fare metalloprotein I'i içerir. Bir promotör sekansı promotörde transkripsiyonu başlatan RNA polimeraz kodlama sekansını mRNA'ya transkribe ettiği zaman bir kodlama sekansına "faal olarak bağlanır".

Bakterilerde bir polipeptiti eksprese etmek için uygun promotörler E. coli lac veya trp promotörlerini, lacI promotörü, lacZ promotörü, T3 promotörü, T7 promotörü, gpt promotörü, lambda PR promotörü, lambda PL promotörü, 3-fosfogliserat kinaz (PGK) gibi glikolitik enzimleri kodlayan operonlardan promotörleri ve asit fosfataz promotörü içerir. Ökaryotik promotörler CMV, HSV timidin kinazi, kalp şoku promotörlerini ve erken ve geç SV40, retrovirüslerden LTR'ler ve fare metalloprotein I promotörünü içerir. Prokaryotik veya ökaryotik hücrelerde veya bunların virüslerinde genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinen diğer promotörler ayrıca kullanılabilir. Bakterilerde bir polipeptiti veya bunun fragmanını eksprese etmek için uygun promotörler E. coli lac veya trp promotörlerini, lacI promotörü, lacZ promotörü, T3 promotörü, T7 promotörü, gpt promotörü, lambda PR promotörü, lambda PL promotörü, 3-fosfogliserat kinaz (PGK) gibi glikolitik enzimleri kodlayan operonlardan promotörleri ve asit fosfataz

promotörü içerir. Mantar promotörleri Ψ faktör promotörü içerir. Ökaryotik promotörler CMV, HSV timidin kinazi, kalp şoku promotörlerini ve erken ve geç SV40, retrovirüslerden LTR'ler ve fare metalotiyonein I promotörünü içerir. Prokaryotik veya ökaryotik hücrelerde veya bunların virüslerinde genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bilinen diğer promotörler ayrıca kullanılabilir.

Dokuya Özgü Bitki Promotörleri

Buluş dokuya özgü bir şekilde eksprese edilebilen, örn, buluşun bir ksilanazını dokuya özgü bir şekilde eksprese edebilen ekspresyon kasetleri sağlar. Buluş ayrıca buluşun bir ksilanazını dokuya özgü bir şekilde eksprese eden bitkiler veya tohumlar sağlar. Dokuya özgü tohumla özgü, köke özgü, yaprağa özgü, gövdeye özgü, meyveye özgü ve benzerleri olabilir.

CaMV 35S promotörü gibi bir ardışık promotör bitkinin veya tohumun spesifik parçalarında veya bitki boyunca ekspresyon için kullanılabilir. Orneğin fazla ekspresyon için bir nükleik asidin bir bitkinin bazı veya bütün dokularında, örn, bir rejenere bitkinin ekspresyonunu yönlendirecek bir bitki promotörü fragmanı kullanılabilir. Bu promotörler burada "ardışık" promotörler olarak anılmaktadır ve birçok çevresel koşul ve gelişim ve hücre farklılaşması durumu altında aktiftir. Ardışık promotörlere ilişkin örnekler karnıbahar mozaik virüsü (CaMV) 35S transkripsiyon başlatma bölgesini, *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA'sından türetilen 1'- veya 2'- promotörünü ve teknikte uzman kişilerce bilinen çeşitli bitki genlerinden diğer transkripsiyon başlatma bölgelerini içerir. Bu genler örn, ACT11 *Arabidopsis*'ten (Huang (1996) *Plant Mol. Biol.* 33:125-139); Cat3 *Arabidopsis*'ten (GenBank No. U43147, Zhong (1996) *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203); stearyl-asil taşıyıcı proteini desaturaz kodlayan gen *Brassica napus*'tan (Genbank No. X74782, Solocombe (1994) *Plant Physiol.* 104:1167-1176); Gpc1 darıdan (GenBank No. X15596; Martinez (1989) *J. Mol. Biol.* 208:551-565); Gpc2 darıdan (GenBank No. U45855, Manjunath (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:97-112); sayılı patent belgesinde açıklanan bitki promotörlerini içerir.

Buluş virüslerden türetilen dokuya özgü veya ardışık promotörleri kullanmakta olup, bunlar örn, tobamovirüs alt genomik promotör (Kumagai (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1679-1683; piriç tungro bacisiliform virüsü (RTBV), güçlü floeme özgü raportör gen ekspresyonunu tahrik eden kendi promotörü ile sadece enfekte piriç

bitkilerinde floem hücrelerinde ; yaprak mezofil hücrelerinde ve kök uçlarında vasküler elemanlarda en yüksek aktivite ile manyok damar mozaik virüsü (CVMV) promotörü (Verdaguer (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-1139) içerebilir.

Alternatif olarak bitki promotörü spesifik bir doku, organ veya hücre tipinde ksilanaz eksprese eden nükleik asidin ekspresyonunu yönlendirebilir (başka bir deyişle, dokuya özgü promotörler) veya aksi haledede daha kesin çevresel veya gelişimsel kontrol altında veya indüklenebilir bir promotörün kontrolü altında olabilir. Transkripsiyonu etkileyebilen çevresel koşullara ilişkin örnekler anaerobik koşulları, yüksek sıcaklığı, kuraklığı, ışık mevcudiyetini veya kimyasallarla/hormonlarla spreyleneceği içerir.

Orneğin buluş darının kuraklıkla indüklenebilir promotörünü (Busk (1997) yukarıda), patatesin soğuktan, kuraklıktan ve yüksek tuzdan indüklenebilir promotörünü (Kirch (1997) Plant Mol. Biol. 33:897 909) içerir.

Dokuya özgü promotörler sadece gelişimsel aşamaya ilişkin belirli bir zaman aralığında bu doku içinde transkripsiyonu destekleyebilir. Bkz, örn, Blazquez (1998) Plant Cell 10:791-800, Arabidopsis LEAFY gen promotörünü karakterize etmektedir. Bkz, ayrıca Cardon (1997) Plant J 12:367-77, A. thaliana floral meristem kimlik geni AP1'in promotöründe korunmuş bir sekans motifini ayırt eden transkripsiyon faktörü SPL3'ü tanımlamaktadır ve Mandel (1995) Plant Molecular Biology, Vol. 29, pp 995-1004, meristem promotör eIF4'ü açıklamaktadır. Belirli bir dokunun ömrü boyunca aktif olan dokuya özgü promotörler kullanılabilir. Buluşun nükleik asitleri birincil olarak sadece pamuk fiber hücrelerde aktif bir promotöre faal olarak bağlanabilir Veya buluşun nükleik asitleri örn, Rinehart (1996) tarafından açıklandığı gibi pamuk fiber hücre uzamasının aşamaları sırasında birincil olarak aktif bir promotöre faal olarak bağlanır. Nükleik asitler pamuk fiber hücrelerine (Ibid) tercihe bağlı olarak eksprese edilecek FbI2A gen promotörüne faal olarak bağlanabilir. Bkz, ayrıca John (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5769-5773; John, et al., U.S. Patent Nos. 5,608,148 ve 5,602,321, bunlar transjenik pamuk bitkilerinin yapımı için pamuk fibere özgü promotörleri ve yöntemleri açıklar. Köke özgü promotörler ayrıca buluşun nükleik asitlerini eksprese etmek için kullanılabilir. Köke özgü promotörlere ilişkin örnekler alkol dehidrogenaz geninden promotörü içerir (DeLisle (1990) Int. Rev. Cytol. 123:39-60). Buluşun nükleik asitlerini eksprese etmek için kullanılabilen diğer promotörler örn, ovüle özgü, embriyoya özgü, endosperme özgü, zara özgü, tohum kaplamasına özgü promotörleri veya bunların bazı kombinasyonlarını; bir yaprağa özgü promotörü (bkz, örn, darıda

yaprağa özgü bir promotörü açıklayan Busk (1997) Plant J. 11:1285-1295), ORF13 promotörünü (bkz, örn, Hansen (1997) köklerde yüksek aktivite sergiler); bir darı polene özgü promotörü (bkz, örn, Guerrero (1990) Mol. Gen. Genet. 224:161-168); meyve verme, yaşlılık ve yaprakların ve çiçeklerin dökülmesi sırasında daha az aktif olan bir domates promotörü kullanılabilir (bkz, örn, Blume (1997) Plant J. 12:731-746); patates SK2 geninden pistile özgü bir promotör (bkz, örn, Ficker (1997) Plant Mol. Biol. 35:425-431); bunun yabancı genlerin aktif olarak büyüyen zarlarına veya fiberlerine ekspresyonunu hedeflemek için kullanışlı kılan transjenik alfalfanın bitkisel ve floral zar parçalarının epidermal dokusunda aktif olan peadan Blec4 geni; ovüle özgü BEL1 geni (bkz, örn, Reiser (1995) Cell 83:735-742, GenBank No. U39944) ve/veya meristematik dokuda yüksek transkripsiyon seviyeleri sağlayabilen ve/veya hücreleri hızlıca bölebilen bir bitki promotör alanı açıklayan Klee, U.S. Patent No. 5,589,583 sayılı patent belgesindeki promotörü içerir.

Alternatif olarak auksinler gibi bitki hormonlarına maruz kalması üzerine indüklenebilen bitki promotörleri buluşun nükleik asitlerini eksprese etmek için kullanılır. Örneğin buluş soya fasulyesinde oksine cevap veren elemanlar E1 promotör fragmanını (AuxRE'ler) (Liu (1997) Plant Physiol. 115:397-407); oksine cevap veren Arabidopsis GST6 promotörünü (ayrıca salisilik asit ve hidrojen peroksit'e cevap verir) (Chen (1996) Plant J. 10: 955-966); tütünden oksinle indüklenebilen parC promotörü (Sakai (1996) 37:906-913); bir bitki biotin tepki elemanı (Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:933-937) ve stres hormonu abscisik asit'e cevap veren promotörü (Sheen (1996) Science 274:1900-1902) kullanabilir.

Buluşun nükleik asitleri ayrıca bitkilere uygulanabilen herbisitler veya antibiyotikler gibi kimyasal ayıraçlara maruz kalması üzerine indüklenebilen bitki promotörlerine faal olarak bağlanabilir. Örneğin benzensülfonamid kimyasal özellik arttırıcı katkı maddesi tarafından aktive olan herbisit darı In2-2 promotörü kullanılabilir (De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577); farklı herbisit kimyasal özellik arttırıcıların uygulaması kök, hidatot ve filiz apikal meristemde ekspresyon dahil olmak üzere farklı gen ekspresyon paternlerini indükler. Kodlama sekansları ayrıca örn, Avena sativa L. (yulaf) arginin dekarboksilaz geni içeren transjenik tütün bitkileriyle (Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473) veya bir salisilik asit'e tepki veren elemanla (Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324) açıklandığı gibi bir tetrasiklinle indüklenebilen promotörün kontrolü altındadır. Kimyasal olarak - (örn, hormon- veya pestisit-) indüklenen promotörler,

başka bir deyişle alanda transjenik bitkiye uygulanabilen bir kimyasala cevap veren promotör kullanılarak buluşun bir polipeptitinin ekspresyonu bitkinin belirli bir gelişim aşamasında indüklenebilir. Dolayısıyla buluş ayrıca konak aralığı mısır, pirinç, arpa, buğday, patates veya diğer mahsullerle sınırlı olan, mahsulün herhangi bir gelişim aşamasında indüklenebilen buluşun polipeptitlerini kodlayan bir indüklenebilen gen içeren transjenik bitkiler sağlar.

Teknikte uzman bir kişi dokuya özgü bitki promotörünün hedef doku dışındaki dokularda faal olarak bağlı sekansların ekspresyonunu tahrik edebildiğini fark edecektir. Dolayısıyla dokuya özgü bir promotör hedef dokuda veya hücre türünde tercihe bağlı olarak ekspresyonu tahrik eden ancak ayrıca diğer dokularda da ekspresyona neden olabilen biridir.

Buluşun nükleik asitleri ayrıca kimyasal ayıraçlara maruz kalması üzerine indüklenebilen bitki promotörlerine faal olarak bağlanabilir. Bu ayıraçlar örn, herbisitleri, sentetik oksinleri veya örn, transjenik bitkiler üzerine uygulanabilen, örn, spreylenebilen antibiyotikleri içerir. Buluşun ksilanaz üreten nükleik asitlerinin indüklenebilir ekspresyonunun optima ksilanaz ekspresyonu ve/veya aktivitesi olan bitkileri seçmek üzere artmasına olanak sağlanacaktır. Bitki parçalarının gelişimi bu şekilde kontrol edilebilir. Bu şekilde buluş bitkilerin ve bitki parçalarının toplanmasını kolaylaştırmak için araç sağlar. Örneğin çeşitli uygulamalarda benzensülfonamid kimyasal özellik arttırıcı katkı maddesi tarafından aktive olan herbisit darı In2-2 promotörü kullanılır (De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577); farklı herbisit kimyasal özellik arttırıcıların uygulaması kök, hidatot ve filiz apikal meristemde ekspresyon dahil olmak üzere farklı gen ekspresyon paternlerini indükler. Buluşun kodlama sekansları ayrıca örn, Avena sativa L. (yulaf) arginin dekarboksilaz geni içeren transjenik tütün bitkileriyle (Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473) veya bir salisilik aside tepki veren elemanla (Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324) açıklandığı gibi bir tetrasiklinle indüklenebilen promotörün kontrolü altındadır,

Bazı yönlerde uygun polipeptit ekspresyonu kodlama alanının 3' ucunda poliadenilasyon bölgesi gerektirebilir. Poliadenilasyon bölgesi doğal genden, çeşitli başka bitki (veya hayvan veya diğer) genlerden veya Agrobacterial T-DNA'sındaki genlerden türetilebilir.

“Bitki” terimi (örn, bu buluşun bir transjenik bitkisinde veya bitki tohumunda veya buluşun bir vektöründe kullanılan bitki promotöründeki gibi) tam bitkileri, bitki parçalarını (örn, yapraklar, kökler, çiçekler, gövdeler, vs.), bitki protoplastlarını, tohumları ve bitki hücrelerini ve bunların soyunu içerir; bu buluşu (bileşimler ve yöntemler dahil) uygulama için kullanılabilen bitki sınıfları yüksek bitki sınıfı kadar geniş olabilir, anjiyospermiler (monokotiledonoz ve dikotiledonoz bitkiler) aynı zamanda gimnospermiler dahil olmak üzere transformasyon tekniklerine duyarlı bitkileri içerir; ayrıca poliploid, diploid, haploid ve hemizigot durumlar dahil çeşitli ploidi seviyelerindeki bitkileri içerir. Burada kullanıldığı şekliyle “transjenik bitki” bir heterolog nükleik asit sekansının, örn, buluşun nükleik asitlerinin ve çeşitli rekombinant yapılarının eklenmiş olduğu bitkileri veya bitki hücrelerini içerir. Buluşun transjenik bitkileri ayrıca aşağıda ele alınmıştır.

Ekspresyon vektörleri ve klonlama araçları

Buluş buluşun nükleik asitlerini, örn, buluşun ksilanazlarını kodlayan sekansları içeren ekspresyon vektörleri ve klonlama araçları sağlar. Buluşun ekspresyon vektörleri ve klonlama araçları viral parçacıklar, bakulovirüs, faj, plazmidler, fajemidler, kozmidler, fosmidler, bakteriyel yapak kromozomlar, viral DNA (örn, adenovirüs, hindi frengi virüsü, psödorabiler ve SV40 türevleri), P1 tabanlı yapay kromozomlar, maya plazmidleri, maya yapay kromozomları ve ilgili spesifik konağa özgü başka herhangi bir vektörü (basilus, Aspergillus ve maya gibi) içerebilir. Buluşun vektörleri kromozomal, kromozomal olmayan ve sentetik DNA sekanslarını içerebilir. Çok sayıda uygun vektör teknikte uzman kişiler tarafından bilinmektedir ve ticari olarak bulunabilir. Örnek vektörler: pQE vektörleri (Qiagen), pBluescript plazmidleri, pNH vektörleri, (lambda-ZAP vektörleri (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Okaryotik: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia) içerir. Ancak kopyalayabildiği ve konak hücrede yaşayabildiği müddetçe başka herhangi bir plazmid veya vektör kullanılabilir. Düşük kopya sayılı veya yüksek kopya sayılı vektörler mevcut buluşla kullanılabilir.

Ekspresyon vektörü bir promotör, translasyon başlatma ve transkripsiyon sonlandırma için bir ribozom bağlama alanı içerir. Vektör ayrıca ekspresyonu amplifiye etmek için uygun sekanslar içerir. Memeli ekspresyon vektörleri bir replikasyon orijini, gerekli herhangi bir ribozom bağlama alanı, bir poliadenilasyon alanı, uç birleştirme donörü ve kabul edici alanları, transkripsiyonel sonlandırma sekansları ve 5' bitişik transkribe

edilmemiş sekansları içerebilir. Bazı yönlerde, SV40 uç birleştirme ve poliadenilasyon alanlarından türetilen DNA sekansları gerekli transkribe edilmemiş genetik elemanları sağlamak için kullanılabilir.

5 Bir yönde ekspresyon vektörleri vektör içeren konak hücrelerin seçimine izin vermek için bir veya daha fazla seçilebilir markör gen içerir. Uygun seçilebilir markörler dihidrofolat redüktazı kodlayan genleri veya ökaryotik hücre kültürü için neomisin direnci sunan genleri, E. coli'de tetrasiklin veya ampisilin direnci sunan genleri ve S. cerevisiae TRP1 genini içerir. Promotör bölgeleri kloramfenikol transferaz (CAT) vektörleri veya seçilebilen markörleri olan diğer vektörler kullanılarak istenen herhangi bir genden seçilebilir.

10 Ökaryotik hücrelerde polipeptiti veya bunun fragmanlarını eksprese etmek için vektörler ayrıca ekspresyon seviyelerini arttırmak için arttırıcılar içerebilir. Arttırıcılar DNA'nın kendi transkripsiyonunu arttırmak için bir promotörü etkileyen uzunlukça genel olarak yaklaşık 10 ila yaklaşık 300 bp cis-etkili elemanlarıdır. Örnekler replikasyon orijini 100 ila 270 bp alan üzerinde SV40 arttırıcı, sitomegalovirüs erken promotör arttırıcı, replikasyon orijini gecikmiş bölgesinde polioma arttırıcı ve adenovirüs arttırıcıları içerir.

20 Bir nükleik asit sekansı çeşitli prosedürler vasıtasıyla bir vektör içine yerleştirilebilir. Genel olarak sekans ekin ve vektörün doğru kısıtlama endonükleazlarla parçalanmasını takiben vektörde istenen pozisyona ligatlanır. Alternatif olarak hem ek hem de vektördeki kör uçlar ligatlanabilir. Çeşitli klonlama teknikleri teknikte bilinmektedir, örn, Ausubel ve Sambrook'ta açıklandığı gibi. Bu prosedürler ve diğerlerinin teknikte uzman kişilerin kapsamında olacağı düşünülmektedir.

25 Vektör bir plazmid, bir viral parçacık veya bir faj formunda olabilir. Diğer vektörler kromozomal, kromozomal olmayan ve sentetik DNA sekanslarını, SV40 türevlerini, bakteriyel plazmidleri, faj DNA'yı, bakulovirüsü, maya plazmidlerini, plazmidlerin ve faj DNA'nın kombinasyonlarından türetilen vektörleri, adenovirüs, hindi frengi virüsünü ve psödoarabiler gibi viral DNA'yı içerir. Prökaryotik ve ökaryotik konaklarla kullanım için çeşitli klonlama ve ekspresyon vektörleri Sambrook tarafından açıklanmıştır.

30 Kullanılabilen özel bakteriyel vektörler ticari olarak bulunabilen plazmidleri içermekte olup, bunlar iyi bilinen klonlama vektörü pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)

pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, DR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 ve pCM7'nin genetik elemanlarını içerir. Özel ökaryotik hücreler pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG ve pSVL (Pharmacia) içerir. Ancak kopyalabildiği ve konak hücrede yaşayabildiği müddetçe başka herhangi bir vektör kullanılabilir.

Buluşun nükleik asitleri ekspresyon kasetlerinde, vektörlerde veya virüslerde eksprese edilebilir ve bitki hücrelerinde ve tohumlarında geçici veya stabil olarak eksprese edilir. Örnek niteliğinde bir geçici ekspresyon sistemi epizomal ekspresyon sistemlerini, örn, süper sarılmış DNA içeren bir epizomal mini-kromozomun transkripsiyonu vasıtasıyla nükleusta üretilen karnıbahar mozaik virüsü (CaMV) viral RNA'sını kullanır, bkz, örn, Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637. Alternatif olarak kodlama sekansları, başka bir deyişle buluşun sekanslarının tamamı veya alt fragmanları konak kromozomal DNA'nın bütünleşik bir parçası haline gelen bir bitki konak hücre genomuna eklenebilir. Sens ve antisens transkriptleri bu şekilde eksprese edilebilir. Buluşun nükleik asitlerinden sekansları (örn, promotörleri veya kodlama alanlarını) içeren bir vektör bir bitki hücresi veya bir tohum üzerinde seçilebilir bir fenotip sağlayan bir markör gen içerebilir. Örneğin markör biyosit direncini, özel olarak antibiyotik direncini örneğin kanamisin, G418, bleomisin, higromisin direncini veya klorosülfuron veya Basta direnci gibi herbisit direncini kodlayabilir.

Bitkilerde nükleik asitleri ve proteinleri eksprese edebilen ekspresyon vektörleri teknikte iyi bilinmektedir ve örn, *Agrobacterium* spp.'den vektörler, patates virüsü X (bkz, örn, Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3684), tütün mozaik virüsü (bkz, örn, Casper (1996) Gene 173:69-73), domates çalı büyüme virüsü (bkz, örn, Hillman (1989) Virology 169:42-50), tütün oyma virüsü (bkz, örn, Dolja (1997) Virology 234:243-252), fasulye altın mozaik virüsü (bkz, örn, Morinaga (1993) Microbiol Immunol. 37:471-476), karnıbahar mozaik virüsü (bkz, örn, Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:1094-1101), darı Ac/Ds değiştirilebilir elemanı (bkz, örn, Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194) ve darı baskılayıcı mutator (Spm) değiştirilebilir eleman (bkz, örn, Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725) ve bunların türevlerini içerir.

Ekspresyon vektörü bunun iki organizmada, örneğin memeli veya böcek hücrelerinde ekspresyon için ve bir prokaryotik hücrede klonlama ve amplifikasyon için korunmasına

olanak sağlamak üzere iki replikasyon sistemine sahip olabilir. Bunun ötesinde ekspresyon vektörlerini entegre etme için ekspresyon vektörü konak hücre genomuyla homolog en az bir sekans içerebilir. Ekspresyon yapısını destekleyen iki homolog sekans içerebilir. Entegre etme vektörü vektörde inklüzyon için uygun homolog sekansın seçilmesi vasıtasıyla konak hücrede spesifik bir lokusa yönlendirilebilir. Entegre etme vektörlerine yönelik yapılar teknikte iyi bilinmektedir.

Buluşun ekspresyon vektörleri ayrıca transforme edilmiş bakteriyel suşların seçimine olanak sağlamak için seçilebilir bir gen, örn, amfisilin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, neomisin ve tetrasiklin gibi ilaçlara karşı bakteri direnci uygulayan genleri içerir. Seçilebilir markörler ayrıca histidin, triptofan ve lösin biyosentetik yollarındaki gibi biyosentetik genleri içerebilir.

Ekspresyon vektöründeki DNA sekansı RNA sentezini yönlendirmek için uygun bir ekspresyon kontrol sekansına (sekanslarına) (promotör) faal olarak bağlanır. Özel adlandırılmış bakteriyel promotörler lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L ve trp içerir. Okaryotik promotörler CMX, HSV timidin kinaz, erken ve geç SV40, retrovirüs'ten LTR'ler ve fare metallothionein-I'i içerir. Uygun vektör ve promotör seçimi teknikte sıradan uzmanlık seviyesi içindedir. Ekspresyon vektörü ayrıca translasyon başlatma ve transkripsiyon sonlandırma için bir ribozom bağlama alanı içerir. Vektör ayrıca ekspresyonu amplifiye etmek için uygun sekanslar içerir. Promotör bölgeleri kloramfenikol transferaz (CAT) vektörleri veya seçilebilen markörleri olan diğer vektörler kullanılarak istenen herhangi bir genden seçilebilir. Ek olarak ekspresyon vektörleri tercih edilen şekliyle dihidrofolat redüktaz gibi transforme edilen konak hücrelerin seçimi için bir fenotipik özellik veya E. coli'de ökaryotik hücre kültürü veya tetrasilin veya ampisilin direnci sağlamak için bir veya daha fazla seçilebilir markör gen içerebilir.

Memeli ekspresyon vektörleri ayrıca bir replikasyon orijini, gerekli herhangi bir ribozom bağlama alanı, bir poliadenilasyon alanı, uç birleştirme donörü ve kabul edici alanları, transkripsiyonel sonlandırma sekansları ve 5' bitişik transkribe edilmemiş sekansları içerebilir. SV40 uç birleştirme ve poliadenilasyon alanlarından türetilen DNA sekansları gerekli transkribe edilmemiş genetik elemanları sağlamak için kullanılabilir.

Okaryotik hücrelerde polipeptiti veya bunun fragmanlarını eksprese etmek için vektörler ayrıca ekspresyon seviyelerini arttırmak için arttırıcılar içerebilir. Arttırıcılar

DNA'nın kendi transkripsiyonunu arttırmak için bir promotörü etkileyen uzunlukça genel olarak yaklaşık 10 ila yaklaşık 300 bp cis-etkili elemanlarıdır. Örnekler replikasyon orijini 100 ila 270 bp alan üzerinde SV40 arttırıcı, sitomegalovirüs erken promotör arttırıcı, replikasyon orijini gecikmiş bölgesinde polioma arttırıcı ve adenovirüs arttırıcıları içerir.

Ek olarak ekspresyon vektörleri tipik olarak vektör içeren konak hücrelerin seçimine izin vermek için bir veya daha fazla seçilebilir markör gen içerir. Uygun seçilebilir markörler dihidrofolat redüktazı kodlayan genleri veya ökaryotik hücre kültürü için neomisin direnci sunan genleri, E. coli'de tetrasiklin veya ampisilin direnci sunan genleri ve S. cerevisiae TRP1 genini içerir.

Bazı yönlerde buluşun polipeptitlerinin birini kodlayan nükleik asit ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya bunun en az yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asidini içeren fragmanları çevrilen polipeptitin veya bunun fragmanının sekresyonunu yönlendirebilen bir lider sekansla uygun fazda düzenlenir. Nükleik asit bir füzyon polipeptitini kodlayabilmekte olup, burada buluşun polipeptitlerinin biri ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya bunun en az yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asidini içeren fragmanları artan stabilite veya basitleştirilmiş saflaştırma gibi istenen özellikleri sağlayan N-terminal tanımlama peptitleri gibi heterolog peptitlere veya polipeptitlere kaynaşır.

Uygun DNA sekansı çeşitli prosedürler tarafından vektör içine yerleştirilebilir. Genel olarak DNA sekansı ekin ve vektörün doğru kısıtlama endonükleazlarla parçalanmasını takiben vektörde istenen pozisyona ligatlanır. Alternatif olarak hem ek hem de vektördeki kör uçlar ligatlanabilir. Çeşitli klonlama teknikleri Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 ve Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989 yayınlarında açıklanmaktadır. Bu prosedürler ve diğerlerinin teknikte uzman kişilerin kapsamında olacağı düşünülmektedir.

Vektör örneğin bir plazmid, bir viral parçacık veya bir faj formunda olabilir. Diğer vektörler kromozomal, kromozomal olmayan ve sentetik DNA sekanslarını, SV40 türevlerini, bakteriyel plazmidleri, faj DNA'yı, bakulovirüsü, maya plazmidlerini, plazmidlerin ve faj DNA'nın kombinasyonlarından türetilen vektörleri, adenovirüs, hindi

frenji virüsünü ve psödoarabiler gibi viral DNA'yı içerir. Prökaryotik ve ökaryotik konaklarla kullanım için çeşitli klonlama ve ekspresyon vektörleri Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) tarafından açıklanmıştır.

5 Konak hücreler ve transforme edilen hücreler

Buluş ayrıca buluşun bir nükleik asit sekansını, örn, buluşun bir ksilanazını kodlayan bir sekansı veya buluşun bir vektörünü içeren transforme edilmiş hücreler sağlar. Konak hücre tekniğinde uzman kişilerin aşına olduğu konak hücrelerin herhangi biri olabilmekte olup, prokaryotik hücreleri, bakteri hücreleri, mantar hücreleri, maya hücreleri, memeli hücreleri, böcek hücreleri ve/veya bitki hücreleri gibi ökaryotik hücreleri içerir. Örnek bakteriyel hücreler E. coli, Streptomyces, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium Pseudomonas, Streptomyces, ve Staphylococcus takımları içindeki çeşitli türleri içerir. Örnek böcek hücreleri Drosophila S2 ve Spodoptera Sf9 içerir. Örnek hayvan hücreleri CHO, COS veya Bowes melanom veya herhangi bir fare veya insan hücre hattını içerir. Uygun bir konağın seçimi tekniğinde uzman kişilerin yetenekleri dahilindedir. Çok çeşitli yüksek bitki türlerini transforme etmeye yönelik teknikler iyi bilinmektedir ve teknik ve bilimsel literatürde açıklanmaktadır. Bkz, örn, Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477; U.S. 5,750,870 sayılı patent belgesi.

Vektör konak hücrelere çeşitli teknikler kullanılarak dahil edilebilmekte olup, bunlar transformasyonu, transfeksiyonu, transdüksiyonu, viral enfeksiyonu, gen silahlarını veya Ti aracılıklı gen transferini içerir. Özel yöntemler kalsiyum fosfat transfeksiyonunu, DEAE-Dekstran aracılıklı transfeksiyonu, lipofeksiyonu veya elektroporasyonu içerir (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

Bir yönde buluşun nükleik asitleri veya vektörleri tarama için hücrelere yerleştirilir, dolayısıyla nükleik asitler nükleik asidin sonraki ekspresyonu için uygun bir şekilde hücrelere girer. Yerleştirme yöntemi büyük ölçüde hedeflenen hücre tipi tarafından dikte edilir. Örnek yöntemler CaPO₄ çöktelmeyi, lipozom füzyonunu, lipofeksiyonu (örn, LIPOFECTIN™), elektroporasyonu, viral enfeksiyonu, vs. içerir. Aday nükleik asitler konak hücrenin genomuna (örneğin retroviral yerleştirme) stabil şekilde entegre olabilir veya sitoplazmada geçici veya stabil olarak mevcut olabilir (başka bir deyişle,

geleneksel plazmidlerin kullanımı aracılığıyla, standart regülatör sekanslar, seçim markörleri, vs. kullanılarak). Farmasötik olarak önemli birçok tarama insan veya model memeli hücre hedefleri gerektirir, bu hedefleri transfekte edebilen retroviral vektörleri kullanılabilir.

- 5 Uygun olduğunda üretilen konak hücreler promotörleri aktive etmek, transformantları seçmek ve buluşun genlerini amplifiye etmek için uygun şekilde modifiye edilen geleneksel besinde kültürlenebilir. Uygun bir konak suşunun transformasyonunu ve konak suşunun uygun bir hücre yoğunluğuna büyümesini takiben seçilen promotör uygun araçlar (örn, sıcaklık değiştirme veya kimyasal indüksiyon) aracılığıyla
- 10 indüklenebilir ve hücreler bunların istenen polipeptitini veya bunun fragmanını üretmesine olanak sağlamak için ilave bir periyot boyunca kültürlenebilir.

Hücreler santrifüj vasıtasıyla toplanabilir, fiziksel veya kimyasal araçlar vasıtasıyla bozulabilir ve meydana gelen ham ekstrakt ayrıca saflaştırma için korunur. Proteinlerin ekspresyonu için kullanılan mikrobiyal hücreler dondurma-çözme döngüsü,

15 sonikasyon, mekanik bozma veya hücre parçalama ajanlarının kullanımını dahil olmak üzere güvenli herhangi bir yöntem aracılığıyla bozulabilir. Bu yöntemler teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir. Eksprese edilen polipeptit veya bunun fragmanı amonyum sülfat veya etanol çökeltme, asit ekstraksiyonu, anyon veya katyon değişim kromatografisi, fosfoşelüloz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, afinite

20 kromatografisi, hidrosilapatit kromatografisi ve lektin kromatografisi dahil olmak üzere yöntemler vasıtasıyla rekombinant hücre kültürlerinden geri kazanılabilir ve saflaştırılabilir. Protein yeniden katlama yöntemler gerekli olduğunda polipeptitin konfigürasyonunu tamamlamakta kullanılabilir. Eğer istenirse yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) son saflaştırma adımı için kullanılabilir.

- 25 Konak hücrelerdeki yapılar rekombinant sekans tarafından kodlanan gen ürününü üretmek için geleneksel bir şekilde kullanılabilir. Bir rekombinant üretim prosedüründe kullanılan konağa bağlı olarak vektörü içeren konak hücreler tarafından üretilen polipeptitler glikosilatlanabilir veya glikosilatlanmayabilir. Buluşun polipeptitleri ayrıca bir başlangıç metiyonin amino asit kalıntısı içerebilir veya içermeyebilir.

- 30 Hücresiz translasyon sistemleri buluşun bir polipeptitini üretmek için kullanılabilir. Hücresiz translasyon sistemleri polipeptiti kodlayan bir nükleik aside veya bunun bir fragmanına faal olarak bağlanan bir promotör içeren bir DNA yapısından transkribe

edilen mRNA'ları kullanabilir. Bazı yönlerde DNA yapısı bir in vitro transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesinden önce lineer hale getirilebilir. Transkribe edilen mRNA daha sonra istenen polipeptiti veya bunun fragmanını üretmek için bir tavşan retikulosit ekstraktı gibi uygun bir hücresiz translasyon ekstraktı ile inkübe edilir.

5 Ekspresyon vektörleri dihidrofolat redüktaz gibi transforme edilen konak hücrelerin seçimi için bir fenotipik özellik veya *E. coli*'de ökaryotik hücre kültürü veya tetrasilin veya ampisilin direnci sağlamak için bir veya daha fazla seçilebilir markör gen içerebilir. İlgili polinükleotitleri, örn, buluşun nükleik asitlerini içeren konak hücreler promotörleri aktive etmek, transformantları seçmek veya genleri amplifiye etmek için uygun şekilde

10 modifiye edilen geleneksel besin ortamında kültürlenebilir. Sıcaklık, pH ve benzerleri gibi kültür koşulları ekspresyon için seçilen konakla önceden kullanılanlardır ve teknikte uzman kişi için açık olacaktır. Belirtilmiş enzim aktivitesine sahip olarak tanımlanan klonlar daha sonra gelişmiş ativiteye sahip olan bir enzimi kodlayan polinükleotit sekansını tanımlamak için sekanslanabilir.

15 Bir hücrede bir rekombinant ksilanazın fazla ekspresyonuna yönelik bir yöntem buluşun bir nükleik asidini veya buluşun bir nükleik asidi için zorlayıcı koşullar altında hibritlenen bir nükleik asidi veya bunun bir alt sekansını içeren bir vektörün eksprese edilmesini içermektedir. Fazla ekspresyon herhangi bir araç, örn, yüksek aktiviteli bir promotörün, bir disistronik vektörün kullanımı vasıtasıyla veya vektörün gen

20 amplifikasyonu aracılığıyla gerçekleştirilebilir.

Buluşun nükleik asitleri herhangi bir in vitro veya in vivo ekspresyon sisteminde eksprese edilebilir veya fazla eksprese edilebilir. Herhangi bir hücre kültürü sistemi bakteriyel, maya, böcek, mantar veya memeli kültürleri dahil olmak üzere rekombinant proteini eksprese etmek veya fazla eksprese etmek için kullanılabilir. Fazla ekspresyon

25 uygun promotörlerin, arttırıcıların, vektörlerin (örn, replikon vektörlerin, disistronik vektörlerin (bkz, örn, Gurtu (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:295-8), ortamın, kültür sistemlerinin ve benzerlerinin seçimi ile gerçekleştirilebilir. Bir yönde hücre sistemlerinde seçim markörlerini, örn, glutamin sintetazı (bkz, örn, Sanders (1987) *Dev. Biol. Stand.* 66:55-63) kullanan gen amplifikasyonu buluşun polipeptitlerini

30 fazla eksprese etmek için kullanılır.

Bu yaklaşımla ilişkili ilave detaylar genel literatürde bulunmaktadır ve/veya uzman kişilerce bilinmektedir. Özellikle kısıtlayıcı olmayan bir örnekte bu kamusal olarak

bulunabilen literatür EP 0659215 (WO 9403612 A1) (Nevalainen et al.); Lapidot, A., Mechaly, A., Shoham, Y., "Overexpression and single-step purification of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6," *J. Biotechnol.* Nov 51:259-64 (1996); Lüthi, E., Jasmat, N.B., Bergquist, P.L., "Xylanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*: overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product," *Appl. Environ. Microbiol.* Sep 56:2677-83 (1990); and Sung, W.L., Luk, C.K., Zahab, D.M., Wakarchuk, W., "Overexpression of the *Bacillus subtilis* and *circulans* xylanases in *Escherichia coli*," *Protein Expr. Purif.* Jun 4:200-6 (1993) yayınlarını içermektedir, ancak bu referanslar yeni uygulamanın buluş niteliğindeki enzimlerini öğretmemektedir.

Konak hücre teknikte uzman kişilerin aşına olduğu konak hücrelerin herhangi biri olabilmekte olup, prokaryotik hücreleri, ökaryotik hücreleri, memeli hücrelerini, böcek hücrelerini veya bitki hücrelerini içerir. Uygun konaklara ilişkin temsili örnekler olarak şunlardan bahsedilebilir: *Psödomonas*, *Streptomis* ve *Stafilokok* takımları içindeki *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ve çeşitli türler gibi bakteri hücreleri, maya gibi mantar hücreleri, *Drosophila S2* ve *Spodoptera Sf9*, gibi böcek hücreleri, CHO, COS veya Bowes melanom ve adenovirüsler gibi hayvan hücreleri. Uygun bir konağın seçimi teknikte uzman kişilerin yetenekleri dahilindedir.

Vektör konak hücrelere çeşitli teknikler kullanılarak dahil edilebilmekte olup, bunlar transformasyonu, transfeksiyonu, transdüksiyonu, viral enfeksiyonu, gen silahlarını veya Ti aracılıklı gen transferini içerir. Özel yöntemler kalsiyum fosfat transfeksiyonunu, DEAE-Dekstran aracılıklı transfeksiyonu, lipofeksiyonu veya elektroporasyonu içerir (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)).

Uygun olduğunda üretilen konak hücreler promotörleri aktive etmek, transformantları seçmek ve buluşun genlerini amplifiye etmek için uygun şekilde modifiye edilen geleneksel besinde kültürlenebilir. Uygun bir konak suşunun transformasyonunu ve konak suşunun uygun bir hücre yoğunluğuna büyümesini takiben seçilen promotör uygun araçlar (örn, sıcaklık değiştirme veya kimyasal indüksiyon) aracılığıyla indüklenebilir ve hücreler bunların istenen polipeptidini veya bunun fragmanını üretmesine olanak sağlamak için ilave bir periyot boyunca kültürlenebilir.

Hücreler tipik olarak santrifüj vasıtasıyla toplanabilir, fiziksel veya kimyasal araçlar vasıtasıyla bozulabilir ve meydana gelen ham ekstrakt ayrıca saflaştırma için korunur. Proteinlerin ekspresyonu için kullanılan mikrobiyal hücreler dondurma-çözme döngüsü, sonikasyon, mekanik bozma veya hücre parçalama ajanlarının kullanımını dahil olmak üzere güvenli herhangi bir yöntem aracılığıyla bozulabilir. Bu yöntemler teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir. Eksprese edilen polipeptit veya bunun fragmanı amonyum sülfat veya etanol çökeltme, asit ekstraksiyonu, anyon veya katyon değişim kromatografisi, fosfoelüloz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, afinite kromatografisi, hidroksilapatit kromatografisi ve lektin kromatografisi dahil olmak üzere yöntemler vasıtasıyla rekombinant hücre kültürlerinden geri kazanılabilir ve saflaştırılabilir. Protein yeniden katlama yöntemleri gerekli olduğunda polipeptitin konfigürasyonunu tamamlamakta kullanılabilir. Eğer istenirse yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) son saflaştırma adımı için kullanılabilir.

Çeşitli memeli hücre kültürü sistemleri ayrıca rekombinant proteini eksprese etmek için kullanılabilir. Memeli ekspresyon sistemlerine ilişkin örnekler maymun böbrek fibroblastlarının COS-7 hatlarını (Gluzman, Cell, 23:175, 1981 yayınında açıklanmaktadır) ve C127, 3T3, CHO, HeLa ve BHK hücre hatları gibi uyumlu bir vektörden proteinleri eksprese edebilen diğer hücre hatlarını içermektedir.

Konak hücrelerdeki yapılar rekombinant sekans tarafından kodlanan gen ürününü üretmek için geleneksel bir şekilde kullanılabilir. Bir rekombinant üretim prosedüründe kullanılan konağa bağlı olarak vektörü içeren konak hücreler tarafından üretilen polipeptitler glikosilatlanabilir veya glikosilatlanmayabilir. Buluşun polipeptitleri ayrıca bir başlangıç metiyonin amino asit kalıntısı içerebilir veya içermeyebilir.

Alternatif olarak buluşun amino asit sekanslarının polipeptitleri veya bunun en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asit içeren fragmanları geleneksel peptid sentezleyiciler aracılığıyla sentetik olarak üretilebilir. Polipeptitlerin fragmanları veya bölümleri peptid sentezi vasıtasıyla karşılık gelen tam uzunluklu polipeptiti üretmek için kullanılabilir, fragmanlar tam uzunluklu polipeptitleri üretmek için ara ürünler olarak kullanılabilir.

Hücresiz translasyon sistemleri ayrıca buluşun amino asit sekanslarının polipeptitlerinin birini veya bunun en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya

150 ardışık amino asit içeren fragmanlarını polipeptiti veya bunun bir fragmanını kodlayan bir nükleik aside faal olarak bağlı bir promotör içeren bir DNA yapısından transkribe edilen mRNA'lar kullanılarak üretmek için kullanılabilir. DNA yapısı bir in vitro transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesinden önce linear hale getirilebilir.

- 5 Transkribe edilen mRNA daha sonra istenen polipeptiti veya bunun fragmanını üretmek için bir tavşan retikulosit ekstraktı gibi uygun bir hücresiz translasyon ekstraktı ile inkübe edilir.

Nükleik Asitlerin Amplifikasyonu

10 Buluşun uygulanmasında buluşun nükleik asitleri ve buluşun ksilanazlarını kodlayan nükleik asitler veya buluşun modifiye edilmiş nükleik asitleri amplifikasyon vasıtasıyla yeniden üretilebilir. Amplifikasyon ayrıca buluşun nükleik asitlerini klonlamak veya modifiye etmek için kullanılabilir. Teknikte uzman kişi bu sekansların herhangi bir kısmı veya tam uzunluğu için amplifikasyon primer sekans çiftleri tasarlayabilir.

15 Bir nükleik asit buluşun bir nükleik asidinin yaklaşık ilk (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 veya 25 kalıntısı ve tamamlayıcı sarmalın yaklaşık ilk (5') 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 veya 25 kalıntısı ile belirtildiği gibi bir primer çifti vasıtasıyla amplifiye edilebilir.

20 Bir amplifikasyon primer sekans çiftinin bir veya her bir elemanı sekansın en az yaklaşık 10 ila 50 ardışık bazını veya sekansın yaklaşık 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 veya 25 ardışık bazını içeren bir oligonükleotit içerebilir. Amplifikasyon primer çiftleri buluşun bir nükleik asidinin ilk (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 veya 25 kalıntısı aracılığıyla belirtilen bir sekansa sahip olan bir birinci eleman ve birinci elemanın tamamlayıcı sarmalının yaklaşık (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 veya 25 kalıntısı aracılığıyla belirtilen bir sekansa 25 sahip olan bir ikinci eleman içerebilir.

Amplifikasyon reaksiyonları ayrıca bir örnekteki nükleik asit miktarını ölçmek (bir hücre örneğindeki mesajın miktarı gibi), nükleik asidi etiketlemek (örn, bunu bir dizi veya bir blota uygulamak için), nükleik asidi tespit etmek veya bir örnekteki spesifik bir nükleik asidin miktarını ölçmek için kullanılabilir. Bir hücre veya bir cDNA kütüphanesinden 30 izole edilen mesaj amplifiye edilebilir.

Uzman kişi uygun oligonükleotit amplifikasyon primerlerini seçebilir ve tasarlayabilir. Amplifikasyon yöntemleri teknikte iyi bilinmektedir ve örn, polimeraz zincir

reaksiyonunu, PCR (bkz, örn, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, baskı Innis, Academic Press, N.Y. (1990) ve PCR STRATEGIES (1995), baskı Innis, Academic Press, Inc., N.Y., ligaz zincir reaksiyonunu (LCR) (bkz, örn, Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117); transkripsiyon amplifikasyonunu (bkz, örn., Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173); ve kendi kendine gerçekleşen sekans replikasyonunu (bkz, örn, Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); Q Beta replikaz amplifikasyonunu (bkz, örn., Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), otomatik Q-beta replikaz amplifikasyonu analizini (bkz, örn, Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271) ve diğer RNA polimeraz aracılı teknikleri (örn., NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); bkz, ayrıca Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564) içerir.

Sekans özdeşliği derecesinin belirlenmesi

Burada en az yaklaşık 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550 veya daha fazla kalıntılı bir bölge üzerinden buluşun örnek bir amino asidi (yukarıda açıklandığı şekliyle) ile en az yaklaşık % 50, % 51, % 52, % 53, % 54, % 55, % 56, % 57, % 58, % 59, % 60, % 61, % 62, % 63, % 64, % 65, % 66, % 67, % 68, % 69, % 70, % 71, % 72, % 73, % 74, % 75, % 76, % 77, % 78, % 79, % 80, % 81, % 82, % 83, % 84, % 85, % 86, % 87, % 88, % 89, % 90, % 91, % 92, % 93, % 94, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 veya daha fazla veya tam (% 100) sekans özdeşliğine sahip olan sekansları içeren nükleik asitler açıklanmaktadır. Burada buluşun örnek bir amino asidi ile en az yaklaşık % 50, % 51, % 52, % 53, % 54, % 55, % 56, % 57, % 58, % 59, % 60, % 61, % 62, % 63, % 64, % 65, % 66, % 67, % 68, % 69, % 70, % 71, % 72, % 73, % 74, % 75, % 76, % 77, % 78, % 79, % 80, % 81, % 82, % 83, % 84, % 85, % 86, % 87, % 88, % 89, % 90, % 91, % 92, % 93, % 94, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 veya daha fazla veya tam (% 100) sekans özdeşliğine sahip olan sekansları içeren polipeptitler açıklanmaktadır. Sekans özdeşliğinin kapsamı (homoloji) burada açıklananlar dahil olmak üzere varsayılan parametrelere sahip BLAST 2.2.2. veya FASTA sürüm 3.0t78 gibi herhangi bir bilgisayar programı ve ilişkili parametreler kullanılarak belirlenebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle “bilgisayar”, “bilgisayar programı” ve “işlemci” terimleri en geniş genel kapsamlarında kullanılmaktadır ve aşağıda detaylı şekilde açıklanan bu tür cihazların tümüne dahil edilmektedir. Belirli bir polipeptitin veya proteinin “bir kodlama sekansı” veya bir bunu “kodlayan sekans” uygun regülatör sekansların kontrolü altında yerleştirildiği zaman bir polipeptite veya proteine kopyalanan veya çevrilen bir nükleik asit sekansıdır.

İki nükleik asit veya polipeptit kapsamında “büyük ölçüde özdeş” ifadesi maksimum karşılığa yönelik karşılaştırıldığında ve hizalandığında bilinen sekans karşılaştırma algoritmalarının biri kullanılarak veya görsel inceleme vasıtasıyla ölçüldüğü şekliyle en az yaklaşık % 50, % 51, % 52, % 53, % 54, % 55, % 56, % 57, % 58, % 59, % 60, % 61, % 62, % 63, % 64, % 65, % 66, % 67, % 68, % 69, % 70, % 71, % 72, % 73, % 74, % 75, % 76, % 77, % 78, % 79, % 80, % 81, % 82, % 83, % 84, % 85, % 86, % 87, % 88, % 89, % 90, % 91, % 92, % 93, % 94, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 veya daha fazla nükleotit veya amino asit (sekans) özdeşliğine işaret etmektedir. Tipik olarak azımsanmayacak özdeşlik en az yaklaşık 100 kalıntılı bir bölge üzerinde mevcuttur ve en yaygın şekliyle sekanslar en az yaklaşık 150-200 kalıntı üzerinden büyük ölçüde özdeştir. Sekanslar kodlama bölgelerinin tam uzunluğu üzerinden büyük ölçüde özdeş olabilir.

Ek olarak “büyük ölçüde özdeş” bir amino asit özellikle bu tür bir ornatım molekülün aktif alanı olmayan bir alanında meydana geldiği zaman ve polipeptitin esasen kendi fonksiyonel özelliklerini koruması koşuluyla bir referans sekansından bir veya daha fazla konservatif veya konservatif olmayan amino asit ornatımları, çıkarmaları veya eklemeleri ile farklılık gösteren bir sekanstir. Bir konservatif amino asit ornatımı örneğin aynı sınıftan bir amino asidi başka biri için ornatmaktadır (örn, izolösin, valin, lösin veya metyonin gibi bir hidrofobik amino asidin başka biri için ornatımı veya argininin lizin için, glutamik asidin aspartik asit veya glutaminin asparjin için ornatımı gibi bir polar amino asidin diğeri için ornatımı). Bir veya daha fazla amino asit örneğin bir ksilanaz polipeptitinden silinebilmekte olup, bu da kendi biyolojik aktivitesi dikkate değer şekilde değişmeden polipeptitin yapısına ilişkin bir modifikasyonla sonuçlanır. Örneğin ksilanaz biyolojik aktivitesi için gerekli olmayan amino- veya karboksil-terminal amino asitleri çıkartılabilir. Buluşun modifiye edilmiş polipeptit sekansları çok sayıda yöntem aracılığıyla ksilanaz biyolojik aktivitesine yönelik olarak değerlendirilebilmekte olup, modifiye edilmiş polipeptit sekansının bir ksilanaz substratı ile temas ettirilmesini ve

modifiye edilmiş polipeptitin analizdeki spesifik substrat miktarının azalıp azalmadığının veya substrat ile fonksiyonel bir ksilanaz polipeptitinin enzimatik reaksiyonunun biyolojik ürünleri arttırıp arttırmadığının belirlenmesini içerir.

Patent hakkı bildiriminin nükleik asit sekansları buluşun örnek bir sekansının en az 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 veya 500 ardışık nükleotitini ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansları içerebilir. Patent hakkı bildiriminin nükleik asit sekansları homolog sekansları ve nükleik asit sekanslarının fragmanlarını ve bu sekanslarla en az yaklaşık % 50, % 51, % 52, % 53, % 54, % 55, % 56, % 57, % 58, % 59, % 60, % 61, % 62, % 63, % 64, % 65, % 66, % 67, % 68, % 69, % 70, % 71, % 72, % 73, % 74, % 75, % 76, % 77, % 78, % 79, % 80, % 81, % 82, % 83, % 84, % 85, % 86, % 87, % 88, % 89, % 90, % 91, % 92, % 93, % 94, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 veya daha fazla sekans özdeşliğine (homolojiye) sahip olan bir sekansa atıfta bulunarak bununla büyük ölçüde özdeş sekansları içerebilmektedir. Homoloji varsayılan parametrelere sahip FASTA sürüm 3.0t78 gibi burada açıklanan bilgisayar programlarının ve parametrelerin herhangi biri kullanılarak belirlenebilir. Homolog sekanslar ayrıca buluşun nükleik asit sekansında uridinin timinle yer değiştirdiği RNA sekanslarını içerir. Homolog sekanslar burada açıklanan prosedürlerin herhangi biri kullanılarak elde edilebilir veya bir sekanslama hatasının düzeltiminden kaynaklanabilir. Buluşun nükleik asit sekanslarının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların geleneksel tek karakterli formatta (Bkz Stryer, Lubert. Biochemistry, 3rd Ed., W. H Freeman & Co., New York yayını iç kapak) veya bir sekanstaki nükleotitlerin özdeşliğini kaydeden başka herhangi bir formatta gösterilebildiği takdir edilecektir.

Bu patent tarifnamesinde başka bir yerde tanımlanan çeşitli sekans karşılaştırma programları özellikle kullanıma yönelik tasarlanmıştır. Protein ve/veya nükleik asit sekansı homolojileri çeşitli sekans karşılaştırma algoritmaları ve teknikte bilinen programları kullanılarak değerlendirilebilir. Bu algoritmalar ve programlar TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA ve CLUSTALW (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993) içerir ancak bunlarla sınırlı değildir.

Homoloji veya özdeşlik sıklıkla sekans analiz yazılımı (örn, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705 ait Sekans Analizi Yazılım Paketi) kullanılarak ölçülür. Bu tür bir yazılım homoloji derecelerini çeşitli silmelere, ornatımlara ve diğer modifikasyonlara atayarak benzer sekansları eşleştirir.

5 İki veya daha fazla nükleik asit veya polipeptit sekansı kapsamında “homoloji” ve “özdeşlik” terimleri aynı olan veya herhangi bir sayıda karşılaştırma algoritması kullanılarak veya manüel hizalama ve görsel inceleme vasıtasıyla ölçüldüğü şekliyle bir karşılaştırma penceresinden veya belirlenen bölgeden maksimum karşılığa yönelik karşılaştırıldığında ve hizalandığında belirli bir amino asit veya nükleotit yüzdesine
10 sahip olan iki veya daha fazla sekans veya alt sekansa işaret eder.

Sekans karşılaştırması için tipik olarak bir sekans test sekanslarının karşılaştırıldığı bir referans sekans olarak işlev görür. Bir sekans karşılaştırma algoritması kullanıldığı zaman test ve referans sekanslar bir bilgisayara girilir, eğer gerekirse koordinatlar belirtilir ve sekans algoritma programı parametreleri belirlenir. Varsayılan program
15 parametreleri kullanılabilir veya alternatif parametreler belirlenebilir. Sekans karşılaştırma algoritması daha sonra program parametrelerine dayanarak referans sekansa göre test sekansları için yüzde sekans özdeşliklerini hesaplar.

Burada kullanıldığı şekliyle bir “karşılaştırma penceresi” iki sekans optimal olarak hizalandıktan sonra aynı sayıda ardışık pozisyonlu bir referans sekansla
20 karşılaştırıldığı, 20 ila 600, genellikle yaklaşık 50 ila yaklaşık 200, daha da genel olarak yaklaşık 100 ila yaklaşık 150’den oluşan gruptan seçilen ardışık pozisyonların sayısının herhangi birinin bir segmentine atıfta bulunulmasını içerir. Karşılaştırma için sekans hizalamasına ilişkin yöntemler teknikte iyi bilinmektedir. Karşılaştırma için sekansların optimal hizalaması örn, Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981
25 yayınının lokal homoloji algoritması vasıtasıyla, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol 48:443, 1970 yayınının homoloji hizalama algoritması vasıtasıyla, person & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988 yayınının benzerlik yöntemine yönelik araştırması vasıtasıyla, bu algoritmaların bilgisayar uygulamaları (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI ait GAP,
30 BESTFIT, FASTA and TFASTA) veya manüel hizalama ve görsel inceleme vasıtasıyla gerçekleştirilebilir. Homoloji veya özdeşliği belirlemeye yönelik diğer algoritmalar, örneğin BLAST programına ek olarak (Ulusal Biyolojik Enformasyon Merkezindeki Basic Local Alignment Search Tool) ALIGN, AMAS (Çoklu Hizalanmış Sekansların

Analizi), AMPS (Protein Çoklu Sekans Hizalaması), ASSET (Hizalı Segment İstatistikî Değerlendirme Aracı), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biyolojik Sekans Karşılaştırmalı Analiz Nodu), BLIMPS (BLOCKS IMPROVED SEARCHER), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, Smith-Waterman algoritması, DARWIN, Las Vegas algorithm, FNAT (Zorlanmış Nükleotit Hizalama Aracı), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sekans Analiz Paketi), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Duyarlı Sekans Karşılaştırma), LALIGN (Lokal Sekans Hizalama), LCP (Lokal İçerik Programı), MACAW (Çoklu Hizalama Yapısı & Analiz Tezgahı), MAP (Çoklu Hizalama Programı), MBLKP, MBLKN, PIMA (Patern İndüklü Çoklu Sekans Hizalama), SAGA (Genetik Algoritma vasıtasıyla Sekans Hizalama) ve WHAT-IF'i içerir. Bu hizalama programları ayrıca büyük ölçüde özdeş sekanslara sahip olan polinükleotit sekanslarını tanımlamak üzere genom veri tabanlarını taramak için kullanılabilir. Birkaç genom veri tabanı mevcuttur, örneğin insan genomunun azımsanmayacak bir kısmı İnsan Genomu Sekanslama Projesinin parçası olarak mevcuttur. En az yirmi bir başka genom halihazırda sekanslanmış olup, bunlar örneğin *M. Genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. Influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997) ve maya (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997) ve *D. Melanogaster* (Adams et al., 2000) içerir. Fare, *C. Elegans* ve Arabadopsis sp. gibi model organizmaların genomlarının sekanslanmasında kayda değer ilerleme elde edilmiştir. Bazı fonksiyonel bilgiler eklenmiş genomik bilgiyi içeren çeşitli veri tabanları farklı organizasyonlar tarafından korunmaktadır ve internet üzerinden erişilebilirdir.

Kullanışlı bir algoritmaya ilişkin bir örnek sırasıyla Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977 ve Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990 yayınlarında açıklanan BLAST ve BLAST 2.0 algoritmalarıdır. BLAST analizleri gerçekleştirmeye yönelik yazılım Ulusal Biyoteknoloji Enfeksiyon Merkezi aracılığıyla kamuya açık şekilde bulunabilir. Bu algoritma ilk olarak bir veri tabanındaki aynı uzunlukta bir kelime ile hizalandığı zaman bazı pozitif değerli eşik değeri skoruyla (T) gerek eşleşen gerekse bunu karşılayan, sorgu dizisinde kısa kelime uzunluğunun (W) tanımlanması vasıtasıyla yüksek skorlu sekans çiftlerini (HSP'ler) tanımlamayı içerir. T komşu kelime skoru eşik değeri olarak tanımlanmaktadır (yukarıda geçen Altschul et al.). Bu ilk komşu kelime isabetleri bunları içeren daha uzun HSP'leri bulmak için araştırmaları

başlatmaya yönelik temelleri oluşturur. Kelime isabetleri kümülatif hizalama skoru arttırılabildiği müddetçe her bir sekans boyunca her iki doğrultuda genişletilebilir. Kümülatif skorlar nükleotit sekansları için parametreleri (M) kullanarak hesaplanabilir (bir eşleşme kalıntısı çifti için ödül skoru; daima >0). Amino asit sekansları için kümülatif skoru hesaplamak üzere bir skora matrisi kullanılır. Her bir doğrultudaki kelime isabetlerinin genişletilmesi: kümülatif hizalama skoru kendi maksimum erişilmiş değerinden X miktarında geri kaldığında; kümülatif skor bir veya daha fazla negatif skorlamalı kalıntı hizalamasının birikmesinden dolayı sıfır veya altına indiğinde veya her iki sekansın ucuna erişildiğinde çift taraflı olarak durdurulur. BLAST algoritması parametreleri W, T ve X hizalamanın hassasiyetini ve hızını belirler. BLASTN programı (nükleotit sekansları için) varsayılan olarak 11'lik bir kelime uzunluğunu (W), 10'luk bir beklenti (E), M=5, N=4 ve her iki sarmala ilişkin bir karşılaştırmayı kullanır. Amino asit sekansları için BLASTP programı varsayılan olarak 3'lük bir kelime uzunluğunu ve 10'luk bir kelime uzunluğunu ve 50'lik bir BLOSUM62 skora matrisi (bkz Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) hizalamasını (B), 10'luk bir beklenti (E), M=5, N=-4 ve her iki sarmala ilişkin bir karşılaştırmayı kullanır.

BLAST algoritması ayrıca iki sekans arasındaki benzerliğe ilişkin istatistiksel bir analiz gerçekleştirir (bkz, örn, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873, 1993). BLAST algoritması tarafından sağlanan benzerliğe ilişkin bir ölçüm iki nükleotit veya amino asit sekansı arasındaki bir eşleşmenin şans eseri meydana gelme olasılığına ilişkin bir gösterge sağlayan en küçük toplam olasılığdır (P(N)). Örneğin bir nükleik asit eğer en küçük toplam olasılığı test nükleik asidi ile referans nükleik asidin bir karşılaştırmasında yaklaşık 0,2'den az, daha da tercih edilen şekliyle yaklaşık 0,01'den az ve en çok tercih edilen şekliyle yaklaşık 0,001'den az ise bir referans sekansa benzer olarak değerlendirilir.

Protein ve nükleik asit sekans homolojileri Temel Lokal Hizalama Araştırma Aracı ("BLAST") kullanılarak değerlendirilebilir. Özellikle beş spesifik BLAST programı aşağıdaki görevi gerçekleştirmek için kullanılır:

(1) BLASTP ve BLAST3 bir protein sekansı veri tabanına karşı bir amino asit orgu sekansını karşılaştırır;

(2) BLASTN bir nükleotit sekansı veri tabanına karşı bir nükleotit sorgu sekansını karşılaştırır;

(3) BLASTX bir protein sekansı veri tabanına karşı bir sorgu nükleotit sekansının (her iki sarmal da) alt çerçeveli yapısal translasyonel ürünlerini karşılaştırır;

(4) TBLASTN altı okuma çerçevesinin tamamında (her iki sarmal da) dönüştürülen bir nükleotit sekansı veri tabanına karşı bir sorgu protein sekansını karşılaştırır; ve

5 (5) TBLASTX bir nükleotit sekansı veri tabanının altı çerçeve translasyonuna karşı bir nükleotit sorgu sekansının altı çerçeve translasyonlarını karşılaştırır.

BLAST programı bir sorgu amino veya nükleik asit sekansı ve tercih edilen şekliyle bir protein veya nükleik asit sekansı veri tabanından elde edilen bir test sekansı arasında, burada “yüksek skorlu segment çiftleri” olarak anılan benzer segmentleri tanımlayarak
10 homolog segmentleri tanımlar. Yüksek skorlu segment çiftleri tercih edilen şekliyle birçoğu teknikte bilinen bir skrolama matrisi aracılığıyla tanımlanır (başka bir deyişle, hizalanır). Tercih edilen şekliyle kullanılan skrolama matrisi BLOSUM62 matrisidir (Gonnet et al., Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993). Daha az tercih edilen şekliyle PAM veya PAM250 matrisleri kullanılabilir
15 (örn, bkz, Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation). BLAST programlarına Birleşik Devletler Ulusal İlaç Kütüphanesi aracılığıyla erişilebilir.

Yukarıdaki algoritmalarla kullanılan parametreler sekans uzunluğu ve çalışılan
20 homoloji derecesine bağlı olarak uyarlanabilir. Parametreler kullanıcı talimatları olmadığında algoritmalar tarafından kullanılan varsayılan parametreler olabilir.

Bilgisayar sistemleri ve bilgisayar programı ürünleri

Sekans özdeşliklerini, yapısal homolojileri, motifleri ve benzerlerini in silico belirlemek ve tanımlamak için buluşun bir nükleik asit veya polipeptit sekansı bir bilgisayar
25 tarafından okunabilen ve değerlendirilebilen herhangi bir ortamda depolanabilir, kaydedilebilir ve maniple edilebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle “kaydedilmiş” ve “depolanmış” kelimeleri bir bilgisayar ortamında bilginin depolanması için bir işleme işaret etmektedir. Teknikte uzman bir kişi buluşun nükleik asit ve/veya polipeptit sekanslarının birini veya daha fazlasını
30 içeren üreticiler oluşturmak için bir bilgisayar tarafından okunabilen ortama bilgiyi kaydetmek için bilinen herhangi bir yöntemi kolaylıkla uyarlayabilir.

Patent hakkı bildiriminin polipeptitleri buluşun örnek sekanslarını ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansları ve önceki sekansların herhangi birinin fragmanlarını içerir. Büyük ölçüde özdeş veya homolog polipeptit sekansları buluşun bir örnek sekansıya, örn, buluşun bir polipeptit sekansıya en az % 50, % 51, % 52, % 53, % 54, % 55, % 56, % 57, % 58, % 59, % 60, % 61, % 62, % 63, % 64, % 65, % 66, % 67, % 68, % 69, % 70, % 71, % 72, % 73, % 74, % 75, % 76, % 77, % 78, % 79, % 80, % 81, % 82, % 83, % 84, % 85, % 86, % 87, % 88, % 89, % 90, % 91, % 92, % 93, % 94, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 veya daha fazla veya tam (% 100) sekans özdeşliğine sahip olan bir polipeptit sekansını işaret eder.

- 10 Homoloji varsayılan parametrelere veya modifiye edilmiş parametrelere sahip FASTA sürüm 3.0t78 gibi burada açıklanan bilgisayar programlarının ve parametrelerin herhangi biri kullanılarak belirlenebilir. Homolog sekanslar burada açıklanan prosedürlerin herhangi biri kullanılarak elde edilebilir veya bir sekanslama hatasının düzeltiminden kaynaklanabilir. Polipeptit fragmanları buluşun polipeptitlerinin ve
- 15 bununla büyük ölçüde özdeş sekansların en az yaklaşık 0, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 veya daha fazla ardışık amino asidini içerir. Buluşun amino asit sekanslarının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların polipeptit kodlarının geleneksel tek karakterli formatta (Bkz Stryer, Lubert. Biochemistry, 3rd Ed., W. H Freeman & Co., New York yayını iç kapak) veya bir
- 20 sekanstaki nükleotitlerin özdeşliğini kaydeden başka herhangi bir formatta gösterilebildiği takdir edilecektir.

Buluşun bir nükleik asit veya polipeptit sekansı bir bilgisayar tarafından okunabilen ve değerlendirilebilen herhangi bir ortamda depolanabilir, kaydedilebilir veya manipüle edilebilir.

- 25 Bilgisayar tarafından okunabilen ortam manyetik olarak okunabilen ortamı, optik olarak okunabilen ortamı, elektronik olarak okunabilen ortamı ve manyetik/optik ortamı içerir. Örneğin bilgisayar tarafından okunabilen ortam bir hard disk, bir disket, bir manyetik bant, CD-ROM, Dijital Çok Yönlü Disk (DVD), Rastgele Erişimli Bellek (RAM) ve Salt Okunur Bellek (ROM) aynı zamanda teknikte uzman kişilerce bilinen diğer ortam türleri
- 30 olabilir.

Bilgisayar sistemleri burada açıklanan sekans bilgisini depolar ve manipüle eder. Bir bilgisayar sistemine (100) ilişkin bir örnek Şekil 1'de blok diyagram şeklinde

gösterilmektedir. Burada kullanıldığı şekliyle “bir bilgisayar sistemi” buluşun bir nükleik asit sekansının bir nükleotit sekansın ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansları veya buluşun amino asit sekanslarında belirtilen bir polipeptit sekansını analiz etmek için donanım bileşenlerine, yazılım bileşenlerine ve veri depolama bileşenlerine işaret eder. Bilgisayar sistemi (100) tipik olarak sekans verisini işlemek, buna erişmek ve

5

bunu manipüle etmek için bir işlemci içerir. İşlemci (105) örneğin International Corporation'dan Pentium III veya un, Motorola, Compaq, AMD veya International Business Machines'den benzer bir işlemci gibi iyi bilinen herhangi bir merkezi işlemci birimi olabilir.

10

Tipik olarak bilgisayar sistemi (100) işlemci (105) ve veriyi depolamak için bir veya daha fazla dahili veri depolama bileşeni (100) ve veri depolama bileşeninde depolanan veriyi çekmek için bir veya daha fazla veri çekme cihazı içeren genel amaçlı bir sistemdir. Teknikte uzman bir kişi halihazırda bulunan bilgisayar sistemlerin herhangi birinin uygun olduğunu takdir edecektir.

15

Bilgisayar sistemi (100) bir ana belleğe (115) (tercih edilen şekliyle RAM olarak uygulanmıştır) ve bir sabit sürücü gibi bir veya daha fazla dahili veri depolama cihazına (110) veya üzerine kaydedilmiş veriye sahip olan başka bir bilgisayar tarafından okunabilen ortama bağlanan bir veri yoluna bağlı bir işlemci (105) içerebilir. Bilgisayar sistemi (100) ayrıca dahili veri depolama cihazında (110) depolanan verileri okumak için bir veya daha fazla veri çekme cihazı (118) içerebilir.

20

Veri çekme cihazı (118) örneğin, bir disketi, bir kompakt disk sürücüsünü, bir manyetik bantlı sürücüyü veya uzak bir veri depolama sistemine (örn, internet aracılığıyla) bağlantı kurabilen bir modemi, vs. temsi edebilir. Dahili veri depolama cihazı (100) bir disket, bir kompakt disk, bir manyetik bant, vs. gibi kontrol mantığını ve/veya üzerine kayıtlı veriyi içeren çıkartılabilir bir bilgisayar tarafından okunabilen ortam olabilir. Bilgisayar sistemi (100) avantajlı olarak kontrol mantığını ve/veya veri çekme cihazına takıldıktan sonra veri depolama bileşeninden veriyi okumak için uygun yazılım aracılığıyla programlanabilir.

25

Bilgisayar sistemi (100) bir bilgisayar kullanıcısına çıktıyı görüntülemek için bir ekran (120) içerir. Ayrıca bilgisayar sisteminin (100) bilgisayar sistemine (100) merkezi erişim sağlamak için bir ağdaki veya geniş alan ağındaki diğer bilgisayar sistemlerine (12a-c) bağlı olabildiği not edilmelidir.

30

Buluşun bir nükleik asit sekansının nükleotit sekanslarına ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansa veya buluşun bir polipeptit sekansına veya bununla büyük ölçüde özdeş sekanslara erişim ve bunları işlemek için yazılım (araştırma araçları, karşılaştırma araçları ve modelleme araçları, vs. gibi) çıkartma sırasında ana bellekte
5 (115) bulunabilir.

Bilgisayar sistemi (100) ayrıca bir bilgisayar tarafından okunabilen ortamda depolanan buluşun bir nükleik asit sekansını ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansları veya buluşun bir polipeptit sekansını ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansları bilgisayar tarafından okunabilen bir ortamda depolanan bir referans nükleotit veya polipeptit
10 sekansı (sekanslarıyla) karşılaştırmak için bir sekans karşılaştırma algoritması içerebilir. Bir "sekans karşılaştırma algoritması" bir nükleotit sekansını bir veri depolama aracında depolanan diğer nükleotit sekansları ve/veya bileşikleriyle karşılaştırmak için bilgisayar sistemine (100) (lokal veya uzaktan) uygulanan bir veya daha fazla programı işaret eder. Örneğin sekans karşılaştırma algoritması homolojileri
15 ve yapısal motifleri tanımlamak için bir bilgisayar tarafından okunabilen ortamda depolanan buluşun bir nükleik asit sekansının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslarının nükleotit sekanslarını veya buluşun bir polipeptit sekansını ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansları bilgisayar tarafından okunabilen bir ortamda depolanan sekanslarla karşılaştırmak için bir sekans karşılaştırma algoritması içerebilir.

Şekil 2, yeni sekans ve veri tabanındaki sekanslar arasındaki homoloji seviyelerini belirlemek üzere yeni bir nükleotiti veya protein sekansını bir sekans veri tabanı ile karşılaştırmak için bir işleme (200) ilişkin bir yönü gösteren bir akış diyagramıdır. Sekansların veri tabanı bilgisayar sisteminde depolanan özel bir veri tabanı veya
20 İnternet üzerinden bulunabilen GENBANK gibi kamusal bir veri tabanı olabilir.

İşlem (200) bir başlangıç durumunda (201) başlar ve daha sonra karşılaştırılacak yeni sekansın bir bilgisayar sistemindeki (100) bir belleğe depolandığı bir duruma (202) ilerler. Yukarıda tartışıldığı şekliyle bellek RAM veya bir dahili depolama cihazı dahil
25 olmak üzere herhangi bir bellek türü olabilir.

İşlem (200) daha sonra bir sekans veri tabanının analiz ve karşılaştırma için açıldığı
30 bir duruma (204) ilerler. İşlem (200) daha sonra veri tabanında depolanan birinci sekansın bilgisayar üzerindeki bir belleğe yazıldığı bir duruma (206) ilerler. Daha sonra birinci sekansın ikinci sekansla aynı olup olmadığını belirlemek için bir durumda (210)

bir karşılaştırma gerçekleştirilir. Bu adımın yeni sekans ve veri tabanındaki birinci sekans arasında tam bir karşılaştırma gerçekleştirmekle kısıtlı olmadığını not etmek önemlidir. Özdeş olmasalar bile iki nükleotiti veya protein sekansını karşılaştırmak için iyi bilinen yöntemler teknikte uzman kişilerce bilinmektedir. Örneğin test edilen iki sekans arasındaki homoloji seviyesini arttırmak için bir sekansa açıklıklar dahil edilebilir. Açıklıkların veya diğer özelliklerin karşılaştırma sırasında bir sekansa dahil edilip edilmeyeceğini kontrol eden parametreler normalde bilgisayar sisteminin kullanıcısı tarafından girilir.

İki sekansa ilişkin bir karşılaştırma durumda (210) gerçekleştirildikten sonra iki sekansın aynı olup olmadığına dair bir belirleme bir karar durumunda (210) yapılır. Elbette “aynı” terimi kesin olarak özdeş olan sekanslarla sınırlı değildir. Kullanıcı tarafından girilen homoloji parametreleri içinde olan sekanslar işlemde (200) “aynı” olarak işaretlenecektir.

Eğer iki sekansın aynı olduğuna dair bir belirleme yapılırsa işlem (200) veri tabanından sekansın isminin kullanıcıya görüldüğü bir duruma (214) ilerler. Bu durum kullanıcıyı görüntülenen isme sahip sekansın girilen homoloji kısıtını yerine getirdiğini bildirir. Depolanan sekansın ismi kullanıcıya gösterildikten sonra işlem (200) veri tabanında daha fazla sekansın bulunup bulunmadığına dair bir belirlemenin yapıldığı bir karar durumuna (218) ilerler. Eğer veri tabanında daha fazla sekans yoksa işlem (200) bir son durumda (220) sonlanır. Ancak eğer veri tabanında daha fazla sekans mevcutsa o zaman işlem (200) yeni sekansla karşılaştırılabilmesi için bir işaretçinin veri tabanındaki sonraki sekansa ilerlediği bir duruma (224) ilerler. Bu şekilde yeni sekans veri tabanındaki her sekansla hizalanır ve karşılaştırılır.

Eğer karar durumunda (212) sekansların homolog olmadığına ilişkin bir belirleme yapılmış olursa o zaman işlemin (200) herhangi başka bir sekansın karşılaştırma için veri tabanında bulunup bulunmadığını belirlemek için hemen kadar durumuna (218) ilerleyeceği not edilmelidir.

Bir bilgisayar sistemi bir işlemci, buluşun bir nükleik asit sekansının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların veya buluşun bir polipeptit sekansının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların depolanmış olduğu bir veri depolama cihazı, veya buluşun bir nükleik asit sekansı ile karşılaştırılacak referans nükleotit sekanslarının veya polinükleotit sekanslarının veya buluşun bir polipeptit sekansının ve bununla büyük

ölçüde özdeş sekansların ve karşılaştırmayı gerçekleştirmek için bir sekans karşılaştırmacısının geri alınabilir şekilde depolandığı bir veri depolama cihazı içerir. Sekans karşılaştırmacısı karşılaştırılan sekanslar arasında bir homoloji seviyesi belirtebilir veya yukarıda açıklanan buluşun nükleik asit sekanslarının ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekansların nükleik asit kodunda veya buluşun polipeptit sekansında ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslarda yapısal motifler tanımlayabilir veya bu nükleik asit kodları ve polipeptit kodlarıyla karşılaştırılan sekanslarda yapısal motifler tanımlayabilir. Veri depolama cihazı buluşun nükleik asitlerinin en az 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 veya 40 veya daha fazlasının sekanslarını ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekansları veya buluşun polipeptit sekanslarını veya bununla büyük ölçüde özdeş sekansları depolayabilir.

Buluşun bir nükleik asit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya buluşun bir polipeptit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar ve bir referans nükleotit sekansı arasındaki homoloji seviyesini belirlemeye yönelik bir yöntem nükleik asit kodunun veya polipeptit kodunun ve referans nükleotitin veya polipeptit sekansının homoloji seviyelerini belirleyen bir bilgisayar programı kullanımı aracılığıyla belirlenmesini ve nükleik asit kodu veya polipeptit kodu ve referans nükleotit veya polipeptit sekansı arasındaki homolojinin bilgisayar programı ile belirlenmesini içerir. Bilgisayar programı homoloji seviyelerini belirlemeye yönelik bir dizi bilgisayar programının herhangi birisi olabilmekte olup, burada özellikle belirtilenleri (örn, varsayılan parametrelerle veya herhangi bir modifiye edilmiş parametrelerle BLAST2N). Yöntem yukarıda açıklanan bilgisayar sistemleri kullanılarak uygulanabilir. Yöntem ayrıca buluşun yukarıda açıklanan nükleik asit sekanslarının veya buluşun polipeptit sekanslarının en az 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 veya 40 veya daha fazlasının bilgisayar programı kullanımı aracılığıyla okunması ve nükleik asit kodları veya polipeptit kodları ve referans nükleotit sekansları veya polipeptit sekansları arasındaki homolojinin belirlenmesi vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

Şekil 3, iki sekansın homolog olup olmadığını belirlemek için bir bilgisayardaki bir işleme (250) ilişkin bir yönü gösteren bir akış diyagramıdır. İşlem (250) bir başlangıç durumunda (252) başlar ve daha sonra karşılaştırılacak bir birinci sekansın bir bellekte depolandığı bir duruma (254) ilerler. Karşılaştırılacak ikinci sekans daha sonraki bir durumda (256) bir bellekte depolanır. İşlem (250) daha sonra birinci sekanstaki birinci karakterin okunduğu bir duruma (260) ilerler ve daha sonra ikinci sekansın birinci

karakterinin okunduğu bir duruma (262) ilerler. Eğer sekans bir nükleotit sekansı ise o zaman karakterin normalde gerek A, T, C, G gerekse U olacağı anlaşılmalıdır. Eğer sekans bir protein sekansı ise o zaman tercih edilen şekliyle tek harfli amino asit kodu şeklindedir böylece birinci ve ikinci sekanslar kolaylıkla karşılaştırabilir.

- 5 Daha sonra bir karar durumunda (264) iki karakterin aynı olup olmadığına dair bir belirleme yapılır. Eğer bunlar aynı ise o zaman işlem (250) birinci ve ikinci sekanslardaki sonraki karakterlerin okunduğu bir duruma (268) ilerler. Daha sonra sonraki karakterlerin aynı olup olmadığına dair bir belirleme yapılır. Eğer öyleyse o zaman işlem (250) iki karakter aynı olmayana kadar bu döngüyü devam ettirir. Eğer
- 10 sonraki iki karakterin aynı olmadığına dair bir belirleme yapılırsa işlem (250) her iki sekansın okunacak herhangi başka bir karakterinin olup olmadığını belirlemek için bir karar durumuna (274) ilerler.

Eğer okunacak herhangi başka karakter yoksa o zaman işlem (250) birinci ve ikinci sekanslar arasındaki homoloji seviyesinin kullanıcıya gösterildiği bir duruma (276)

15 ilerler. Homoloji seviyesi birinci sekanstaki sekansların toplam sayısı dışında aynı olan sekanslar arasında karakterlerin oranının hesaplanması vasıtasıyla belirlenir. Dolayısıyla eğer bir birinci 100 nükleotit sekansındaki her bir karakter bir ikinci sekanstaki her bir karakterle hizalı ise homoloji seviyesi % 100 olacaktır.

Alternatif olarak bilgisayar programı buluşun bir nükleik asit sekansının nükleik asit

20 kodunun ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların bir veya daha fazla pozisyonda bir referans nükleik asit sekansından farklı olup olmadığını belirlemek için buluşta belirtildiği gibi bir nükleotit sekansının nükleotit sekanslarının bir veya daha fazla referans nükleotit sekansı ile karşılaştıran bir program olabilir. Bu tür bir program gerek referans polinükleotitin sekansına gerekse buluşun bir nükleik asit sekansına ve

25 bununla büyük ölçüde özdeş sekanslara göre eklenmiş, silinmiş veya ornatılmış nükleotitlerin uzunluğunu ve özdeşliğini kaydeder. Bilgisayar programı buluşun bir nükleik asit sekansının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların bir referans nükleotit sekansına göre bir tekli nükleotit polimorfizmi (SNP) içerip içermediğini belirleyen bir program olabilir.

30 Buluşun bir nükleik asit sekansının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların bir veya daha fazla nükleotitte bir referans nükleotit sekansından farklı olup olmadığını belirlemeye yönelik bir yöntem nükleik asit kodunun ve referans nükleotit sekansının

nükleik asit sekansları arasındaki farkları belirleyen bir bilgisayar programının kullanımı aracılığıyla belirlenmesi ve nükleik asit kodu ve referans nükleotit sekansı arasındaki farkların bilgisayar programı ile tanımlanması adımlarını içerir. Bilgisayar programı tekli nükleotit polimorfizmini tanımlayan bir program olabilir. Yöntem yukarıda açıklanan bilgisayar sistemleri ve Şekil 3'te gösterilen yöntem kullanılarak uygulanabilir. Yöntem ayrıca buluşun nükleik asit sekanslarının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların en az 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 veya 40 veya daha fazlasının ve referans nükleotit sekanslarının bilgisayar programının kullanımı aracılığıyla okunması ve nükleik asit kodu ve referans nükleotit sekansları arasındaki farkların bilgisayar programı ile tanımlanması vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

Bilgisayara dayalı sistem ayrıca buluşun bir nükleik asit sekansı veya buluşun bir polipeptit sekansı ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekanslar içindeki özellikleri tanımlamak için bir tanımlayıcı içerebilir.

Bir "tanımlayıcı" buluşun bir nükleik asit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya buluşun bir polipeptit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar içindeki belirli özellikleri tanımlayan bir veya daha fazla programa işaret eder. Tanımlayıcı buluşun bir nükleik asit sekansında ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslarda açık bir okuma çerçevesi tanımlayan bir program içerebilir.

Şekil 4, bir sekansta bir özelliğin mevcudiyetini tespit etmek için bir tanımlayıcı işlemin (300) bir yönünü gösteren bir akış diyagramıdır. İşlem (300) bir başlangıç durumunda (302) başlar ve daha sonra özellikler için kontrol edilecek bir birinci sekansın bilgisayar sistemindeki (100) bir bellekte (115) depolandığı bir duruma (304) ilerler. İşlem (300) daha sonra bir sekans veri tabanı özelliğinin açıldığı bir duruma (306) ilerler. Bu tür bir veri tabanı özelliğinin isminin yanı sıra her bir özelliğinin niteliğine ilişkin bir liste içerir. Örneğin bir özellik ismi "Başlatma Kodunu" olabilir ve nitelik "ATG" olabilir. Başka bir örnek özellik isminin "TAATAA kutusu" olması ve özellik niteliğinin "'TAATAA" olmasıdır. Bu tür bir veri tabanına ilişkin bir örnek Wisconsin Üniversitesi Genetikler Bilgisayar Grubu tarafından üretilmiştir. Alternatif olarak özellikler alfa helisler, beta tabakalar gibi yapısal polipeptit motifleri veya enzimatik aktif alanlar, heliks-dönüş-heliks motifleri gibi fonksiyonel polipeptit motifler veya teknikte uzman kişilerce bilinen diğer motifler olabilir.

Ozelliklere ilişkin veri tabanı durumda (306) açıldıktan sonra işlem (300) birinci özelliğin veri tabanından okunduğu bir duruma (308) ilerler. Birinci özelliğin niteliği ile birinci sekansın bir karşılaştırması bundan sonraki bir durumda (310) yapılır. Daha sonra özelliğin niteliğinin birinci sekansta bulunup bulunmadığına dair bir belirleme bir karar durumunda (316) yapılır. Eğer nitelik bulunursa o zaman işlem (300) bulunan özelliğin isminin kullanıcıya gösterildiği bir duruma (318) ilerler.

İşlem (300) daha sonra özelliklerin veri tabanında bulunup bulunmadığına dair bir belirlemenin yapıldığı bir karar durumuna (320) ilerler. Eğer daha fazla özellik mevcut değilse o zaman işlem (300) bir son durumda (324) sonlandırılır. Ancak eğer veri tabanında daha fazla özellik mevcut ise o zaman işlem (300) bir durumda (326) sonraki sekans özelliğini okur ve sonraki özelliğin birinci sekansla karşılaştırıldığı duruma (310) geri döner. Eğer karar durumunda (316) birinci sekansta özellik niteliği bulunmazsa işlemin (300) veri tabanında herhangi başka bir özellik olup olmadığını belirlemek için doğrudan karar durumuna (320) ilerlediği not edilmelidir.

Buluşun bir nükleik asit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya buluşun bir polipeptit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar içindeki bir özelliğin tanımlanmasına ilişkin yöntem nükleik asit kodunun (kodlarının) veya polipeptit kodunun (kodlarının) buradaki özellikleri tanımlayan bir bilgisayar programının kullanımı aracılığıyla okunmasını ve nükleik asit kodu (kodları) içindeki özelliklerin bilgisayar programı ile tanımlanmasını içerir. Bilgisayar programı açık okuma çerçevelerini tanımlayan bir bilgisayar programı içerir. Yöntem ayrıca buluşun nükleik asit sekanslarının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların veya buluşun polipeptit sekanslarının ve bununla büyük ölçüde özdeş sekansların tek bir sekansının veya en az 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 veya 40 veya daha fazlasının bilgisayar programının kullanımı aracılığıyla okunması ve nükleik asit kodları veya polipeptit kodları içindeki özelliklerin bilgisayar programı ile tanımlanması vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

Buluşun bir nükleik asit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya buluşun bir polipeptit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar çeşitli formatlarda çeşitli veri işlemcilerinde depolanabilir ve maniple edilebilir. Örneğin buluşun bir nükleik asit sekansı ve bunun büyük ölçüde özdeş sekansları veya buluşun bir polipeptit sekansı ve bunun büyük ölçüde özdeş sekansları Microsoft WORD™ veya WORDPERFECT™ gibi bir kelime işleme dosyasında bir metin olarak veya teknikte uzman kişilerin aşına olduğu DB2™, SYBASE™ veya ORACLE™ gibi çeşitli

veri tabanı programlarında bir ASCII dosyası olarak depolanabilir. Ek olarak birçok bilgisayar programı ve veri tabanı buluşun bir nükleik asit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslarla veya buluşun polipeptit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslarla karşılaştırılacak referans nükleotit sekanslarının veya polipeptit sekanslarının sekans karşılaştırma algoritmaları, tanımlayıcıları veya kaynakları olarak kullanılabilir. Aşağıdaki listenin buluşu kısıtlaması değil buluşun bir nükleik asit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya buluşun polipeptit sekansı ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar ile kullanışlı olan programlar ve veri tabanları için kılavuz sağlaması amaçlanmaktadır.

10 Kullanılabilen programlar ve veri tabanları şunları içerir ancak bunlarla sınırlı değildir: MacPattern (EMBL), DiscoveryBase (Molecular Applications Group), GeneMine (Molecular Applications Group), Look (Molecular Applications Group), MacLook (Molecular Applications Group), BLAST ve BLAST2 (NCBI), BLASTN ve BLASTX (Altschul et al, J. Mol. Biol. 215: 403, 1990), FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988), FASTDB (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990), Catalyst (Molecular Simulations Inc.), Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.), Cerius².DBAccess (Molecular Simulations Inc.), HypoGen (Molecular Simulations Inc.), Insight II, (Molecular Simulations Inc.), Discover (Molecular Simulations Inc.), CHARMM (Molecular Simulations Inc.), Felix (Molecular Simulations Inc.), DelPhi, (Molecular Simulations Inc.), QuanteMM, (Molecular Simulations Inc.), Homology (Molecular Simulations Inc.), Modeler (Molecular Simulations Inc.), ISIS (Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WebLab (Molecular Simulations Inc.), WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.), SeqFold (Molecular Simulations Inc.), MDL mevcut Kimyasal Rehber veri tabanı, MDL İlaç Verisi Raporu veri tabanı, Kapsamlı Tıbbi Kimya veri tabanı, Derwents Dünya İlaç İndeksi veri tabanı, BioByteMasterFile veri tabanı, Genbank veri tabanı ve Genseqn veri tabanı. Mevcut patent hakkı bildirimini göz önüne alındığında başka birçok program ve veri tabanı teknikte uzman kişi için açık olacaktır.

30 Yukarıdaki programlar kullanılarak tespit edilebilen motifler lösin fermuarlarını kodlayan sekansları, heliks-dönüş-heliks motiflerini, glikosilasyon alanlarını, unikutin ekleme alanlarını, alfa helisleri ve beta tabakalarını, kodlanmış proteinlerin sekresyonunu yönlendiren sinyal peptitlerini kodlayan sinyal sekanslarını,

homeokutular gibi transkripsiyon regülasyonunda uygulanan sekansları, asidik gergileri, enzimatik aktif alanları, substrat bağlama alanlarını ve enzimatik klevaj alanlarını içerir.

Nükleik asitlerin hibridizasyonu

5 Patent hakkı bildiri buluşun örnek bir sekansı için zorlayıcı koşullar altında hibritlenen izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asit sağlar. Zorlayıcı koşullar son derece zorlayıcı koşullar, orta dereceli zorlayıcı koşullar ve/veya düşük zorlayıcı koşullar olabilmekte olup, burada açıklanan yüksek ve düşük zorlayıcılık koşullarını içerir.

10 Zorlayıcı koşullar altında hibritlenme kabiliyeti ile tanımlanan nükleik asitler buluşun nükleik asidin yaklaşık beş kalıntısı ve tam uzunluğu arasında olabilir, örn, uzunlukça en az yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 veya daha fazla kalıntı olabilir. Tam uzunluktan daha kısa nükleik asitler ayrıca dahil
15 edilmektedir. Bu nükleik asitler örn, hibridizasyon problemleri, etiketleme problemleri, PCR oligonükleotit problemleri, iRNA (tek veya çift sarmallı), antisens veya antikör bağlama peptitlerini kodlayan sekanslar (epitoplar), motifler, aktif alanlar ve benzerleri olarak faydalı olabilir.

Nükleik asitler yaklaşık 37 °C ila 42 °C'de yaklaşık % 50 formamid koşulları içeren
20 yüksek zorlayıcılık altında hibritlenme kabiliyetleri veya yaklaşık 30 °C ila 35 °C'de yaklaşık % 35 ila % 25 koşullarını içeren indirgenmiş zorlayıcılık altında hibritlenme kabiliyetleri aracılığıyla tanımlanabilir.

Alternatif olarak nükleik asitler % 50 formamid, 5X SSPE, % 0,2 SDS ve cot-1 veya somon sperm DNA'sı gibi bir nükleik asit bloke eden tekrarlı sekans (örn, 200 n/ml
25 parçalanmış ve denatüre somon sperm DNA'sı) içeren yüksek zorlayıcılık altında hibritlenme kabiliyetleri aracılığıyla tanımlanır. Nükleik asitler 35C'lik indirgenmiş bir sıcaklıkta % 35 formamid içeren indirgenmiş zorlayıcı koşullar altında hibritlenme kabiliyetleri vasıtasıyla tanımlanabilir.

Nükleik asit hibridizasyon reaksiyonlarında belirli bir zorlayıcılık seviyesine erişmek için
30 kullanılan koşullar hibritlenen nükleik asitlerin doğasına bağlı olarak değişiklik gösterecektir. Örneğin nükleik asitlerin hibritleme bölgelerinin uzunluğu, tamamlayıcılık derecesi, nükleotit sekansı bileşimi (örn, GC v. AT içeriği) ve nükleik asit türü (örn, RNA

v. DNA) hibridizasyon koşullarının seçiminde değerlendirilebilir. İlave bir değerlendirme nükleik asitlerin birinin örneğin bir filtre üzerinde hareketsiz hale getirilip getirilmediğidir.

Hibridizasyon düşük zorlayıcılık, orta dereceli zorlayıcılık veya yüksek zorlayıcılık koşulları altında gerçekleştirilebilir. Nükleik asit hibridizasyonuna ilişkin bir örnek olarak immobilize denatüre nükleik asitler içeren bir polimer membranı ilk önce 0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 5,0 mM Na₂EDTA, % 0,5 SDS, 10X Denhardt's ve 0,5 mg/ml poliriboadenilik asitten oluşan bir solüsyonda 45 °C'de 30 dakika boyunca öncede n hibritlenir. Yaklaşık olarak 2 X 10⁷ cpm (spesifik aktivite 4-9 X 10⁸ cpm/ug) ³²P uç etiketli oligonükleotit prob daha sonra solüsyona eklenir. 12-16 saat inkübasyonun ardından membran % 0,2 SDS içeren 1X SET (150 mM NaCl, 20 mM Tris hidroklorür, pH 7.8, 1 mM Na₂EDTA) içinde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca yıkanır, ardından oligonükleotit probu için taze T_m-10 °C'de taze 1X SET içinde 30 dakikalık bir yıkama gelir. Daha sonra membran hibridizasyon sinyalinin tespiti için otoradyografik filme maruz bırakılır.

Yukarıdaki hibridizasyonların tamamının yüksek zorlayıcılık koşulları altında olduğu düşünülmelidir.

Hibridizasyonu takiben bir filtre spesifik olarak bağlanmamış tespit edilebilir herhangi bir probu uzaklaştırmak için yıkanabilir. Filtreleri yıkamak için kullanılan zorlayıcılık ayrıca hibritlenmekte olan nükleik asitlerin yapısına, hibritlenmekte olan nükleik asitlerin uzunluğuna, tamamlayıcılık derecesi, nükleotit sekansı bileşimine (örn, GC v. AT içeriği) ve nükleik asit türüne (örn, RNA v. DNA) bağlı olarak değişebilir. Artan şekilde yüksek zorlayıcılık koşullarına ilişkin örnekler aşağıdaki gibidir: Oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 2X SSC, % 0,1 SDS (düşük zorlayıcılık); oda sıcaklığında 30 dakika ila 1 saat boyunca 0.1X SSC, % 0,5 SDS (orta dereceli zorlayıcılık); hibridizasyon sıcaklığı ve 68 °C arasında 15 ila 30 dakika boyunca 0.1X SSC, % 0,5 SDS (yüksek zorlayıcılık) ve 72 °C'de 15 dakika boyunca 0,15M NaCl (çok yüksek zorlayıcılık). Son düşük zorlayıcı yıkama oda sıcaklığında 0.1X SSC'de gerçekleştirilebilir. Yukarıdaki örnekler sadece filtreleri yıkamak için kullanılabilen bir koşul dizisinin açıklayıcısıdır. Teknikte uzman bir kişi farklı zorlayıcı yıkamalar için çeşitli tarifler olduğunu bilecektir. Bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Proba hibritlenmiş olan nükleik asitler otoradyografi veya diğer geleneksel teknikler aracılığıyla tanımlanır.

Yukarıdaki prosedür prob sekansıya azalan homoloji seviyelerine sahip olan nükleik asitleri tanımlamak için modifiye edilebilir. Örneğin tespit edilebilir prob ile azalan homolojisi olan nükleik asitler elde etmek için daha az zorlayıcı koşullar kullanılabilir. Örneğin hibridizasyon sıcaklığı yaklaşık olarak 1M'lik bir Na⁺ konsantrasyonuna sahip olan bir hibridizasyon tamponunda 5 °C'lik azalışlara 68 °C'den 42 °C'ye düşürülebilir. Hibridizasyonu takiben filtre hibridizasyon sıcaklığında 2X SSC, % 0,5 SDS ile yıkanabilir. Bu koşullar 50 °C'nin üstünde "orta dereceli" koşullar ve 50 °C'nin altında "düşük" koşullar olarak değerlendirilir. "Orta dereceli" hibridizasyon koşullarına ilişkin spesifik bir örnek hibridizasyon 55 °C'de gerçekleştirildiği zaman olur. "Düşük zorlayıcılıklı" hibridizasyon koşullarına ilişkin spesifik bir örnek hibridizasyon 45 °C'de gerçekleştirildiği zaman olur.

Alternatif olarak hibridizasyon 42 °C'lik bir sıcaklıkta formamid içeren, 6X SSC gibi tamponlarda gerçekleştirilebilir. Bu durumda hibridizasyon tamponundaki formamidin konsantrasyonu proba azalan homoloji seviyelerine sahip olan klonları tanımlamak için % 5'lik azalışlarla % 50'den % 0'a düşürülebilir. Hibridizasyonu takiben filtre 50 °C'de 6X SSC, % 0,5 SDS ile yıkanabilir. Bu koşullar % 25'in üstünde formamidde "orta dereceli" koşullar ve % 25'in altında formamidde "düşük" koşullar olarak değerlendirilir. "Orta dereceli" hibridizasyon koşullarına ilişkin spesifik bir örnek hibridizasyon % 30 formamidde gerçekleştirildiği zaman olur. "Düşük zorlayıcılıklı" hibridizasyon koşullarına ilişkin spesifik bir örnek hibridizasyon % 10 formamidde gerçekleştirildiği zaman olur.

Ancak bir hibridizasyon formatının seçimi kritik değildir - bir nükleik asidin ilgilenilen olup olmadığını belirleyen koşulları belirten yıkama koşullarının zorlayıcılığıdır. Buluşun kapsamı içindeki nükleik asitleri tanımlamak için kullanılan yıkama koşulları örn, pH 7'de ve en az yaklaşık 50 °C veya yaklaşık 55 °C ile yaklaşık 60 °C'lik bir sıcaklıkta yaklaşık 0,02 molarlık bir tuz konsantrasyonunu veya 72 °C'de yaklaşık 15 dakika boyunca yaklaşık 0,15 M NaCl'lik bir tuz konsantrasyonunu veya en az yaklaşık 50 °C veya yaklaşık 55 °C ile yaklaşık 60 °C'de yaklaşık 15 ila yaklaşık 20 dakika boyunca yaklaşık 0.2X SSC'lik bir tuz konsantrasyonunu içerir veya hibridizasyon kompleksi oda sıcaklığında 15 dakika boyunca % 0,1 SDS içeren yaklaşık 2X SSC'lik bir tuz konsantrasyonu ile iki kere yıkanır ve daha sonra 68 °C'de 15 dakika boyunca

veya eşdeğer koşullarda % 0,1 SDS içeren 0.1X SSC ile iki kere yıkanır. SSC tamponu ve eş değer koşullara ilişkin bir açıklama için bkz, Tijssen ve Ausubel.

Önceki yöntemler buluşun sekanslarının birisi ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya en az yaklaşık 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 veya 500 ardışık baz içeren fragmanlar ve bunlara tamamlayıcı sekanslardan oluşan gruptan seçilen bir nükleik asitle en az yaklaşık % 97, en az % 95, en az % 90, en az % 85, en az % 80, en az % 75, en az % 70, en az % 65, en az % 60, en az % 55 veya en az % 50 homolojisi olan bir sekansa sahip olan nükleik asitleri izole etmek için kullanılabilir. Homoloji hizalama algoritması kullanılarak ölçülebilir. Örneğin homolog polinükleotitler burada açıklanan kodlama sekanslarının birinin doğal olarak meydana gelen alelik varyantı olan bir kodlama sekansına sahip olabilir. Bu alelik varyantlar buluşun nükleik asitleriyle veya bunlara tamamlayıcı sekanslarla karşılaştırıldığında bir veya daha fazla nükleotitin bir ornatımına, silinmesine veya eklemesine sahip olabilir.

Ek olarak yukarıdaki prosedürler bir sekans hizalama algoritması kullanılarak belirlendiği şekilde (örn, varsayılan parametrelere sahip FASTA sürüm 3.0t78 algoritması) buluşun sekanslarının birisi ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslar veya en az yaklaşık 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 veya 500 ardışık baz içeren ve bunlara tamamlayıcı sekanslardan oluşan gruptan seçilen bir nükleik asitle en az yaklaşık % 97, en az % 95, en az % 90, en az % 85, en az % 80, en az % 75, en az % 70, en az % 65, en az % 60, en az % 55 veya en az % 50 homolojiye sahip olan polipeptitleri kodlayan nükleik asitleri izole etmek için kullanılabilir.

Oligonükleotit problemleri ve bunları kullanma yöntemleri

Nükleik asit problemleri örn, bir ksilanaz aktivitesine sahip olan bir polipeptiti kodlayan nükleik asitleri veya bunların fragmanlarını tanımlamak için veya ksilanaz genlerini tanımlamak için kullanılabilir. Prob buluşun nükleik asidinin en az 10 ardışık bazını içerebilir. Alternatif olarak bir prob buluşun bir nükleik asidinde belirtilen bir sekansın en az yaklaşık 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 150 veya yaklaşık 10 ila 50, yaklaşık 20 ila 60 yaklaşık 30 ila 70 ardışık bazını içerebilir. Problemler bağlama ve/veya hibridizasyon aracılığıyla bir nükleik asit tanımlar. Problemler aşağıdaki gibi örn, kapiler

diziler dahil olmak üzere diziler şeklinde kullanılabilir. Problar ayrıca diğer nükleik asitleri veya polipeptitleri izole etmek için kullanılabilir.

Bu problar bir toprak örneği gibi bir biyolojik örneğin buluşun bir nükleik asit sekansına sahip olan bir organizmayı veya nükleik asidin elde edildiği bir organizmayı içerip içermediğini belirlemek için kullanılabilir. Bu prosedürlerde nükleik asidin izole edildiği organizmayı potansiyel olarak tutan bir biyolojik örnek elde edilir ve nükleik asitler bu örnekten elde edilir. Nükleik asitler probun içinde bulunduğu herhangi bir tamamlayıcı sekansa spesifik olarak hibritlenmesine izin veren koşullar altında proba temas eder.

10 Gerektiği zaman probun tamamlayıcı sekanslara spesifik olarak hibritlenmesine izin veren koşullar probun tamamlayıcı sekansın yanı sıra tamamlayıcı sekansı içermeyen kontrol sekanslarını içerdiği bilinen örneklerden tamamlayıcı sekanslarla temas halinde yerleştirilmesi vasıtasıyla belirlenebilir. Hibridizasyon tamponunun tuz konsantrasyonu, hibridizasyon tamponunun formamid konsantrasyonu gibi 15 hibridizasyon koşulları probun tamamlayıcı nükleik asitlere spesifik olarak hibritlenmesine olanak sağlayan koşulları tanımlamak için değişiklik gösterebilir.

Eğer örnek nükleik asidin izole edildiği organizmayı içeriyorsa probun spesifik hibridizasyonu daha sonra tespit edilir. Hibridizasyon probun bir radyoaktif izotop, bir floresan boya veya tespit edilebilir bir ürünün oluşmasını katalize edebilen bir enzim 20 gibi tespit edilebilir bir ajanla etiketlenmesi vasıtasıyla tespit edilebilir.

Bir örnekte tamamlayıcı nükleik asitlerin mevcudiyetini tespit etmek için etiketlenmiş probları kullanmaya yönelik birçok yöntem teknikte uzman kişiler için açıktır. Bunlar Southern Blotları, Northern Blotları, koloni hibridizasyon prosedürlerini ve nokta blotları içerir. Bu prosedürlerin her birine yönelik protokoller Ausubel et al. Current Protocols 25 in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. (1997) ve Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) yayınlarında açıklanmaktadır.

Alternatif olarak birden fazla prob (en az biri nükleik asit örneğinde bulunan herhangi bir tamamlayıcı sekansa spesifik olarak hibritlenebilir) örneğin buluşun bir nükleik asit 30 sekansını içeren bir organizma (örn, nükleik asidin izole edildiği bir organizma) içerip içermediğini belirlemek için bir amplifikasyon reaksiyonunda kullanılabilir. Tipik olarak problar oligonükleotitleri içerir. Amplifikasyon reaksiyonu bir PCR reaksiyonu içerebilir.

PCR protokolleri yukarıda bahsedilen Ausubel ve Sambrook'ta açıklanmaktadır. Alternatif olarak amplifikasyon bir ligaz zincir reaksiyonu, 3SR veya sarmal değiştirme reaksiyonu içerebilir. (Bkz Barany, F., "The Ligase Chain Reaction in a PCR World", PCR Methods and Applications 1:5-16, 1991; E. Fahy et al., "Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based Amplification System Alternative to PCR", PCR Methods and Applications 1:25-33, 1991; ve Walker G.T. et al., "Strand Displacement Amplification-an Isothermal in vitro DNA Amplification Technique", Nucleic Acid Research 20:1691-1696, 1992). Bu tür prosedürlerde örnekteki nükleik asitler problemlerle temas eder, amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilir ve meydana gelen herhangi bir amplifikasyon ürünü tespit edilir. Amplifikasyon ürünü reaksiyon ürünleri üzerinde jel elektroforezin gerçekleştirilmesi ve jelin etidiyum bromid gibi bir interkalatör ile boyanması vasıtasıyla tespit edilebilir. Alternatif olarak problemlerin biri veya daha fazlası bir radyoaktif izotop ile etiketlenebilir ve bir radyoaktif amplifikasyon ürününün mevcudiyeti jel elektroforezden sonra otoradyografi vasıtasıyla tespit edilebilir.

Buluşun sekanslarının uçlarına yakın sekanslardan ve bunlarla büyük ölçüde özdeş sekanslardan türetilen problemler ayrıca buluşun sekanslarına ve bunların büyük ölçüde özdeş seanslarına bitişik yerleştirilen genomik sekansları içeren klonları tanımlamak için kromozom yürütme prosedürlerinde kullanılabilir. Bu yöntemler konak organizmadan ilave proteinleri kodlayan genlerin izolasyonuna olanak sağlar.

Buluşun izole edilmiş nükleik asitleri ve bunlara büyük ölçüde özdeş sekanslar, bunlara tamamlayıcı sekanslar veya buluşun sekanslarının birinin en az 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 veya 500 ardışık bazını içeren bir fragmanı ve buna büyük ölçüde özdeş sekanslar veya bunlara tamamlayıcı sekanslar ilgili nükleik asitleri tanımlama ve izole etmek için problemler olarak kullanılabilir. Bazı yönlerde ilgili nükleik asitler nükleik asidin izole edildiği birinden farklı organizmalardan cDNA'lar veya genomik DNA'lar olabilir. Örneğin diğer organizmalar ilişkili organizmalar olabilir. Bu tür prosedürlerde bir nükleik asit örneği probun ilişkili sekanslara spesifik olarak hibritlenmesine izin veren koşullar altında proba temas eder. Probun ilişkili organizmadan nükleik asitlere hibridizasyonu daha sonra yukarıda açıklanan yöntemlerin herhangi biri kullanılarak tespit edilir.

Tespit edilebilir problemlere hibritlenen cDNA'lar veya genomik DNA'lar gibi nükleik asitleri tanımlamak için kullanılan hibridizasyon koşullarının zorlayıcılığının değiştirilmesi vasıtasıyla proba farklı homoloji seviyelerine sahip olan nükleik asitler tanımlanabilir

ve izole edilebilir. Zorlayıcılık hibridizasyonun problemlerin erime sıcaklığının altında değişen sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi vasıtasıyla değiştirilebilir. Erime sıcaklığı, T_m , hedef sekansın % 50'sinin mükemmel şekilde tamamlayıcı proba hibritlendiği sıcaklıktır (tanımlanan iyonik direnç ve pH altında). Çok zorlayıcı koşullar belirli bir prob için T_m 'ye eşit veya bundan yaklaşık 5 °C düşük olacak şekilde seçilir. Probonun erime sıcaklığı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanabilir.

Uzunlukça 14 ve 70 arasında nükleotitli problemler için erime sıcaklığı (T_m) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fraksiyon G+C}) - (600/N)$ burada N probun uzunluğudur.

10 Eğer hibridizasyon formamid içeren bir solüsyonda gerçekleştirilirse erime sıcaklığı denklem kullanılarak hesaplanabilir: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fraksiyon G+C}) - (\% 0,63 \text{ formamid}) - (600/N)$ burada N probun uzunluğudur.

Önceden hibridizasyon 6X SSC, 5X Denhardt ayırıcı, 0.5% SDS, 100µg denatüre fragmanlarına ayrılmış somon sperm DNA'sı veya 6X SSC, 5X Denhardt ayırıcı, 15 50,5SDS, 100µg denatüre fragmanlarına ayrılmış somon sperm DNA'sı, % 50 formamidde gerçekleştirilir. SSC ve Denhardt solüsyonları için formüller yukarıda bahsedilen Sambrook ve arkadaşlarında listelenmiştir.

Hibridizasyon yukarıda listelenen önceden hibridizasyon solüsyonlarına tespit edilebilir probun eklenmesi vasıtasıyla gerçekleştirilir. Probonun çift sarmallı DNA içerdiği durumda hibridizasyon solüsyonuna eklemeye önce denatüre edilir. Filtre probun tamamlayıcı veya homolog sekanslar içeren cDNA'lara veya buna genomik DNA'lara hibritlenmesine olanak sağlamak için yeterli bir zaman periyodu boyunca hibridizasyon solüsyonu ile temas ettirilir. Uzunlukça 200'ün üzerinde nükleotitli problemler için hibridizasyon T_m 'nin altında 15-25 °C'de gerçekleştirilebilir. Oligonükleotit problemleri gibi daha kısa problemler için hibridizasyon T_m 'nin altında 5-10 °C'de gerçekleştirilebilir. Tipik olarak 6X SSC'de hibridizasyon için hibridizasyon yaklaşık olarak 68 °C'de gerçekleştirilir. Genel olarak % 50 formamid içeren solüsyonlarda hibridizasyon için hibridizasyon yaklaşık olarak 42°de gerçekleştirilir.

Glikosil Hidrolazların Ekspresyonunun İnhibe Edilmesi

30 Patent hakkı bildiri buluşun nükleik asitlerine tamamlayıcı (örn, antisens sekanslar) nükleik asitler sağlar. Antisens sekanslar ksilanaz kodlayan genlerin taşınması, uç birleştirilmesi veya transkripsiyonunu inhibe edebilir. İnhibisyon genomik DNA'nın veya

- mesajcı RNA'nın hedeflenmesi aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Hedeflenen nükleik asitlerin transkripsiyonu veya fonksiyonu örneğin hibridizasyon ve/veya klevaj vasıtasıyla inhibe edilebilir. Mevcut buluş tarafından sağlanan özellikle kullanışlı bir inhibitör dizisi gerek ksilanaz gene gerekse mesaja bağlanabilen oligonükleotitleri içermekte olup, her
- 5 iki durumda ksilanaz üretimini veya fonksiyonunu engeller veya inhibe eder. Birleşme sekansa özgü hibridizasyon aracılığıyla olabilir. Kullanışlı başka bir inhibitör sınıfı ksilanaz mesajının inaktivasyonuna veya klevajına neden olan oligonükleotitleri içerir. Oligonükleotit bu tür bir klevaja neden olan ribozomlar gibi enzim aktivitesine sahip olabilir. Oligonükleotit kimyasal olarak modifiye edilebilir veya tamamlayıcı nükleik asidi
- 10 yarabilen bir enzime veya bileşime konjuge edilebilir. Birçok farklı bu tür oligonükleotitten oluşan bir havuz istenen aktiviteye sahip olanlara yönelik taranabilir. Dolayısıyla buluş bir nükleik asit ve/veya protein seviyesi, örn, antisens, iRNA ve buluşun ksilanaz sekanslarını ve anti-ksilanaz antikörlerini içeren ribozomlar üzerinde ksilanaz ekspresyonunun inhibisyonu için çeşitli bileşimler sağlar.
- 15 Ksilanaz ekspresyonunun inhibisyonu çeşitli endüstriyel, medikal, farmasötik, araştırma, gıda ve yem ve gıda ve yem takviyesi işleme ve diğer uygulamalar ve işlemlerde kullanıma sahip olabilir. Örneğin ksilanaz ekspresyonunun inhibisyonu ürün bozulmasını yavaşlatabilir veya engelleyebilir. Ürün bozulması polisakkaritler, örn, yapısal polisakkaritler enzimatik olarak ayrıştığı zaman meydana gelebilir. Bu
- 20 meyvelerin ve sebzelerin bozulmasına veya çürümesine neden olabilir. Buluşun ksilanazların ekspresyonunu ve/veya aktivitesini inhibe eden bileşimlerinin, örn, antikörler, antisens oligonükleotitler, ribozomlar ve RNAi kullanımı ürün bozulmasını yavaşlatma veya engellemek için kullanılır. Yöntemler ve bileşimler ürün bozulmasını yavaşlatmak veya engellemek için bir bitki veya bitki ürünü (örn, bir tahıl, bir darı, bir
- 25 meyve, kök, tohum, yaprak, vs.) üzerine buluşun antikörlerinin, antisens oligonükleotitlerinin, ribozomlarının ve RNAi'sinin uygulanmasını içerir. Bu bileşimler ayrıca bitki (örn, bir transjenik bitki) veya başka bir organizma (örn, bir bakteri veya buluşun bir ksilanaz geni ile transforme edilen diğer mikroorganizmalar) tarafından eksprese edilebilir.
- 30 Buluşun ksilanaz ekspresyonunun inhibisyonuna yönelik bileşimler (örn, antisens, iRNA, ribozomlar, antikörler) farmasötik bileşimler olarak, örn, anti-patojen ajanlar olarak veya diğer terapilerde örn, Salmonella için anti-mikrobiyaller olarak kullanılabilir.

Antisens Oligonükleotitler

Antisens oligonükleotitler mRNA'yı hedefleyerek ksilan hidrolaz aktivitesini inhibe edebilen ksilanaz mesajını bağlayabilme (örn, dahili β -1,4-ksilosidik bağların hidrolizini katalize edebilme) kapasitene sahip olabilir. Antisens oligonükleotitleri tasarlamak için stratejiler bilimsel ve patent literatüründe iyi açıklanmaktadır ve teknikte uzman kişi bu ksilanaz oligonükleotitlerini tasarlayabilir. Örneğin etkili antisens oligonükleotitleri taramak için gen yürütme/ RNA eşleştirme protokolleri teknikte iyi bilinmektedir, bkz, 5 örn, potent antisens sekans seçimine yönelik kolay ve güvenilir bir yöntem sağlamaya yönelik standart moleküler tekniklere dayanan bir RNA eşleştirme analizini 10 açıklayan Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183 yayını. Bkz, ayrıca Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

Doğal olarak meydana gelen nükleik asitler antisens oligonükleotitler olarak kullanılır. Bu antisens oligonükleotitler herhangi bir uzunlukta olabilir; örneğin alternatif yönlerde antisens oligonükleotitler yaklaşık 5 ila 100, yaklaşık 10 ila 80, yaklaşık 15 ila 60, 15 yaklaşık 18 ila 40 arasındadır. Optimal uzunluk rutin tarama vasıtasıyla belirlenebilir. Antisens oligonükleotitler herhangi bir konsantrasyonda bulunabilir. Optimal konsantrasyon rutin tarama vasıtasıyla belirlenebilir. Bu potansiyel probleme işaret eden çok çeşitli sentetik, doğal olarak meydana gelen nükleotit ve nükleik asit analogu bilinmektedir. Örneğin N-(2-aminoetil) glisin gibi iyonik olmayan omurgalar içeren peptit 20 nükleik asitler (PNA'lar) kullanılabilir. WO 97/03211; WO 96/39154 sayılı patent belgesi; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996) yayınlarında açıklanan fosforotiyoat bağlarına sahip olan antisens oligonükleotitler de ayrıca kullanılabilir. Buluş tarafından sağlanan sentetik DNA omurga analoglarına sahip olan antisens oligonükleotitler 25 ayrıca yukarıda açıklandığı gibi fosforo-ditiyoat, metilfosfonat, fosforamidat, alkil fosfotriester, sülfamat, 3'-tiyoasetal, metilen(metilimino), 3'-karbamat ve morfolino karbamat nükleik asitleri içerebilir.

Birleştirici kimya metodolojisi buluşun sens ve antisens ksilanaz sekansları gibi herhangi bir hedefe doğru uygun bağlama afinitesine ve spesifitesine sahip olan 30 spesifik oligonükleotit için hızlıca taranabilen çok sayıda oligonükleotit oluşturmak için kullanılabilir (bkz, örn, Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

İnhibitör Ribozomlar

Ribozomlar ksilanaz mesajını bağlayabilir. Bu ribozomlar örn, mRNA'yı hedefleyerek ksilanaz aktivitesini inhibe edebilir. Ribozomları tasarlamaya ve hedefleme için ksilanaza özgü antisens sekansını seçmeye yönelik stratejiler bilimsel ve patent literatüründe iyi açıklanmıştır ve uzman kişi bu ribozomları tasarlayabilir. Ribozomlar hedef RNA'yı yaran bir enzimatik RNA kısmına yakın tutulan bir ribozomun hedef RNA bağlama kısmı aracılığıyla bir hedef RNA'ya bağlanarak işlev görür. Dolayısıyla ribozom tamamlayıcı baz-eşleştirme aracılığıyla bir hedef RNA'yı ayırt eder ve bağlar ve doğru alana bağlandıktan sonra hedef RNA'yı yarmak ve inaktive etmek için enzimatik olarak hareket eder. Bir hedef RNA'nın bu şekilde klevajı eğer klevaj kodlama sekansında meydana gelirse bunun kodlanmış bir protein sentezini yönlendirme kabiliyetini bozacaktır. Bir ribozom kendi RNA hedefine bağlanıp bunu yardıktan sonra tekrar yeni hedefleri bağlamak ve yarmak için bu RNA'dan ayrılabilir.

Bazı durumlarda bir ribozomun enzimatik yapısı antisens teknolojisi (burada bir nükleik asit molekülü transkripsiyonunu, translasyonunu veya başka bir molekülle ilişkisini bloke etmek için basitçe bir nükleik asit hedefine bağlanır) gibi başka teknolojiler üzerinde avantajlıdır çünkü ribozomun terapötik bir tedavi sağlamak için etkili konsantrasyonu bir antisens oligonükleotitinkinden düşürülebilir. Bu potansiyel avantaj ribozomun enzimatik olarak hareket etme kabiliyetini yansıtır. Dolayısıyla münferit bir ribozom molekülü hedef RNA'nın birçok molekülünü yarabilir. Ek olarak bir ribozom sadece bağlamanın baz eşleşme mekanizmasına değil aynı zamanda molekülün bağlandığı RNA'nın ekspresyonunu inhibe ettiği mekanizmaya bağlı olarak inhibisyon spesifitesinde dolayı tipik olarak son derece spesifik bir inhibitördür. Yani inhibisyona RNA hedefinin klevajı neden olur ve bu yüzden spesifite hedeflenen RNA'nın klevaj oranının hedeflenmeyen RNA'nın klevaj oranına oranı olarak tanımlanır. Bu klevaj mekanizması baz eşleştirmeye dahil olanlara ek faktörlere bağlıdır. Dolayısıyla bir ribozomun etkisinin spesifitesi aynı RNA alanını bağlayan antisens oligonükleotitinkinden daha büyüktür.

Buluşun ribozomu, örn, bir enzimatik RNA molekülü bir çekiç kafası motifi, bir firkete motifi, bir hepatit delta virüsü motifi, bir grup I intron motifi ve/veya bir RNA kılavuz sekansıyla ilişkili bir RNazP-benzeri RNA olarak oluşturulabilir. Çekiç kafası motiflerine ilişkin örnekler örn, Rossi (1992) Aids Research and Human Retroviruses 8:183 yayınında; firkete motifleri Hampel (1989) Biochemistry 28:4929, and Hampel (1990)

Nuc. Acids Res. 18:299 yayınında; hepatit delta virüsü motifi Perrotta (1992) Biochemistry 31:16 yayınında; RNazP motifi Guerrier-Takada (1983) Cell 35:849 yayınında ve grup I intron U.S. Pat. No. 4,987,071 sayılı patent belgesinde açıklanmıştır. Bu spesifik motiflerin belirtiminin kısıtlayıcı olması amaçlanmamıştır.

5 Teknikte uzman kişiler bu tür bir ribozomun, örn, bir enzimatik RNA molekülünün hedef gen RNA bölgelerinin biri veya daha fazlası için tamamlayıcı spesifik bir substrat bağlama alanına sahip olduğunu ayırt edecektir. Bir ribozom moleküle bir RNA yarma aktivitesi sağlayan substrat bağlama alanı içinde veya bunu çevreleyen bir nükleotit sekansına sahip olabilir.

10 **RNA interferans (RNAi)**

“RNAi” molekülü olarak adlandırılan bir RNA inhibitör molekülü buluşun bir ksilanaz enzim sekansını içerir. RNAi molekülü bir çift sarmallı RNA (dsRNA), örn, siRNA, miRNA ve/veya kısa firkete RNA (shRNA) molekülü içerebilir. RNAi molekülü, örn, siRNA (küçük inhibitör RNA) ve/veya miRNA (mikro RNA) bir ksilanaz mesajının

15 translasyonunu inhibe etmek için bir ksilanaz enzimi geninin ekspresyonunu inhibe edebilir. RNAi molekülü, örn, siRNA ve/veya miRNA uzunlukça yaklaşık 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 veya daha fazla çift nükleotittir. RNAi bir hücreye girebilir ve endojen mRNA'lar dahil olmak üzere benzer veya özdeş sekansların tek sarmallı RNA'sının (ssRNA) degradasyonuna neden olabilir. Bir hücre

20 çift sarmallı RNA'ya (dsRNA) maruz kaldığı zaman homolog genden mRNA RNA interferans (RNAi) olarak anılan bir işlem aracılığıyla seçici olarak degrade olur. RNAi'nin arkasındaki muhtemel temel mekanizma spesifik bir gen sekansını bir çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) kısa enterferansçı RNA olarak adlandırılan, kendi sekansı ile eşleşen mRNA'nın degradasyonunu tetikleyen küçük parçalara böler.

25 RNAi'ler gen susturma terapötiklerinde kullanılır, bkz, örn, Shuey (2002) Drug Discov. Today 7:1040-1046. RNA'yı seçici olarak degrade etmek için yöntemler bu RNAi moleküllerini, örn, siRNA ve/veya miRNA'yı kullanır. İşlem in vitro, ex vivo ya da in vivo uygulanabilir. RNAi molekülleri bir hücrede, bir organda, bir hayvanda bir fonksiyon kaybı mutasyonu oluşturmak için kullanılabilir.

30 RNAi'nin hücre içine dahil edilmesi bir RNAi (örn, mikroRNA) içeren bir RNA bağlama proteinine bağlanan bir hedef hücre spesifik ligandının içselleştirilmesi vasıtasıyla olur. Ligand kendine özgü bir hedef hücre yüzey antijenine özgüdür. Ligand hücre yüzeyi antijenine bağlanmadan sonra spontane olarak içselleştirilebilir. Eğer kendine özgü

hücre yüzeyi antijeni kendi ligandına bağlanmadan sonra doğal olarak içselleşmiyorsa içselleşme arjinin açısından zengin bir peptidin veya diğer membran geçirgen peptitlerin ligandın yapısına veya RNA bağlama proteinine dahil edilmesi veya bu tür bir peptidin liganda veya RNA bağlama proteinine takılması vasıtasıyla desteklenebilir. Bkz, 5 örn, U.S. 20060030003; 20060025361; 20060019286; 20060019258 sayılı patent yayınları. Bir yönde buluş buluşun nükleik asitlerini bir RNAi molekülü içeren nükleik asit-lipit parçacıkları olarak bir hücreye iletmek, örn, dahil etmek için lipit tabanlı formülasyonlar sağlar, bkz, örn, U.S. 20060008910 sayılı patent yayını.

10 RNA'yı seçici olarak degrade etmek için RNAi moleküllerini, örn, siRNA ve/veya miRNA yapmaya ve kullanmaya yönelik yöntemler teknikte iyi bilinmektedir, bkz, örn, U.S. 6,506,559; 6,511,824; 6,515,109; 6,489,127 sayılı patent belgeleri.

Nükleik Asitlerin Modifikasyonu

Buluşun nükleik asitlerinin varyantlarını üretme yöntemleri şablon nükleik asit tarafından kodlanan bir ksilanazinkinden farklı veya değiştirilmiş bir aktiviteye veya 15 farklı veya değiştirilmiş bir stabiliteye sahip olan ksilanazlar üretmek için çeşitli kombinasyonlarda tekrarlanabilir veya kullanılabilir. Bu yöntemler ayrıca örn, gen/ mesaj ekspresyonunda, mesaj translasyonunda veya mesaj stabilitesinde varyasyonlar oluşturmak için çeşitli kombinasyonlarda tekrarlanabilir veya kullanılabilir. Bir hücrenin genetik bileşimi örn, bir homolog genin ex vivo modifikasyonu, ardından 20 bunun hücre içine yeniden yerleştirilmesi vasıtasıyla değiştirilebilir.

Buluşun bir nükleik asidi herhangi bir araçla değiştirilebilir. Örneğin rastgele veya stokastik yöntemler veya stokastik olamayan veya "yönlendirilmiş evrim" yöntemleri, bkz, örn U.S. 6,361,974 sayılı patent belgesi. Genlerin rastgele mutasyonuna yönelik yöntemler teknikte iyi bilinmektedir, bkz, örn, U.S. 5,830,696 sayılı patent belgesi. 25 Örneğin mutagenler bir geni rastgele mutasyona uğratmak için kullanılabilir. mutagenler rekombinasyon vasıtasıyla onarıma uygun DNA kopmalarını indüklemek için tek başına veya kombinasyon halinde örn, ultraviyole ışık veya gama ışınması veya bir kimyasal mutagen, örn, mitosin, nitroz asit, fotoaktive psoralenler içerir. Diğer kimyasal mutagenler örneğin sodyum bisülfid, nitroz asit, hidroksilamin, hidrazin veya 30 formik asit içerir. Diğer mutagenler nükleotit öncüllerinin analoglarıdır, örn, nitrosoguanidin, 5-bromourasil, 2-aminopurin veya akridin. Bu ajanlar nükleotit öncülünün yerine bir PCR reaksiyonuna eklenebilir, bu sayede sekans mutasyona

uğrar. Proflavin, akriflavin, kuinakrin ve benzerleri gibi ekleme ajanları ayrıca kullanılabilir.

Moleküler biyolojideki herhangi bir teknik kullanılabilir, örn, rastgele PRC mutagenез, bkz, örn, Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471 veya kombinasyonel çoklu kaset mutagenезi, bkz, örn, Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196. Alternatif olarak nükleik asitler, örn, genler rastgele veya "stokastik" fragmentasyondan sonra yeniden düzenlenebilir, bkz, örn, U.S. 6,291,242; 6,287,862; 6,287,861; 5,955,358; 5,830,721; 5,824,514; 5,811,238; 5,605,793 sayılı patent belgeleri. Alternatif yönlerde modifikasyonlar, eklemeler veya silmeler hata eğilimli PCR, karıştırma, oligonükleotide yönelik mutagenез, düzenek PCR, cinsel PCR mutagenез, in vivo mutagenез, kaset mutagenезi, tekrarlı topluluk mutagenезi, katlamalı topluluk mutagenезi, alana özgü mutagenез, gen yeniden düzenlemesi (örn, GeneReassembly, bkz, örn., U.S. 6,537,776 sayılı patent belgesi), gen alanı doygunluk mutagenезi (GSSM), sentetik ligasyon yeniden düzenlemesi (SLR), rekombinasyon, tekrarlı sekans rekombinasyonu, fosfotiyolat modifiye edilmiş DNA mutagenезi, urasil içeren şablon mutagenезi, aralıklı dupleks mutagenезi, nokta eşleşme onarım mutagenезi, onarım eksik konak suşu mutagenезi, kimyasal mutagenез, radyojenik mutagenез, delesyon mutagenезi, kısıtlama-seçim mutagenезi, kısıtlama-safılaştırma mutagenезi, yapay gen sentezi, topluluk mutagenезi, kimerik nükleik asit multimer oluşturma ve/veya bunların ve diğer yöntemlerin bir kombinasyonu vasıtasıyla gerçekleştirilir.

Takip eden yayınlar buluşun yöntemlerine dahil edilebilen çeşitli tekrarlı rekombinasyon prosedürlerini ve/veya yöntemleri açıklamaktadır: Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties" Tumor Targeting 4:1-4; Ness (1999) Nature Biotechnology 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding" Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling" Nature Biotechnology 17:259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" Nature 391:288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling," Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" Proc. Natl. Acad. Sci. USA

94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" *Nature Medicine* 2:100-103; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor "headpiece dimer" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp.447-457; Cramer and Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; and Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Çeşitlilik oluşturmaya yönelik mutasyonel yöntemler örneğinin alana yönlendirilmiş mutagenesi (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; and Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); urasail içeren şablonları kullanan mutagenesi (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; and Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); oligonucleotide-directed mutagenesis (*Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure

for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; ve Zoller (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350); fosforotiyoat modifiye edilen DNA mutagenezi (Taylor (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; and Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); mutagenesis using gapped duplex DNA (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; and Fritz (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999) içerir.

Kullanılabilen ilave protokoller nokta eşleşme onarımını (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" *Cell* 38:879-887), mutagenesis using repair-deficient host strains (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443; and Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 154: 382-403), deletion mutagenesis (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" *Nucl. Acids Res.* 14: 5115); kısıtlama-seçim ve kısıtlama-saflaştırmayı (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition

state of subtilisin" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423), mutagenesis by total gene synthesis (Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" *Science* 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" *Gene* 34:315-323; and Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316), double-strand break repair (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181) içerir. Yukarıdaki yöntemlerin birçoğu hakkında ilave detaylar ayrıca çeşitli mutagenез yöntemleriyle ilişkili problemleri çözmeye yönelik faydalı kontroller açıklayan *Methods in Enzymology* Volume 154 yayınında bulunabilir.

Kullanılabilen protokoller, örn, Stemmer adına U.S. 5,605,793 (13 Şubat 1997), "Methods for In Vitro Recombination;" Stemmer adına U.S. No. 5,811,238 (22 Eylül 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" Stemmer adına U.S. No. 5,830,721 (3 Kasım 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" Stemmer adına U.S. No. 5,834,252 (10 Kasım 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction;" Minshull ve arkadaşları adına U.S. No. 5,837,458 (17 Kasım 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" WO 95/22625, Stemmer ve Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" WO 96/33207 Stemmer ve Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction;" WO 97/20078 Stemmer ve Cramer "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" WO 97/35966 Minshull ve Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" WO 99/41402 Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors;" WO 99/41383 by Punnonen et al. "Antigen Library Immunization;" WO 99/41369 Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering;" WO 99/41368 Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines;" EP 752008 Stemmer ve Cramer, "DNA Mutagenesis

by Random Fragmentation and Reassembly;" EP 0932670 by Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination;" WO 99/23107 Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling;" WO 99/21979 by Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors;" WO 98/31837
 5 by del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination;" WO 98/27230 Patten ve Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering;" WO 98/27230 by Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection," WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries," WO
 10 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences," WO 98/42832 Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers," WO 99/29902 Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences," WO 98/41653 by Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library," WO
 15 98/41622 Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling," and WO 98/42727 by Pati and Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination." sayılı patent belgelerinde açıklanmaktadır.

Kullanılabilen protokoller (çeşitli çeşitlilik oluşturma yöntemleriyle ilgili detaylar sağlayan) örn, U.S. (USSN) 09/407,800, "SHUFFLING OF CODON ALTERED
 20 GENES" Patten et al. filed Sep. 28, 1999; "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" del Cardayre et al., U.S. 6,379,964; "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" Crameri et al., U.S. 6,319,714; 6,368,861; 6,376,246; 6,423,542; 6,426,224 ve PCT/US00/01203; "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE
 25 SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" Welch et al., U.S. 6,436,675; "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" by Selifonov et al., 18 Ocak 2000, (PCT/US00/01202) ve örn, "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED
 30 CHARACTERISTICS" Selifonov et al., 18 Haziran 2000'de dosyalanmış (U.S. Ser. No. 09/618,579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" Selifonov ve Stemmer, f18 Haziran 2000'de dosyalanmış (PCT/US00/01138) ve "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID

TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" Affholter, 6 Eylül 2000'de dosyalanmış (U.S. 09/656,549); ve U.S. 6,177,263; 6,153,410 sayılı patent belgelerinde açıklanmıştır.

5 "Stokastik olmayan veya "yönlendirilmiş evrim" yöntemleri, örn, doygunluk mutagenezini (GSSM), sentetik ligasyon yeniden düzenlemesini (SLR) veya bunların bir kombinasyonunu içerir, yeni ve değiştirilmiş özellikleri olan (örn, yüksek asidik veya alkalın koşulları, yüksek veya düşük sıcaklıklar ve benzeri altında aktivite) ksilanazlar oluşturmak için buluşun nükleik asitlerini modifiye etmek için kullanılır. Modifiye edilmiş nükleik asitler tarafından kodlanana polipeptitler ksilan hidrolizi veya başka aktivite için 10 test edilmeden önce bir aktiviteye yönelik taranabilir. Herhangi bir test şekli veya protokolü kullanılabilir, örn, bir kapiler dizi platformu kullanılabilir. Bkz, örn, U.S. 6,361,974; 6,280,926; 5,939,250 sayılı patent belgeleri.

Gen Alanı Doygunluk Mutagenezi veya GSSM

Enzim yapmaya yönelik yöntemler burada ve U.S. 6,171,820 ve 6,579,258 sayılı 15 patent belgelerinde açıklandığı gibi Gen Alanı Doygunluk Mutagenezi veya GSSM kullanır. Bir dejenere N,N,G/T sekansı içeren kodon primerleri tekli amino asit ornatımlarının tam aralığının her bir amino asit pozisyonunda, örn, bir enzim aktif alanda veya modifiye edilecek ligand bağlama alanında bir amino asit kalıntısı olduğu bir dizi soy polipeptit oluşturmak için nokta mutasyonları bir polinükleotide, örn, buluşun 20 bir ksilanazına dahil etmek için kullanılır. Bu oligonükleotitler kesintisiz bir birinci homologsekans, bir dejenere N,N,G/T sekansı ve isteğe bağlı olarak bir ikinci homolog sekans içerebilir. Bu oligonükleotitlerin kullanımından aşağı yönde soy translasyonel ürünler polipeptit boyunca her bir amino asit alanındaki muhtemel bütün amino asit değişimlerini içerir çünkü N,N,G/T sekansının dejenere olması 20 amino asidin tamamı 25 için kodonları içerir. Bu tür bir dejenere oligonükleotit (örn, bir dejenere N,N,G/T kasetinden oluşan) bir parental polinükleotit şablonundaki her bir orijinal kodonun tam aralıklı kodon ornatımlarına tabi tutulması için kullanılabilir. Veya bir parental polinükleotit şablonundaki en az iki orijinal kodonu tam aralıklı bir kodon ornatımına tabi tutulmak için en az iki dejenere kaset kullanılabilir - gerek aynı oligonükleotitte 30 gerekse başkasında. Örneğin birden fazla N,N,G/T sekansı amino asit mutasyonlarını birden fazla alana dahil etmek için bir oligonükleotitte bulunabilir. Bu birden çok N,N,G/T sekansı doğrudan kesintisiz olabilir veya bir veya daha fazla ilave nükleotit sekansı (sekansları) ile ayrılabilir. Eklmeleri ve silmeleri dahil etmek için hizmet

verebilen oligonükleotitler gerek tek başına gerekse bir N,N,G/T sekansını içeren kodonlarla kombinasyon halinde amino asit eklemelerinin, silmelerinin ve/veya ornatımlarının herhangi bir kombinasyonunu veya permütasyonunu gerçekleştirmek için kullanılabilir.

- 5 İki veya daha fazla kesintisiz amino asit pozisyonunun eş zamanlı mutagenezi kesintisiz N,N,G/T üçlüleri, başka bir deyişle bir dejenere (N,N,G/T)n sekansı içeren bir oligonükleotit kullanarak yapılır. N,N,G/T sekansından daha az dejenerasyona sahip dejenere kasetler kullanılabilir. Örneğin bazı durumlarda sadece bir N'den oluşan bir dejenere üçlü sekans kullanılması istenebilir (örn, bir oligonükleotitte), burada söz
- 10 konusu N üçlünün birinci, ikinci veya üçüncü pozisyonunda olabilir. Herhangi bir kombinasyonunu ve permütasyonunu içeren herhangi başka bir baz üçlünün geriye kalan iki pozisyonunda kullanılabilir. Alternatif olarak bazı durumlarda (örn, bir oligoda) bir dejenere N,N,N üçlü sekansı kullanılması tercih edilebilir.

- Dejenere üçlülerin (örn, N,N,G/T üçlüleri) kullanımı tam aralıklı muhtemel doğal amino
- 15 asitlerin (toplam 20 amino asit için) bir polipeptit içinde her bir amino asit pozisyonunda sistematik ve kolay oluşumuna olanak sağlar (alternatif yönlerde yöntem ayrıca amino asit kalıntısı veya kodonu, pozisyonu başına hepsinden az muhtemel ornatımların oluşmasını içerir). Örneğin 100 amino asitlik bir polipeptit için 2000 ayrı tür (başka bir deyişle X pozisyon 100 amino asit pozisyonu başına 20 muhtemel amino asit)
- 20 oluşturulabilir. Bir oligonükleotit veya bir dejenere N,N,G/T üçlüsünü içeren bir dizi oligonükleotit kullanımı aracılığıyla 20 muhtemel doğal amino asidin tamamı için 23 bireysel sekans kodlanabilir. Dolayısıyla bir parental polinükleotit sekansının en az bir tane bu tür oligonükleotit kullanarak doygunluk mutagenezine tabi tutulduğu bir reaksiyon kabında 20 farklı polipeptiti kodlayan 32 farklı soy polipeptit oluşturulur.
- 25 Bunun aksine alana yönlendirilmiş mutagenezde dejenere olmayan bir oligonükleotit kullanımı reaksiyon kabı başına sadece bir soy polipeptit ürününe neden olur. Dejenere olmayan oligonükleotitler bir yönde açıklanan dejenere primerlerle kombinasyon halinde kullanılabilir; örneğin dejenere olmayan oligonükleotitler bir çalışan polinükleotitte spesifik nokta mutasyonlar oluşturmak için kullanılabilir. Bu
- 30 spesifik sessiz nokta mutasyonları, karşılık gelen amino asit değişimlerine neden olan nokta mutasyonları ve durdurma kodonlarının ve polipeptit fragmanlarının karşılık gelen ekspresyonunun oluşmasına neden olan nokta mutasyonları oluşturmak için bir araç sağlar.

Bir yönde her bir doygunluk mutagenezi reaksiyon kabı 20 doğal amino asidin tamamının parental polinükleotitte mutageneze tabi olan kodon pozisyonuna karşılık gelen bir spesifik amino asit pozisyonunda sunulacağı şekilde en az 20 soy polipeptit molekülünü kodlayan polinükleotitler içerir (diğer yönler 20 doğal kombinasyonun tamamından azını kullanır). Her bir doygunluk mutagenezi reaksiyon kabından oluşturulan 32 kat dejenere soy polipeptiti klonal amplifikasyona tabi tutulabilir (örn, uygun bir konak, örn, E. coli konak içine örn, bir ekspresyon vektörü kullanılarak klonlanabilir) ve ekspresyon taramaya tabi tutulabilir. Bir bireysel soy polipeptiti progenitördeki faydalı bir değişimi göstermek için taranarak tanımlandığı zaman (parental polipeptitle karşılaştırıldığı zaman alkali veya asidik koşullar altında artan ksilan hidrolizi gibi) burada saklanan karşılık olarak faydalı amino asit ornatımını tanımlamak için sekanslanabilir.

Doygunluk mutagenezi kullanarak her bir parental polipeptitteki her bir amino asit pozisyonunun mutageneze tabi tutulması üzerine faydalı amino asit değişimleri birden fazla amino asit pozisyonunda tanımlanabilir. Bir veya daha fazla yeni soy molekülü oluşturulabilmekte olup, bunlar bu faydalı amino asit ornatımlarının tamamının veya bir kısmının bir kombinasyonunu içerir. Örneğin eğer 2 spesifik faydalı amino asit değişimi bir polipeptitteki 3 amino asit pozisyonunun her birinde tanımlanırsa permütasyonlar her bir pozisyonda 3 olasılığı (orijinal amino asitten değişiklik yok ve iki tanesinden her biri faydalı değişiklikler) ve 3 pozisyonu içerir. Dolayısıyla önceden incelenen 7 tanesi de dahil olmak üzere toplam $3 \times 3 \times 3$ veya 27 olasılık vardır - 6 münferit nokta mutasyonu (başka bir deyişle üç pozisyonun her birinde 2 tane) ve herhangi bir pozisyonda değişim yok.

Alan doygunluk mutagenezi karıştırma, kimerizasyon, rekombinasyon ve tarama ile birlikte diğer mutagenez işlemlerinde kullanılabilir. Doygunluk mutagenezi dahil olmak üzere herhangi bir mutageneze tabi tutma işlemi tekrarlı bir şekilde kullanılabilir. Herhangi bir mutageneze tabi tutma işleminde (işlemlerinde) tekrarlı kullanımı tarama ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

Tescilli kodon primerleri (bir dejenere N,N,N sekansı içermektedir) tam aralıklı bir tekli amino asit ornatımının her bir amino asit pozisyonunda sunulduğu bir soy polipeptit oluşturmak üzere nokta mutasyonların bir polinükleotite yerleştirilmesi için kullanılabilir (gen alan doygunluk mutagenezi (GSSSM)). Kullanılan oligolar kesintisiz olarak bir birinci homolog sekanstan, bir dejenere N,N,N sekansından ve tercih edilen şekliyle

ancak şart olmamak kaydıyla bir ikinci homolog sekanstan oluşur. Bu oligoların kullanımından aşağı yönde soy translasyonel ürünler polipeptit boyunca her bir amino asit alanındaki muhtemel bütün amino asit değişimlerini içerir çünkü N,N,G/T sekansının dejenere olması 20 amino asidin tamamı için kodonları içerir.

- 5 Bu tür bir dejenere oligon (bir dejenere N,N,N kasetinden oluşan) bir parental polinükleotit şablonundaki her bir orijinal kodonun tam aralıklı kodon ornatımlarına tabi tutulması için kullanılır. Veya bir parental polinükleotit şablonundaki en az iki orijinal kodonu tam aralıklı bir kodon ornatımına tabi tutulmak için en az iki dejenere N,N,N kaseti kullanılabilir - gerek aynı oligoda gerekse başkasında. Dolayısıyla birden fazla
- 10 N,N,N sekansı amino asit mutasyonlarını birden fazla alana dahil etmek için bir oligoda bulunabilir. Bu birden çok N,N,N sekansı doğrudan kesintisiz olabilir veya bir veya daha fazla ilave nükleotit sekansı (sekansları) ile ayrılabilir. veya eklemeleri ve silmeleri dahil etmek için hizmet verebilen oligolar gerek tek başına gerekse bir N,N,N sekansını içeren kodonlarla kombinasyon halinde amino asit eklemelerinin, silmelerinin ve/veya
- 15 ornatımlarının herhangi bir kombinasyonunu veya permütasyonunu gerçekleştirmek için kullanılabilir.

İki veya daha fazla kesintisiz amino asit pozisyonunun eş zamanlı mutagenезinin kesintisiz N,N,N üçlüleri, başka bir deyişle bir dejenere (N,N,N)_n sekansı içeren bir oligo kullanarak yapılması muhtemeldir

- 20 N,N,N sekansından daha az dejenereye sahip dejenere kasetler kullanılabilir. Bazı durumlarda sadece bir N'den oluşan bir dejenere üçlü sekans kullanılması istenebilir (örn, bir oligoda), burada söz konusu N üçlünün birinci, ikinci veya üçüncü pozisyonunda olabilir. Herhangi bir kombinasyonunu ve permütasyonunu içeren herhangi başka bir baz üçlünün geriye kalan iki pozisyonunda kullanılabilir. Alternatif
- 25 olarak bazı durumlarda (örn, bir oligoda) bir dejenere N,N,N üçlü sekansı, N,N,G/T veya bir N,N, G/C üçlü sekansı kullanılması tercih edilebilir.

- Ancak bir dejenere üçlünün (N,N,G/T veya bir N,N G/C üçlü sekansının) kullanımının çeşitli nedenlerden dolayı avantajlı olduğu takdir edilecektir. Tam aralıklı muhtemel amino asitlerin bir polipeptitteki her bir amino asit pozisyonuna ornatımını (toplam 20
- 30 amino asit) sistematik ve adil ve kolay şekilde oluşturmak için bir araç olabilir. Dolayısıyla 100 amino asitlik bir polipeptit için buluş 2000 farklı türü sistematik ve adil ve kolayca oluşturmak için bir yol sağlamaktadır (başka bir deyişle, pozisyon başına

20 muhtemel amino asit çarpı 100 amino asit). Bir dejenere N,N,G/T veya bir N,N G/C üçlü sekansını içeren bir oligonun kullanımı aracılığıyla 20 muhtemel amino asidi kodlayan 32 bireysel sekans sağlandığı takdir edilecektir. Dolayısıyla bir parental polinükleotit sekansının en tane bu tür oligo kullanarak doygunluk mutagenezine tabi tutulduğu bir reaksiyon kabında 20 farklı polipeptiti kodlayan 32 farklı soy polipeptit oluşturulur. Bunun aksine alana yönlendirilmiş mutagenezde dejenere olmayan bir oligo kullanımı reaksiyon kabı başına sadece bir soy polipeptit ürününe neden olur.

Açıklanan dejenere primerlerle kombinasyon halinde dejenere olmayan oligolar kullanılabilir. Bazı durumlarda bir çalışma polinükleotitinde spesifik nokta mutasyonlar oluşturmak için dejenere olmayan oligoların kullanılmasının avantajlı olduğu takdir edilmelidir. Bu spesifik sessiz nokta mutasyonları, karşılık gelen amino asit değişimlerine neden olan nokta mutasyonları ve durdurma kodonlarının ve polipeptit fragmanlarının karşılık gelen ekspresyonunun oluşmasına neden olan nokta mutasyonları oluşturmak için bir araç sağlar.

Her bir doygunluk mutagenezi reaksiyon kabı 20 amino asidin tamamının parental polinükleotitte mutageneze tabi olan kodon pozisyonuna karşılık gelen bir spesifik amino asit pozisyonunda sunulacağı şekilde en az 20 soy polipeptit molekülünü kodlayan polinükleotitler içerir (diğer yönler 20 doğal kombinasyonun tamamından azını kullanır). Her bir doygunluk mutagenezi reaksiyon kabından oluşturulan 32 kat dejenere soy polipeptiti klonal amplifikasyona tabi tutulabilir (örn, uygun bir konak, örn, E. coli konak içine örn, bir ekspresyon vektörü kullanılarak klonlanabilir) ve ekspresyon taramaya tabi tutulabilir. Bir bireysel soy polipeptiti progenitördeki faydalı bir değişimi göstermek için taranarak tanımlandığı zaman (parental polipeptitle karşılaştırıldığı zaman) burada saklanan karşılık olarak faydalı amino asit ornatımını tanımlamak için sekanslanabilir.

Doygunluk mutagenezi kullanarak her bir parental polipeptitteki her bir amino asit pozisyonunun mutageneze tabi tutulması üzerine faydalı amino asit değişimlerinin birden fazla amino asit pozisyonunda tanımlanabildiği takdir edilecektir. Bir veya daha fazla yeni soy molekülü oluşturulabilmekte olup, bunlar bu faydalı amino asit ornatımlarının tamamının veya bir kısmının bir kombinasyonunu içerir. Örneğin eğer 2 spesifik faydalı amino asit değişimi bir polipeptitteki 3 amino asit pozisyonunun her birinde tanımlanırsa permütasyonlar her bir pozisyonda 3 olasılığı (orijinal amino asitten değişiklik yok ve iki tanesinden her biri faydalı değişiklikler) ve 3 pozisyonu

içerir. Dolayısıyla önceden incelenen 7 tanesi de dahil olmak üzere toplam $3 \times 3 \times 3$ veya 27 olasılık vardır - 6 münferit nokta mutasyonu (başka bir deyişle üç pozisyonun her birinde 2 tane) ve herhangi bir pozisyonda değişim yok.

5 Doygunluk mutagenezi dolayısıyla iki veya daha fazla ilişkili polinükleotitin bir hibrit polinükleotitin rekombinasyon ve redüktif tekrar sıralama vasıtasıyla oluşturulacağı şekilde uygun bir konak hücre içine dahil edildiği işlem gibi ilave mutageneze tabi tutma işlemleri ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

10 Bir genin tüm sekansı boyunca mutagenez gerçekleştirmeye ek olarak mutagenez bir polinükleotit sekansında herhangi bir sayıda bazı değiştirmek için kullanılabilir, burada mutageneze tabi tutulacak bazların sayısı tercih edilen şekliyle 15 ila 100,000 arasındaki her bir tamsayıdır. Dolayısıyla bir molekül boyunca her bir pozisyonu mutageneze tabi tutmak yerine bir kişi her bir veya farklı sayıda (tercih edilen şekliyle 15 ila 100,000'lik bir alt dizi) bazı mutageneze tabi tutabilir. Tercih edilen şekliyle bir polinükleotit sekansı boyunca her bir pozisyonu veya pozisyon grubunu mutageneze 15 tabi tutmak için ayrı bir nükleotit kullanılır. Mutageneze tabi olacak 3 pozisyonluk bir grup bir kodon olabilir. Mutasyonlar tercih edilen şekliyle ayrıca bir mutagenik kaset olarak anılan bir heterolog kaset içeren bir mutagenik primer kullanılarak gerçekleştirilebilir. Örnek kasetler 1 ila 500 baza sahip olabilir. Bu tür bir heterolog kasetteki her bir nükleotit pozisyonu N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, 20 A/G/T, A/C/T, A/C/G veya E olabilir, burada E A, C, G veya T olmayan herhangi bir bazdır (E bir tasarımcı oligo olarak anılabilmektedir).

Genel bir anlamda doygunluk mutagenezi mutageneze tabi tutulacak tanımlı polinükleotit sekansındaki (burada mutageneze tabi tutulacak sekans tercih edilen şekliyle uzunlukça yaklaşık 15 ila 100,000 bazdır) bir tam mutagenez kaseti dizisinin 25 (burada her bir kaset tercih edilen şekliyle uzunlukça 1-500 bazdır) mutageneze tabi tutulmasından oluşur. Dolayısıyla bir mutasyon grubu (1 ila 100 mutasyon arasında değişmektedir) mutageneze tabi tutulacak her bir kasete dahil edilir. Bir kasete dahil edilecek mutasyonların gruplanması doygunluk mutagenezinin bir turunun uygulanması sırasında bir ikinci kasete dahil edilecek mutasyonların ikinci 30 gruplandırmasıyla aynı veya farklı olabilir. Bu gruplandırma silmeler, eklemeler, belirli kodonların gruplandırılmaları ve belirli nükleotit kasetlerinin gruplandırılmaları ile örneklendirilebilir.

Mutageneze tabi tutulacak tanımlı sekanslar bir tam gen, yol, cDNA, bir tam açık okuma penceresi (ORF) ve tam promotör, arttırıcı, represör/transaktivatör, replikasyon orijini, intron, operatör veya herhangi bir polinükleotit fonksiyonel grubunu içerir. Genel olarak bu amaç doğrultusunda “tanımlı sekanslar” bir 15 bazlı polinükleotit sekansının ve 15 baz ve 15,000 baz arasında uzunluklu polinükleotit sekanslar olduğu herhangi bir sekans olabilir (bu buluş spesifik olarak aradaki her bir tamsayıyı adlandırmaktadır). Kodonların gruplandırmalarının seçimindeki değerlendirmeler bir dejenere mutagenik kaset tarafından kodlanan amino asit türlerini içerir.

Bir mutagenik kasete dahil edilebilen mutasyonların gruplandırmasına ilişkin olarak her bir pozisyonda 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 20 amino asit ve bu sayede kodlanan bir polipeptit kütüphanesi kodlayan dejenere kodon ornatımları (dejenere oligoları kullanmaktadır) sağlanmaktadır.

Sentetik Ligasyon Yeniden Düzenlemesi (SLR)

“Sentetik ligasyon yeniden düzenlemesi” veya basitçe “SLR”, bir “yönlendirilmiş evrim işlemi” olarak adlandırılan bir stokastik olmayan gen modifikasyon sistemi buluşun yeni ve değiştirilmiş özellikleri olan polipeptitlerini oluşturmak için kullanılabilir.

SLR oligonükleotit fragmanlarının stokastik olmayan bir şekilde birlikte ligatlanmasına ilişkin bir yöntemdir. Bu yöntem nükleik asit yapı bloklarının karıştırılmaması, bağlanmaması veya rastgele kimerize edilmemesi ancak bunun yerine stokastik olmayan bir şekilde düzenlenmesi açısından stokastik oligonükleotit karıştırmadan farklılaşır. Bkz, örn, U.S. 6,773,900; 6,740,506; 6,713,282; 6,635,449; 6,605,449; 6,537,776 sayılı patent belgesi. SLR aşağıdaki adımları içerir: (a) bir şablon polinükleotit sağlanması, burada şablon polinükleotit bir homolog geni kodlayan sekansı içerir; (b) birden çok yapı bloğu polinükleotitinin sağlanması, burada yapı bloğu polinükleotitleri önceden belirlenmiş bir sekansta şablon polinükleotitle çapraz yeniden düzenleme için tasarlanır ve bir yapı bloğu polinükleotiti homolog genin bir varyantı ve varyant sekansı yandan destekleyen şablon polinükleotite homolog bir sekans olan bir sekans içerir; (c) bir yapı bloğu polinükleotitinin bir şablon polinükleotitle yapı bloğu polinükleotitinin homolog gen sekansı varyasyonları içeren polinükleotitler oluşturmak için şablon polinükleotitle çapraz yeniden düzenleneceği şekilde kombine edilmesi.

SLR yeniden düzenlenecek polinükleotitler arasında yüksek homoloji seviyelerinin mevcudiyetine bağlı değildir. Dolayısıyla bu yöntem 10^{100} fazla farklı kimeradan oluşan

soy moleküllerinin kütüphanelerini (veya dizilerini) stokastik olmayan şekilde oluşturmak için kullanılabilir. SLR 10^{1000} fazla farklı soy kimeradan oluşan kütüphaneler oluşturmak için kullanılabilir. Dolayısıyla stokastik olmayan yöntemler tasarım vasıtasıyla seçilen bir tam düzenek sırasına sahip olan nihai kimerik nükleik asit

5 molekülü dizisi üretebilir. Bu yöntem elverişli karşılıklı olarak uyumlu ligatlanabilir uçlara sahip olan birden çok spesifik nükleik asidin tasarım vasıtasıyla oluşturulması ve bu nükleik asit yapı bloklarının tasarlanan tam bir düzenek sırasına erişilecek şekilde düzenlenmesi adımlarını içerir.

Düzenlenecek nükleik asit yapı bloklarının karşılıklı olarak uyumlu ligatlanabilir uçları

10 eğer bunlar önceden belirlenmiş yapı bloklarını birleştirmeyi sağlarsa bu sıralanmış düzenek tipi için "elverişli" olarak değerlendirilir. Dolayısıyla nükleik asit yapı bloklarının birleştirilebildiği tam düzenek sırası ligatlanabilir uçların tasarımı vasıtasıyla belirlenir. Eğer birden fazla düzenek adımı kullanılacaksa o zaman nükleik asit yapı blokları birleştirilebildiği tam düzenek sırası ayrıca düzenek adımının (adımlarının) ardışık

15 sırası vasıtasıyla belirlenir. Yapı parçalarının kovalent bağlanmasına erişmek için tavllanmış yapı parçaları bir ligaz (örn, T4 DNA ligaz) gibi bir enzimle işleme tabi tutulabilir.

Oligonükleotit yapı bloklarının tasarımı nihai kimerik polinükleotitlerin bir soy dizisini üretmek için bir taban olarak işlev gören bir progenitör nükleik asit sekansı şablonu

20 dizisinin analiz edilmesi vasıtasıyla elde edilebilir. Bu parental oligonükleotit şablonları dolayısıyla mutageneze tabi tutulacak, örn, kimerize edilecek veya karıştırılacak nükleik asit yapı bloklarının tasarımına yardımcı olan bir sekans bilgisi kaynağı olarak işlev görür. Birden çok parental nükleik asit şablonunun sekansları bir veya daha fazla demarkasyon noktasını seçmek için hizalanabilir. Demarkasyon noktaları bir homoloji

25 alanına yerleştirilebilir ve bir veya daha fazla nükleotitten oluşur. Bu demarkasyon noktaları tercih edilen şekliyle progenitör şablonların en az ikisi tarafından paylaşılır. Bu sayede demarkasyon noktaları parental polinükleotitleri yeniden düzenlemek için oluşturulacak oligonükleotit yapı bloklarının sınırlarını betimlemek için kullanılabilir. Progenitör moleküllerde tanımlanan ve seçilen bu demarkasyon noktaları nihai kimerik

30 soy moleküllerinin düzeneğinde potansiyel kimerizasyon noktaları olarak işlev görür. Bir demarkasyon noktası en az iki parental polinükleotit sekansı tarafından paylaşılan bir homoloji alanı (en az bir homolog nükleotit bazından oluşmaktadır) olabilir. Alternatif olarak bir demarkasyon noktası parental polinükleotit sekanslarının en azından yarısı

tarafından paylaşılan bir homoloji alanı olabilir veya parental polinükleotit sekanslarının en az üçte ikisi tarafından paylaşılan bir homoloji alanı olabilir. Daha da çok tercih edilen şekliyle elverişli bir demarkasyon noktası parental polinükleotit sekanslarının dörtte üçü tarafından paylaşılan bir homoloji alanıdır veya parental polinükleotit sekansının neredeyse tamamı tarafından paylaşılır. Bir demarkasyon noktası parental polinükleotit sekanslarının tamamı tarafından paylaşılan bir homoloji noktasıdır.

Bir ligasyon yeniden düzenleme işlemi soy kimerik polinükleotitlerin kapsamlı bir kütüphanesini oluşturmak için kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Başka bir deyişle nükleik asit yapı bloklarının bütün olası sıralanmış kombinasyonları nihai kimerik nükleik asit molekül dizisinde sunulmaktadır. Aynı zamanda düzenek sırası (başka bir deyişle her bir nihai kimerik nükleik asidin 5' ile 3 sekansındaki her bir yapı bloğunun düzenek sırası) her bir kombinasyonda yukarıda açıklandığı gibi tasarım vasıtasıyla (veya stokastik olmayan şekilde) olur. Stokastik olmayan yapıdan dolayı istenmeyen yan ürünlerin olasılığı büyük ölçüde düşürülür.

Ligasyon yeniden düzenleme yöntemi sistematik olarak gerçekleştirilebilir. Orneğin yöntem sistematik olarak bölümlere ayrılmış bir soy molekül kütüphanesi oluşturmak için gerçekleştirilmekte olup, bölümler örn, teker teker sistematik olarak taranabilir. Başka bir deyişle sıralı olarak kademelendirilen düzenek reaksiyonlarının seçici ve makul kullanımıyla birleştirilen spesifik nükleik asit bloklarının seçici ve makul kullanımı aracılığıyla spesifik soy ürünü dizilerinin çeşitli reaksiyon kaplarının her birinde yapıldığı bir tasarıma erişilebilir. Bu sistematik incelemeye ve tarama prosedürlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Dolayısıyla bu yöntemler potansiyel olarak çok fazla sayıda soy molekülünün daha küçük gruplar halinde incelenmesine olanak sağlar. Son derece esnek yine de kapsamlı ve aynı zamanda sistematik olan bir şekilde kimerizasyon gerçekleştirme kabiliyetinden dolayı özellikle progenitor moleküller arasında düşük bir homoloji seviyesi olduğu zaman bu yöntemler çok sayıda soy molekülünden oluşan bir kütüphanenin (veya dizinin) oluşmasını sağlar. Stokastik olmayan yapısından dolayı oluşturulan soy molekülleri tercih edilen şekliyle tasarım vasıtasıyla seçilen bir tam düzenek sırasına sahip olan nihai kimerik nükleik asitlerden bir kütüphane içerir. Doygunluk mutagenezi ve optimize yönlendirilmiş evrim yöntemleri de ayrıca farklı soy moleküler türleri oluşturmak için kullanılabilir. Bunun demarkasyon noktalarına, nükleik asit yapı bloklarının büyüklüğüne ve sayısına ve kenetlenmelerin büyüklüğüne ve tasarımına yönelik olarak seçim ve kontrol serbestliği

sağladığı takdir edilecektir. Ayrıca moleküller arası homolojiye yönelik gereksinimin bu buluşun işlerliği açısından son derece rahatlamış olduğu takdir edilecektir. Aslında demarkasyon noktaları çok az ya da hiç moleküller arası homoloji alanlarında seçilebilir. Örneğin kodon oynamasından, başka bir deyişle kodonların dejenere olmasından dolayı nükleotit ornatımları karşılık gelen progenitör şablonunda orijinal olarak kodlanan amino asit değiştirilmeden nükleik asit yapı bloklarının içine yerleştirilebilir. Alternatif olarak bir kodon orijinal bir amino aside yönelik kodlamanın değiştirileceği şekilde değiştirilebilir. Bu yöntem bu ornatımların moleküller arası homolog demarkasyon noktalarının meydana gelmesini arttırmak ve dolayısıyla yapı blokları arasında artan sayıda kenetlenmeye olanak sağlamak için nükleik asit yapı blokları içine yerleştirilebilir, bu da karşılığında çok fazla sayıda soy kimerik molekülünün oluşturulmasına olanak sağlar.

Sentetik gen yeniden düzenlemesi

Sentetik gen yeniden düzenlenmesi olarak adlandırılan stokastik olmayan bir yöntem (örn, Gen Yeniden Düzenlemesi, bkz, örn, U.S. Patent No. 6,537,776) stokastik karıştırmadan nükleik asit yapı bloklarının karıştırılmaması veya konsantre edilmemesi veya rastgele şekilde kimerize edilmemesi ancak bunun yerine stokastik olmayan bir şekilde düzenlenmesi açısından farklılık gösterir.

Sentetik gen yeniden düzenlemesi karıştırılacak polinükleotitler arasında yüksek homoloji seviyelerinin mevcudiyetine bağlı değildir. Yöntem 10^{100} fazla farklı kimeradan oluşan soy moleküllerinin kütüphanelerini (veya dizilerini) stokastik olmayan şekilde oluşturmak için kullanılabilir. Muhtemelen sentetik gen yeniden düzenlemesi 10^{1000} fazla farklı soy kimerasından oluşan kütüphaneler oluşturmak için kullanılabilir.

Stokastik olmayan bir yöntem tasarım vasıtasıyla seçilen bir nihai kimerik nükleik asit dizisi üretebilmekte olup, burada yöntem elverişli karşılıklı olarak uyumlu ligatlanabilir uçlara sahip olan birden çok nükleik asit yapı bloğunun tasarım vasıtasıyla oluşturulması ve bu nükleik asit yapı bloklarının tasarlanan bir tam düzenek sırasına erişileceği şekilde düzenlenmesi adımlarından oluşur.

Sentetik gen yeniden düzenlemesi 1) bir veya daha fazla atadan gelen veya parental jenerasyon şablonundan (şablonlarından) en az bir nokta mutasyona, eklemeye, silmeye &/veya kimerizasyona erişmek için mutageneze tabi tutulan molekülün (moleküllerin) (bir polinükleotit sekansı, örn, sekansı kodlayan bir polipeptit içeren bir

molekül dahil olmak üzere) bir soy jenerasyonunun hazırlanmasına; 2) soy jenerasyon molekülünün (moleküllerinin) örn, ilgili en az bir özellik için (bir enzim aktivitesinde bir gelişme gibi) yüksek çıktılı bir yöntem kullanılarak taranmasına; 3) bir yönde parental &/veya soy jenerasyon molekülüleriyle ilişkili olarak yapısal &/veya fonksiyonel bilginin elde edilmesine &/veya kataloglanmasına ve 4) bir yönde adımlar 1) ila 3)'ün herhangi birinin tekrar edilmesine ilişkin bir yöntem içerir. "Kodon alan-doygunluk mutagenesi" olarak adlandırılan durumda (örn, bir ana polinükleotit şablonundan) her bir kodonun (veya aynı amino asidi kodlayan dejenere kodonların her bir ailesinin) her bir kodon pozisyonunda temsil edileceği şekilde her biri en fazla üç kesintisiz nokta mutasyonundan (başka bir deyişle yeni bir kodon içeren farklı bazlardan) oluşan bir diziye sahip olan bir polinükleotit soy jenerasyonu oluşturulabilir. Bu polinükleotit progenitör jenerasyonuna karşılık gelen ve bunun tarafından kodlanan ayrıca her biri en az bir tekli amino asit nokta mutasyonuna sahip olan bir soy polipeptit dizisi oluşturulmasıdır. "Amino asit alan-doygunluk mutagenesi" olarak adlandırılan durumda polipeptit boyunca her bir amino asit pozisyonunda doğal olarak kodlanan 19 polipeptit oluşturan alfa-amino asit ornatımı için bu tür bir mutant oluşturulabilir. Bu parental polipeptit boyunca her bir amino asit pozisyonu için orijinal amino asit dahil olmak üzere toplamda 20 farklı progenitör polipeptiti veya potansiyel olarak eğer 20 doğal olarak kodlanan amino asit yerine ya da buna ek olarak ilave amino asitler kullanılmışsa potansiyel olarak 21'den fazla soy polipeptiti oluşturulabilir.

Dolayısıyla bu yaklaşım 20 doğal olarak kodlanan polipeptit oluşturan alfa-amino asitler, diğer nadir &/veya doğal olarak kodlanmamış amino asitler ve amino asit türevleri içeren, bunlara ek olarak &/veya bunlarla kombinasyon halinde mutantlar oluşturmak için elverişlidir. Bu yaklaşık ayrıca uygun konakların doğal veya değiştirilmemiş kodon ayırt etme sistemlerine ek olarak &/veya bunlarla kombinasyon hainde değiştirilmiş, mutagenese tabi tutulmuş &/veya tasarımcı kodon ayırt etme sistemlerinin kullanımı (bir konak hücrede bir veya daha fazla değiştirilmiş tRNA molekülü ile) vasıtasıyla mutantların oluşturulması için elverişlidir.

Bir polipeptiti kodlayan polinükleotitler hazırlamaya yönelik bir yöntem kısmi homoloji içeren polinükleotit sekanslarının in vivo tekrar sıralanmasına, en az bir polinükleotit oluşturmak için polinükleotitlerin düzenlenmesine ve faydalı bir özelliğe sahip olan polipeptitin (polipeptitlerin) üretimi için polinükleotitlerin taranmasına ilişkin bir yöntem vasıtasıyla olabilir.

- Bu yöntem herhangi bir moleküler özellikle (örn, bir enzimatik aktivite) veya mevcut teknolojinin olanak sağladığı özelliklerin kombinasyonlarıyla ilişkili olarak erişilen herhangi bir mutasyonel değişimin etkilerinin (özellikle doygunluk mutagenezi dahil olmak üzere) analiz edilmesi ve kataloglanması için elverişlidir. Dolayısıyla bir parental polipeptitteki her bir amino asidin en az 19 muhtemel ornatımın her birine değiştirilmesinin etkisini belirlemek için kapsamlı bir yöntem sağlanmaktadır. Bu bir parental polipeptitteki her bir amino asidin polipeptitin ölçülebilir özelliği üzerindeki kendi potansiyel etki spektrumuna göre karakterize edilmesine ve kataloglanmasına olanak sağlar.
- 10 Bir nükleik asit yapı bloğu yoluyla bir kimerik soy molekülünün içine bir intron yerleştirilebilir. İntronlar genellikle bunları işlevsel kılmak için her iki terminalde konsensüs sekanslara sahiptir. Gen uç birleştirmesini sağlamasına ek olarak intronlar homolog rekombinasyonu sağlamak için diğer nükleik asitlere homoloji alanları sağlayarak ilave bir amaca hizmet edebilir. Bu amaç ve potansiyel olarak diğerleri
- 15 doğrultusunda bazen bir intronu yerleştirmek için büyük bir nükleik asit yapı bloğu oluşturmak istenebilir. Eğer büyüklük iki tek sarmallı oligonun doğrudan kimyasal sentezi vasıtasıyla kolaylıkla oluşturuluyorsa bu tür bir özelleştirilmiş nükleik asit yapı bloğu ayrıca ikiden fazla tek sarmallı oligonun doğrudan kimyasal sentezi vasıtasıyla veya bir polimeraz tabanlı amplifikasyon reaksiyonu kullanılarak oluşturulabilir.
- 20 Düzenlenecek nükleik asit yapı bloklarının karşılıklı olarak uyumlu ligatlanabilir uçları eğer bunlar önceden belirlenmiş yapı bloklarını birleştirmeyi sağlarsa bu sıralanmış düzenek tipi için “elverişli” olarak değerlendirilir. Dolayısıyla nükleik asit yapı bloklarının birleşebildiği tam düzenek sırası ligatlanabilir uçların tasarımı aracılığıyla belirtilir ve eğer birden fazla düzenek adımı kullanılacaksa o zaman nükleik asit yapı blokları
- 25 birleştirilebildiği tam düzenek sırası ayrıca düzenek adımının (adımlarının) ardışık sırası vasıtasıyla belirlenir. Yapı parçalarının kovalent bağlanmasına erişmek için tavllanmış yapı parçaları bir ligaz (örn, T4 DNA ligaz) gibi bir enzimle işleme tabi tutulabilir.
- Kenetlenme katılımcıdaki her bir nükleotitten faydalanmayan bir şekilde meydana gelebilir. Kenetlenme özellikle eğer kenetlenme özellikle bir “aralık ligasyonu” veya bir “aralıklı ligasyon” olarak adlandırılan durumu oluşturmak için bir ligaz enzimi ile işlem vasıtasıyla gerçekleştirilirse hayatta kalacak kadar canlıdır. Bu kenetleme tipi istenmeyen arka plan ürününün (ürünlerinin) oluşumuna katkıda bulunabilir ancak
- 30

ayrıca avantajlı olarak tasarlanan ligasyon yeniden düzenlemesi tarafından oluşturulan soy kütüphanesinin çeşitliliğini de arttırabilir. Belirli sarkmalar bir palindromik kenetlenme oluşturmak için kendi kendine kenetlenmeden geçebilir. Bir kenetlenme eğer bir ligaz enzimi ile işlem vasıtasıyla takviye edilirse özellikle güçlendirilir. Bu sarkmalar üzerinde 5' fosfatların olmaması bu tip palindromik kendi kendine ligasyonu engellemek için avantajlı olarak kullanılabilir. Dolayısıyla bir 5' fosfat grubundan muaf olan nükleik asit yapı blokları kimyasal olarak yapılabilir (veya sıralanabilir). Alternatif olarak bunlar ligasyon yeniden düzenleme işlemlerinde palindromik kendi kendine ligasyonları engellemek için örn, bir dana intestinal alkalın fosfataz (CIAP) gibi bir fosfataz enzimi ile işlem vasıtasıyla uzaklaştırılabilir.

Nükleik asit yapı bloklarının tasarımı nihai kimerik polinükleotitlerin bir progenitör dizisini üretmek için bir taban olarak işlev gören bir soy nükleik asit şablonu dizisinin sekanslarının analiz edilmesi vasıtasıyla elde edilebilir. Bu progenitör nükleik asit şablonları dolayısıyla mutageneze tabi tutulacak, başka bir deyişle kimerize edilecek veya karıştırılacak nükleik asit yapı bloklarının tasarımına yardımcı olan bir sekans bilgisi kaynağı olarak işlev görür.

Mevcut buluşun ksilanazları ve/veya glukozazları burada açıklanan yöntemlere uygun olarak mutageneze tabi tutulabilir.

Birden çok soy nükleik asit şablonunun (örn, buluşun polinükleotitleri) sekansları bir veya daha fazla demarkasyon noktası seçmek için hizalanabilmekte olup, burada demarkasyon noktaları bir homoloji alanına yerleştirilebilir. Demarkasyon noktaları oluşturulacak nükleik asit yapı bloklarının sınırlarını betimlemek için kullanılabilir. Dolayısıyla progenitör moleküllerde tanımlanan ve seçilen bu demarkasyon noktaları kimerik soy moleküllerinin düzeneğinde potansiyel kimerizasyon noktaları olarak işlev görür.

Tipik olarak elverişli bir demarkasyon noktası en az iki progenitör şablon tarafından paylaşılan bir homoloji alanıdır (en az bir homolog nükleotit bazından oluşmaktadır) ancak demarkasyon noktası progenitör şablonların en az yarısı, progenitör şablonların en az üçte ikisi, progenitör şablonların en az dörtte üçü ve tercih edilen şekliyle progenitör şablonların neredeyse tamamı tarafından paylaşılan bir homoloji alanı olabilir. Daha da tercih edilen şekliyle elverişli bir demarkasyon noktası progenitör şablonların tamamı tarafından paylaşılan bir homoloji alanıdır.

Gen yeniden düzenlemesi işlemi kapsamlı bir kütüphane oluşturmak için kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Başka bir deyişle nükleik asit yapı bloklarının bütün olası sıralanmış kombinasyonları nihai kimerik nükleik asit molekülü dizisinde sunulmaktadır. Aynı zamanda düzenek sırası (başka bir deyişle her bir nihai kimerik nükleik asidin 5' ile 3 sekansındaki her bir yapı bloğunun düzenek sırası) her bir kombinasyonda tasarım vasıtasıyla (veya stokastik olmayan şekilde) olur. Yöntemin stokastik olmayan yapıdan dolayı istenmeyen yan ürünlerin olasılığı büyük ölçüde düşürülür.

Gen yeniden düzenleme işlemi örneğin yöntem sistematik olarak bölümlere ayrılmış bir kütüphane oluşturmak için gerçekleştirilmekte olup, bölümler örn, teker teker sistematik olarak taranabilir. Başka bir deyişle sıralı olarak kademelendirilen düzenek reaksiyonlarının seçici ve makul kullanımıyla birleştirilen spesifik nükleik asit bloklarının seçici ve makul kullanımı aracılığıyla spesifik soy ürünü dizilerinin çeşitli reaksiyon kaplarının her birinde yapıldığı deneysel bir tasarıma erişilebilir. Bu sistematik incelemeye ve tarama prosedürlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Dolayısıyla yöntem potansiyel olarak çok fazla sayıda soy molekülünün daha küçük gruplar halinde incelenmesine olanak sağlar.

Son derece esnek yine de kapsamlı ve aynı zamanda sistematik olan bir şekilde kimerizasyon gerçekleştirme kabiliyetinden dolayı özellikle progenitör moleküller arasında düşük bir homoloji seviyesi olduğu zaman bu yöntemler çok sayıda soy molekülünden oluşan bir kütüphanenin (veya dizinin) oluşmasını sağlar. Anlık gen yeniden düzenlemesinin stokastik olmayan yapısından dolayı oluşturulan soy molekülleri tercih edilen şekliyle tasarım vasıtasıyla seçilen bir tam düzenek sırasına sahip olan nihai kimerik nükleik asitlerden bir kütüphane içerir. Özel bir yönde oluşturulmuş bu tür bir kütüphane 10^3 'den daha fazla 10^{1000} 'den daha fazla farklı soy moleküler türünden oluşur.

Açıklandığı gibi üretilen nihai kimerik nükleik asit moleküllerinin bir dizisi bir polipeptiti kodlayan bir polinükleotit içerebilir. Bu polinükleotit insan yapımı bir gen olabilen bir gen olabilir. Bu polinükleotit insan yapımı bir gen yolu olabilen bir gen yolu olabilir. Bir veya daha fazla insan yapımı gen bir ökaryotik organizmada (bir bitki dahil olmak üzere) faal olabilen yol olarak insan yapımı bir gen yolunun içine yerleştirilebilir.

Yapı bloklarının oluşturulduğu adımın sentetik yapısı bir yönde bir in vitro işlemle (örn, mutagenез vasıtasıyla) veya bir in vivo işlemle (örn, bir konak organizmanın gen uç birleştirme kabiliyeti kullanılarak) daha sonra uzaklaştırılabilen nükleotitlerin (örn, 5 örneğin kodonlar veya intronlar veya regülatör sekanslar olabilen bir veya daha fazla nükleotitin) tasarımına ve yerleştirilmesine olanak sağlar. Birçok durumda bu nükleotitlerin yerleştirilmesini ayrıca elverişli bir dekarmasyon noktası oluşturmaya ilişkin potansiyel faydaya ek olarak birçok başka nedenden dolayı istenebileceği takdir edilecektir.

Dolayısıyla bir nükleik asit yapı bloğu bir intronu yerleştirmek için kullanılabilir. 10 Dolayısıyla fonksiyonel intronlar insan yapımı bir gen içine yerleştirilebilir. Dolayısıyla fonksiyonel intronlar insan yapımı bir gen yolu içine yerleştirilebilir. Bu bir (veya daha fazla) yapay olarak yerleştirilmiş intron (intronlar) içeren bir insan yapımı gen olan bir kimerik polinükleotitin oluşumunu sağlar.

Tercih edilen şekliyle yapay olarak yerleştirilen intron (intronlar) doğal olarak meydana 15 gelen intronların gen uç birleştirmesinde fonksiyonel olarak işlev gördüğü şekilde gen uç birleştirmesi için bir veya daha fazla konak hücrede fonksiyoneldir. İnsan yapımı intron içeren polinükleotitler rekombinasyon ve/veya uç birleştirme için konak organizmalara yerleştirilebilir.

Bu şekilde üretilen insan yapımı bir gen ayrıca başka bir nükleik asitle rekombinasyon 20 için bir substrat olarak işlev görebilir. Benzer şekilde bu şekilde üretilen insan yapımı bir gen yolu ayrıca başka bir nükleik asitle rekombinasyon için bir substrat olarak işlev görebilir. Rekombinasyon insan yapımı, intron içeren gen ve bir rekombinant partner olarak işlev göre bir nükleik asit arasındaki homoloji alanlarında meydana gelebilir veya bunlar sayesinde kolaylaştırılabilir. Rekombinasyon partneri ayrıca insan yapımı bir 25 gen veya insan yapımı bir gen yolu dahil olmak üzere burada açıklandığı yöntem vasıtasıyla üretilen bir nükleik asit olabilir. Rekombinasyon insan yapımı gende bir (veya daha fazla) yapay olarak yerleştirilen intronda (intronlarda) mevcut olan homoloji alanlarında meydana gelebilir veya bunlar sayesinde kolaylaştırılabilir.

Sentetik gen yeniden düzenleme yöntemi her biri tercih edilen şekliyle iki ligatlanabilir 30 uca sahip olan birden çok nükleik asit yapı bloğu kullanır. Her bir nükleik asit yapı bloğundaki iki ligatlanabilir uç iki kör uç (örn, her biri sıfır nükleotitlik bir sarkmaya

sahiptir) veya tercih edilen şekliyle bir kör uç ve bir sarkma veya daha da tercih edilen şekliyle iki sarkma olabilir.

Bu amaca yönelik olarak kullanışlı bir sarkma bir 3' sarkması veya bir 5' sarkmasıdır. Dolayısıyla nükleik asit yapı bloğu bir 3' sarkmasına veya alternatif olarak bir 5' sarkmasına veya alternatif olarak iki 3' sarkmasına veya alternatif olarak iki 5' sarkmasına sahip olabilir. Nükleik asit yapı bloğunun bir nihai kimerik nükleik asit molekülü oluşturmak için düzenlendiği tam sıra amaca yönelik deneysel tasarım vasıtasıyla belirlenir ve rastgele değildir.

Bir nükleik asit yapı bloğu iki tek sarmallı nükleik asidin (ayrıca tek sarmallı oligolar olarak anılmaktadır) kimyasal sentezi ve bunların bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğu oluşturmak için yeniden birleşmesine olanak sağlamak için temas ettirilmesi vasıtasıyla oluşturulabilir.

Bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğu değişen büyüklükte olabilir. Bu yapı bloklarının büyüklükleri küçük veya büyük olabilir. Yapı bloğuna ilişkin örnek büyüklükler 1 baz çifti (herhangi bir sarkma içermemektedir) ile 100,000 baz çifti (herhangi bir sarkma içermemektedir) arasında değişir. Diğer örnek büyüklük aralıkları ayrıca sağlanmakta olup, 1 bp ile 10,000 bp'lik (aradaki her bir tamsayı değeri dahil olmak üzere) alt limitlere ve 2 bp ile 100,000 bp'lik (aradaki her bir tamsayı değeri dahil olmak üzere) üst limitlere sahiptir.

Elverişli olan bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğunun oluşturulabildiği yöntemler mevcuttur ve bunlar teknikte bilinmektedir ve uzman kişi tarafından kolaylıkla gerçekleştirilebilir.

Bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğu ilk olarak iki tek sarmallı nükleik asidin oluşturulması ve bunların bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğu oluşturmak için birleşmesine olanak sağlanması vasıtasıyla oluşturulabilir. Bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğunun iki sarmalı bir sarkma oluşturan dışında her bir nükleotide tamamlayıcı olabilir, dolayısıyla herhangi bir sarkma (sarkmalar) dışında eşleşme içermez. Bir çift sarmallı nükleik asit yapı bloğunun iki sarmalı bir sarkma oluşturan dışında nükleotitlerin tamamından azında tamamlayıcı olabilir. Dolayısıyla çift sarmallı bir nükleik asit yapı bloğu kodon bozulmasını uygulamak için kullanılabilir. Kodon dejenerasyonu burada açıklanan, bir veya daha fazla N,N,G/T kaseti kullanan veya

alternatif olarak bir veya daha fazla N,N,N kaseti kullanan alan-doygunluk mutagenizi kullanılarak gerçekleştirilir.

5 Rekombinasyon yöntemi bilinmeyen hibritlerden veya spesifik bir polinükleotitin veya sekansın alellerinden oluşan bir havuzda körlemesine gerçekleştirilir. Ancak spesifik polinükleotitin gerçek DNA veya RNA sekansını bilmek gerekli değildir.

10 Karışık bir gen popülasyonu içinde rekombinasyon kullanma yaklaşımı herhangi bir faydalı proteinin, örneğin interleokin-1'in, antikorların, tPA'nın ve büyüme hormonunun oluşumu için faydalı olabilir. Bu yaklaşım değiştirilmiş spesifikiteye veya aktiviteye sahip olan proteinler oluşturmak için kullanılabilir. Yaklaşık ayrıca hibrit nükleik asit sekansların örneğin promotör alanların, intronların, ekzonların, arttırıcı sekansların, genlerin 31 çevrilmemiş bölgesinin veya 51 çevrilmemiş bölgesinin oluşumu için faydalıdır. Dolayısıyla bu yaklaşım artan ekspresyon oranlarına sahip olan genler oluşturmak için kullanılabilir. Bu yaklaşım ayrıca tekrarlı DNA sekanslarını çalışmakta faydalı olabilir. Son olarak bu yaklaşım ribozomları veya aptamerleri mutasyona tabi 15 tutmak için faydalı olabilir.

Burada açıklanan yöntemler redüktif yeniden değerlendirilmenin, rekombinasyonun ve seçimin tekrar eden döngülerinin kullanımına yönelik olup, DNA, RNA veya proteinler gibi son derece kompleks lineer sekansların rekombinasyon aracılığıyla yönlendirilmiş moleküler evrimine olanak sağlar.

20 **Optimize Yönlendirilmiş Evrim Sistemi**

“Optimize yönlendirilmiş evrim sistemi” olarak adlandırılan stokastik olmayan bir gen modifikasyonu sistemi buluşun polipeptitlerini eni veya değiştirilmiş özelliklerle oluşturabilir. Optimize yönlendirilmiş evrim redüktif yeniden değerlendirme, rekombinasyon ve seçimin tekrar eden döngülerinin kullanımına yönelik olup, 25 rekombinasyon aracılığıyla nükleik asitlerin yönlendirilmiş moleküler evrimine olanak sağlar. Optimize yönlendirilmiş evrim dahil olan kimerik sekansların büyük bir popülasyonunun oluşmasına olanak sağlamakta olup, burada oluşan popülasyon önceden belirlenmiş bir sayıda çaprazlama olayına sahip olan sekanslara yönelik olarak dikkate değer şekilde zenginleştirilir.

30 Bir çaprazlama olayı bir parental varyanttan başka bir parental varyanta doğru sekansta bir kayma meydana gelen bir kimerik sekanstaki bir noktadır. Bu tür bir nokta normalde iki ebeveynden nükleotitlerin tek bir sekans oluşturmak için birlikte

ligatlandığı birleşme yerindedir. Bu yöntem oligonükleotit sekanslarının doğru konsantrasyonlarının hesaplanmasına olanak sağlar, böylece sekansların nihai kimerik popülasyonu seçilen sayıda çaprazlama olayına yönelik olarak zenginleştirilir. Bu önceden belirlenmiş sayıda çaprazlama olayına sahip olan kimerik varyantların seçimi üzerine daha fazla kontrol sağlar.

Ek olarak bu yöntem diğer sistemlerle karşılaştırıldığında son derece fazla miktarda muhtemel protein varyantı alanının açığa çıkması için güvenli bir araç sağlar. Önceden eğer bir kişi örneğin bir reaksiyon sırasında 10^{13} kimerik molekül sağlamışsa belirli bir aktivite için bu kadar yüksek sayıda kimerik varyantı test etmek özellikle zor olmuştur.

Bunun ötesinde soy popülasyonunun önemli bir kısmı belirli bir aktivitenin artan seviyelerine sahip olması çok muhtemel olmayan proteinlerle sonuçlanan çok yüksek sayıda çaprazlama olayına sahip olacaktır. Bu yöntemlerin kullanılması vasıtasıyla kimerik moleküllerin popülasyonu belirli bir çaprazlama olayı sayısına sahip olan varyantlara yönelik olarak zenginleştirilebilir. Dolayısıyla her ne kadar bir kişi bir reaksiyon sırasında 10^{13} kimerik molekül meydana getirirse de başka analiz için seçilen moleküllerin her biri muhtemelen örneğin sadece üç çaprazlama olayına sahip olur. Meydana gelen soy popülasyonu önceden belirlenmiş sayıda çaprazlama olayına sahip olmaya eğilimli olduğundan dolayı kimerik moleküller arasındaki fonksiyonel çeşitlilik üzerindeki sınırlar azaltılmaktadır. Bu orijinal parental polinükleotitten hangi nükleotitin belirli bir tehdit oluşturmaktan sorumlu olabildiği hesaplandığı zaman daha fazla idare edilebilen sayıda değişken sağlar.

Bir kimerik soy polinükleotit sekansı oluşturmak için bir yöntem her bir parental sekansın fragmanlarına veya bölümlerine karşılık gelen oligonükleotitleri oluşturmaktır. Her bir oligonükleotit tercih edilen şekliyle kendine özgü bir üst üste binme bölgesi içerir, böylece oligonükleotitlerin birlikte karıştırılması doğru sırada düzenlenen oligonükleotit fragmanına sahip olan yeni bir varyantla sonuçlanır. İlave bilgi ayrıca örn, USSN 09/332,835; U.S. Patent No. 6,361,974 patent yayınlarında bulunabilir.

Her bir parental varyant için oluşturulan oligonükleotitlerin sayısı sonuçta oluşturulan kimerik molekülde meydana gelen çaprazlamaların toplam sayısı ile bir ilişki taşır. Örneğin üç parental nükleotit sekansı varyantının örneğin yüksek sıcaklıkta daha fazla aktiviteye sahip olan bir kimerik varyant bulmak için bir ligasyon reaksiyonundan geçmesi sağlanabilir. Bir örnek olarak 50 oligonükleotit sekansından oluşan bir dizi oluşturulabilmekte olup, bu da her bir parental varyantın her bir bölümüne karşılık gelir.

Dolayısıyla ligasyon yeniden düzenleme işlemi sırasında kimerik sekansların her biri içinde 50'ye kadar çaprazlama olayı olabilir. Oluşturulan kimerik polipeptitlerin her birinin her bir parental varyanttan değişen sırada oligonükleotitler içermesi olasılığı çok düşüktür. Eğer her bir oligonükleotit fragmanı ligasyon reaksiyonunda aynı molar miktarda bulunuyorsa aynı pozisyonlarda aynı parental polinükleotitten oligonükleotitlerin bir başkasına bitişik olana ligatlanması olasıdır ve dolayısıyla bir çaprazlama olayı ile sonuçlanmayacaktır. Eğer her bir ebeveynden her bir oligonükleotitin konsantrasyonu bu örnekte herhangi bir ligasyon adımında sabit tutulursa aynı parental varyanttan bir oligonükleotitin kimerik sekans içinde ligatlanması ve çaprazlama üretmemesi için 1/3 oranında bir şans vardır (3 ebeveyn olduğu varsayılmaktadır).

Dolayısıyla bir parental varyant sayısı, her bir varyanta karşılık gelen oligonükleotitlerin sayısı ve ligasyon reaksiyonu sırasında her bir varyantın konsantrasyonları göz önünde tutulduğunda bir ligasyon reaksiyonunda her bir adım sırasında meydana gelmesi olası olan çaprazlama olaylarının popülasyonunu tahmin etmek için bir olasılık yoğunluk fonksiyonu (PDF) belirlenebilir. PDF'in belirlenmesinin arkasındaki istatistik ve matematik aşağıda açıklanmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılması vasıtasıyla bir kişi bu tür bir olasılık yoğunluk fonksiyonu hesaplayabilir ve dolayısıyla belirli bir ligasyon reaksiyonundan kaynaklanan çaprazlama olaylarının önceden belirlenmiş sayısına yönelik olarak kimerik soy popülasyonunu zenginleştirebilir. Bunun ötesinde çaprazlama olaylarının hedeflenen sayısı önceden belirlenebilir ve sistem önceden belirlenmiş sayıda çaprazlama olayına odaklanan bir olasılık yoğunluk fonksiyonu elde etmek için daha sonra ligasyon reaksiyonundaki her bir adım sırasında her bir parental oligonükleotitin başlangıç miktarını hesaplamak için programlanabilir. Bu yöntemler redüktif yeniden değerlendirme, rekombinasyon ve seçimin tekrar eden döngülerinin kullanımına yönelik olup, rekombinasyon aracılığıyla nükleik asitlerin yönlendirilmiş moleküler evrimine olanak sağlar. Bu sistem dahil olan kimerik sekansların büyük bir popülasyonunun oluşmasına olanak sağlamakta olup, burada oluşan popülasyon önceden belirlenmiş bir sayıda çaprazlama olayına sahip olan sekanslara yönelik olarak dikkate değer şekilde zenginleştirilir. Bir çaprazlama olayı bir parental varyanttan başka bir parental varyanta doğru sekanslarda bir kayma meydana gelen bir kimerik sekanstaki bir noktadır. Bu tür bir nokta normalde iki ebeveynden nükleotitlerin tek bir sekans oluşturmak için birlikte ligatlandığı birleşme yerindedir. Yöntem

oligonükleotit sekanslarının doğru konsantrasyonlarının hesaplanmasına olanak sağlar, böylece sekansların nihai kimerik popülasyonu seçilen sayıda çaprazlama olayına yönelik olarak zenginleştirilir. Bu önceden belirlenmiş sayıda çaprazlama olayına sahip olan kimerik varyantların seçimi üzerine daha fazla kontrol sağlar.

- 5 Ek olarak bu yöntemler diğer sistemlerle karşılaştırıldığında son derece fazla miktarda muhtemel protein varyantı alanının açığa çıkması için güvenli bir araç sağlar. Burada açıklanan bu yöntemlerin kullanılması vasıtasıyla kimerik moleküllerin popülasyonu belirli bir çaprazlama olayı sayısına sahip olan varyantlara yönelik olarak zenginleştirilebilir. Dolayısıyla her ne kadar bir kişi bir reaksiyon sırasında 10^{13} kimerik
- 10 molekül meydana getirirse de başka analiz için seçilen moleküllerin her biri muhtemelen örneğin sadece üç çaprazlama olayına sahip olur. Meydana gelen soy popülasyonu önceden belirlenmiş sayıda çaprazlama olayına sahip olmaya eğilimli olduğundan dolayı kimerik moleküller arasındaki fonksiyonel çeşitlilik üzerindeki sınırlar azaltılmaktadır. Bu orijinal parental polinükleoititten hangi nükleotitin belirli bir tehdit
- 15 oluşturmaktan sorumlu olabildiği hesaplandığı zaman daha fazla idare edilebilen sayıda değişken sağlar.

Bir yönde yöntem her bir parental sekansın fragmanlarına veya bölümlerine karşılık gelen oligonükleotitleri oluşturarak bir kimerik soy polinükleotit sekansı oluşturur. Her bir oligonükleotit tercih edilen şekliyle kendine özgü bir üst üste binme bölgesi içerir,

20 böylece oligonükleotitlerin birlikte karıştırılması doğru sırada düzenlenen oligonükleotit fragmanına sahip olan yeni bir varyantla sonuçlanır. Ayrıca bakınız USSN 09/332,835

Çaprazlama Olaylarının Belirlenmesi

Bir sistem ve yazılım istenen çaprazlama olasılık yoğunluk fonksiyonunu (PDF), yeniden düzenlenecek ebeveyn sayısını ve yeniden düzenlemedeki fragmanların

25 sayısını girdi olarak alır. Bu programın çıktısı yeniden düzenlenmiş genleri üretmek için bir tarif ve bu genlerin tahmin edilen çaprazlama PDF'ini belirlemek için kullanılabilen bir "fragman PDF"tir. Burada açıklanan işlem tercih edilen şekliyle teknik hesaplama için bir programlama dili ve geliştirme ortamı olan MATLAB™'da (The Mathworks, Natick, Massachusetts) gerçekleştirilir.

30 Tekrarlı İşlemler

Burada açıklanan işlemler yinelemeli bir şekilde tekrarlanabilir. Örneğin değiştirilmiş veya yeni bir ksilanaz fenotipinden sorumlu bir nükleik asit (veya nükleik asit)

tanımlanır, yeniden izole edilir, yine modifiye edilir, aktiviteye yönelik yeniden test edilir. Bu işlem istenen bir fenotip üretilene kadar yinelemeli bir şekilde tekrarlanabilir. Örneğin tam bir biyokimyasal anabolik veya katabolik yol örn, ksilanaz aktivesi içeren bir hücre içinde üretilebilir.

- 5 Benzer şekilde eğer belirli bir oligonükleotitin istenen özellik (örn, yeni bir ksilanaz fenotipi) üzerinde hiçbir etkisi olmadığı belirlenirse çıkartılacak sekansı içeren daha büyük parental oligonükleotitlerin sentezlenmesi vasıtasıyla bir değişken olarak çıkartılabilir. Sekansın daha büyük bir sekans içine yerleştirilmesi herhangi bir çaprazlama olayını engellediğinden dolayı soy polinükleoitinde bu sekansın herhangi
- 10 bir varyasyonu bundan sonra olmayacaktır. İstenecek özellik hangi oligonükleotitin en çok ilişkili olduğunu ve hangisinin ilişkili olmadığını belirlemeye ilişkin bu tekrarlı uygulama belirli bir özellik veya aktivite sağlayabilen muhtemel protein varyantlarının tamamının daha etkin incelenmesini sağlar.

In vivo karıştırma

- 15 Moleküllerin in vivo karıştırılması buluşun polipeptitlerinin varyantlarını, örn, antikoları, ksilanazları ve benzerlerini sağlamak için kullanılır. In vivo karıştırma multimerleri rekombine etmek için hücrelerin doğal özelliği kullanılarak gerçekleştirilebilir. Rekombinasyon in vivo moleküler çeşitlilik için ana doğal yolu sağlarken genetik rekombinasyon şunları içeren nispeten karmaşık bir işlem olarak kalır rekombinant
- 20 kiazmanın üretimine neden olan 1) homolojilerin ayırt edilmesi; 2) sarmal klevajı, sarmal istilası ve metabolik adımlar ve son olarak 3) kiazmanın ayrı rekombine edilmiş moleküller içinde çözünürlüğü. Kiazmanın oluşumu homolog sekansların ayırt edilmesini gerektirir.

- Bir hibrit polinükleotit en az bir kısmi sekans bölgesi paylaşabilen ve uygun bir konak
- 25 hücreye yerleştirilen en az bir birinci polinükleoitit ve bir ikinci polinükleoititten üretilebilir. Kısmi sekans homoloji bölgeleri bir hibrit promotör üreten sekans yeniden organizasyonu ile sonuçlanan işlemleri destekler. Burada kullanıldığı şekliyle "hibrit polinükleoitit" patent hakkı bildiriminin yönteminden kaynaklanan ve en az iki orijinal polinükleoitit sekansından sekans içeren herhangi bir nükleotit sekansıdır. Bu hibrit
- 30 promotörler DNA molekülleri arasındaki sekans entegrasyonunu destekleyen moleküller arası rekombinasyon olaylarından kaynaklanabilir. Ek olarak bu hibrit polinükleoititler bir DNA molekülü içindeki bir nükleotit sekansını değiştirmek için tekrar

eden sekanslar kullanan molekül içi redüktif yeniden değerlendirme işlemlerinden kaynaklanabilir.

5 In vivo yeniden değerlendirme topu olarak “rekombinasyon” olarak anılan, bakterilerde genel olarak bir “RecA’ya bağlı” fenomen olarak görülen “hücre içi” işlemlere odaklanmaktadır. Burada açıklanan yöntemler sekansları rekombine etmek ve yeniden değerlendirmek için bir konak hücrenin rekombinasyon işlemlerine veya hücrelerin silme vasıtasıyla hücrede sözde tekrarlanan sekansların karmaşıklığını azaltmak için redüktif işlemlere aracılık etme kabiliyetine dayanabilir. Bu “redüktif yeniden değerlendirme” işlemi bu işlem bir “moleküller arası”, RecA’dan bağımsız işlem

10 vasıtasıyla meydana gelir.

Dolayısıyla yeni polinükleotitler redüktif yeniden değerlendirme işlemi vasıtasıyla oluşturulabilir. Yöntem ardışık sekanslar içeren yapıların (orijinal kodlama sekansları) oluşumunu, bunların uygun bir vektör içine yerleştirilmesini ve bunların uygun bir konak hücreye sonradan yerleştirilmesini içerir. Bireysel moleküler özdeşliklerin yeniden değerlendirilmesi homoloji bölgelerini kaplayan yapıdaki ardışık sekanslar arasındaki veya sözde tekrarlanan birimler arasındaki kombinasyonel işlemler aracılığıyla meydana gelir. Yeniden değerlendirme işlemi tekrarlanan sekansların karmaşıklığını ve kapsamını rekombine eder ve/veya bunları azaltır ve yeni moleküler türlerin üretimiyle sonuçlanır. Yeniden değerlendirme oranını arttırmak için çeşitli işlemler uygulanabilir. Bunlar ultraviyole ışıkla veya DNA’ya hasar veren kimyasallarla ve/veya gelişmiş seviyelerde “genetik instabilite” gösteren konak hücre hatlarının kullanımıyla işleme tabi tutmayı içerir. Dolayısıyla yeniden değerlendirme işlemi homolog rekombinasyonu veya kendi evrimini yönlendirmek için sözde tekrarlanan sekansların doğal varlığını içerebilir.

25 Tekrarlanan veya “sözde tekrarlanan” sekanslar genetik instabilitede bir rol oynar. “Sözde tekrarlar” kendi orijinal birim yapısıyla kısıtlı olmayan tekrarlardır. Sözde tekrarlanan birimler bir yapıdaki sekansların bir dizisi; benzer sekansların ardışık birimleri olarak gösterilebilir. Ligatlandıktan sonra ardışık sekanslar arasındaki bağlantılar büyük ölçüden görünmez hale gelir ve meydana gelen yapının sözde

30 tekrarlı yapısı şimdi moleküler seviyede kesintisizdir. Silme hücreyi sözde tekrar eden sekanslar arsında işlev görmesi, meydana gelen yapının karmaşıklığının azaltılması için işler. Sözde tekrar eden birimler dökülme olaylarının meydana geldiği şablonlara ilişkin pratik olarak kısıtsız bir repertuar sağlar. Sözde tekrarlar içeren yapılar silme (ve

potansiyel olarak ekleme) olaylarının sözde tekrarlı birimler içinde görsel olarak herhangi bir yerde meydana gelmesiyle ilişkili olarak yeterli moleküler esnekliği etkili bir şekilde sağlar.

Sözde tekrar eden sekanslar aynı oryantasyonda, örneğin baştan sona kadar veya tersi şekilde ligatlandığı zaman hücre bireysel birimleri ayırt edemez. Sonuç olarak redüktif işlem sekanslar boyunca meydana gelebilir. Bunun aksine örneğin birimler baştan sona yerine baştan başa sunulduğu zaman çevrim bitişik birimin uç noktalarını belirler böylece silme oluşumu ayrı birimlerin kaybını destekleyecektir. Dolayısıyla mevcut yöntemle sekansların aynı oryantasyonda olması tercih edilir. Sözde tekrarlanan sekansların rastgele oryantasyonu yeniden değerlendirme verimliliğine kayıpla sonuçlanacakken sekansların tutarlı oryantasyonu en yüksek verimliliği verecektir. Ancak aynı oryantasyonda daha az kesintisiz sekansa sahip olduğunda halen yeni moleküllerin etkili geri kazanımı için yeterli esneklik sağlanabilir. Yapılar daha yüksek etkinlik sağlamak için aynı oryantasyondaki sözde tekrarlanan sekanslarla yapılabilir.

Sekanslar çeşitli yöntemlerin herhangi biri kullanılarak baştan sona bir oryantasyonda düzenlenebilmekte olup, bunlar aşağıdakileri içerir:

a) bir poli-A başı ve poli-T sonu içeren, tek sarmallı yapıldığı zaman oryantasyon sağlayan primerler kullanılabilir. Bu RNA'dan yapılan ve dolayısıyla RNaseH'ten kolaylıkla uzaklaştırılan primerlerin ilk birkaç bazına sahip olunması vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

b) Kendine özgü kısıtlama klevaj alanları içeren primerler kullanılabilir. Çoklu alanlar, bir kendine özgü sekans ve tekrar eden sentez bataryası ve ligasyon adımları gerekli olacaktır.

c) Primerin dahili birkaç bazı tiyolatlanabilir ve bir eksonükleaz doğru şekilde sona takılan moleküller üretmek için kullanılır.

Yeniden değerlendirilmiş sekansların geri kazanımı bir indirgenmiş tekrarlı indeksi (RI) ile klonlama vektörlerinin tanımlanmasına dayanır. Yeniden değerlendirilmiş kodlama sekansları daha sonra amplifikasyon vasıtasıyla geri kazanılabilir. Ürünler yeniden klonlanır ve eksprese edilir. Klonlama vektörlerinin indirgenmiş RI ile geri kazanımı aşağıdakiler vasıtasıyla gerçekleştirilebilir:

1) Yapı kompleksliği düşürüldüğü zaman vektörlerin kullanımı stabil şekilde korunarak.

2) Fiziksel prosedürler aracılığıyla kısaltılmış vektörlerin fiziksel geri kazanımı. Bu durumda klonlama vektörü standart plazmid izolasyon prosedürlerini kullanarak geri kazanılır ve gerek bir agaroz jel üzerinde gerekse standart prosedürler kullanarak düşük moleküler ağırlıklı kesme kolonda büyüklük açısından parçalara ayrılır.

5 3) Ek büyüklüğü azaldığı zaman seçilebilen müdahale edilmiş genler içeren vektörlerin geri kazanımı.

4) Bir ekspresyon vektörü ile doğrudan seçim tekniklerini ve uygun seçimin kullanımı.

İlgili organizmalardan kodlama sekansları (örn, genler) yüksek homoloji derecesi sergileyebilir ve oldukça ayrı protein ürünleri kodlayabilir. Bu sekans tipleri özellikle sözde tekrarlar olarak faydalıdır. Ancak aşağıda gösterilen örnekler neredeyse özdeş orijinal kodlama sekanslarını gösterirken (sözde tekrarlar) bu işlem bu neredeyse özdeş tekrarlarla sınırlı değildir.

Uç (3) kendine özgü türden türetilen kodlama nükleik asit sekansları (sözde tekrarlar) açıklanmaktadır. Her bir sekans ayrı bir özellik dizisi olan bir proteini kodlar. Sekansların her biri sekanstaki kendine özgü pozisyondaki tek veya birkaç baz çifti ile ayrılır. Sözde tekrar eden sekanslar ayrı ayrı veya toplu olarak amplifiye edilir ve bütün muhtemel permütasyonların ve kombinasyonların ligatlanmış molekül popülasyonunda bulunacağı şekilde rastgele düzeneklere ligatlanır. Sözde tekrar birimlerinin sayısı düzenek koşulları tarafından kontrol edilebilir. Bir yapıdaki sözde tekrarlanan birimlerin ortalama sayısı tekrarlı indeks (RI) olarak tanımlanır.

Oluştuktan sonra yapılar yayınlanan protokollere göre bir agaroz jel üzerinde büyüklük açısından parçalara ayrılabilir, bir klonlama vektörüne yerleştirilebilir ve uygun bir konak hücre içine transfekte edilebilir veya bunlar olmayabilir. Hücreler daha sonra çoğaltılır ve “redüktif yeniden değerlendirme” gerçekleştirilir. Redüktif yeniden değerlendirme işleminin oranı eğer istenirse DNA hasarının dahil edilmesiyle stimüle edilebilir. RI'daki bir azalmaya bir “molekül içi” mekanizma tarafından tekrarlanan sekanslar arasında silme oluşmasının mı aracılık ettiği yoksa “molekül içi” mekanizmalar aracılığıyla rekombinasyon benzeri olayların mı aracılık ettiği önemsizdir. Nihai sonuç muhtemel bütün kombinasyonlar içindeki moleküllere ilişkin bir yeniden değerlendirmedir.

Yöntem önceden belirlenmiş örneğin bir proteinaköz reseptör, bir oligosakkarit, viriyon veya başka bir önceden belirlenmiş bileşik veya yapı ile belirli bir reaksiyonu (örn, bir

enzimin katalitik alanı gibi) bağlama veya aksi halde etkileme veya katalize etme kabiliyetine sahip olan bireysel karıştırılmış kütüphane elemanlarını tanımlamak için karıştırılmış havuzun kütüphane elemanlarının taranmasına ilişkin ilave adım içerebilir.

5 Bu kütüphanelerden tanımlanan polipeptitler terapötik, tanısal, araştırma ve ilgili amaçlar doğrultusunda kullanılabilir (örn, katalizörler, bir sulu solüsyonun ozmolaritesini arttırmak için çözücüler ve benzerleri) ve/veya bir veya daha fazla karıştırma ve/veya seçim dönüşüne tabi tutulabilir.

10 Rekombinasyon ve yeniden değerlendirmeden önce veya bunlar esnasında oluşturulan polinükleotitlerin orijinal polinükleoitlere mutasyonlar eklenmesini destekleyen ajanlara veya işlemlere tabi tutulabileceği düşünülmüştür. Bu mutasyonların dahil edilmesi meydana gelen hibrit polinükleotitlerin ve bunlardan kodlanan polipeptitlerin çeşitliliğini arttıracaktır. Mutagenezi destekleyen ajanlar veya işlemler aşağıdakileri içerir ancak bunlarla sınırlı değildir: (+)-CC-1065 veya bir sentetik analog, örneğin (+)-CC-1065-(N3-Adenin (Bkz Sun and Hurley, (1992); bir N-asetilatlanmış veya deasetilatlanmış 4'-floro-4-aminobifenil katkı maddesi, DNA 15 sentezini inhibe edebilir (Bkz , örneğin, van de Poll et al. (1992)); bir N-asetilatlanmış veya deasetilatlanmış 4'-floro-4-aminobifenil katkı maddesi, DNA sentezini inhibe edebilir (Bkz ayrıca, van de Poll et al. (1992), pp. 751-758); trivalent krom, bir trivalen krom tuzu, bir polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) DNA katkı maddesi, DNA 20 replikasyonunu inhibe edebilir, örneğin 7-bromometil-benz[a]antrasen ("BMA"), tris(2,3-dibromopropil)fosfat ("Tris-BP"), 1,2-dibromo-3-kloropropan ("DBCP"), 2-bromoakrolein (2BA), benzo[a]piren-7,8-dihidrodiol-9-10-epoksit ("BPDE"), bir platinyum(II) halojen tuzu, N-hidroksi-2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-kinolin ("N-hidroksi-IQ") ve N-hidroksi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]-piridin ("N-hidroksi- 25 PhIP"). PCR amplifikasyonunu yavaşlatmaya veya durdurmaya yönelik örnek araçlar UV ışığı (+)-CC-1065 ve (+)-CC-1065-(N3-Adenin)'den oluşur. Özellikle kapsanan araçlar DNA katkı maddeleri veya polinükleoitit veya polinükleoitit havuzlarından DNA katkı maddelerini içeren polinükleotitlerdir, bunlar ayrıca işlemeden önce polinükleotitleri içeren solüsyonun ısıtılmasını içeren bir işlem vasıtasıyla salınabilir 30 veya uzaklaştırılabilir.

Biyolojik aktiviteye sahip olan rekombinant proteinler bir sokak türü proteini kodlayan çift sarmallı şablon polinükleotitleri içeren bir örneğin hibridin veya yeniden

değerlendirilmiş polinükleotitlerin üretimi için sağlanan koşullar altında işleme tabi tutulması vasıtasıyla üretilebilir.

Sekans varyantlarının üretilmesi

- Buluşun nükleik asit (örn, ksilanaz) sekanslarının sekans varyantlarını yapmak için, 5 buluşun nükleik asitlerini ve polipeptitlerini kullanarak ksilanazları izole etmek için ilave yöntemler kullanılabilir. Buluşun bir ksilanaz kodlama sekansının (örn, bir gen, cDNA veya mesaj) varyantlar yukarıda açıklandığı gibi örn, rastgele veya stokastik yöntemler veya stokastik olmayan veya “yönlendirilmiş evrim” yöntemleri dahil olmak üzere herhangi bir araç vasıtasıyla değiştirilebilir.
- 10 İzole edilmiş varyantlar doğal olarak meydana gelebilir. Varyant in vivo oluşturulabilir. Varyantlar alana yönlendirilmiş mutagenез, rastgele kimyasal mutagenез, Eksonükleaz II silme prosedürleri ve standart klonlama teknikleri gibi genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak oluşturulabilir. Alternatif olarak bu tür varyantlar, fragmanlar, analoglar veya türevler kimyasal sentez veya modifikasyon prosedürleri 15 kullanılarak oluşturulabilir. Varyant yapmaya ilişkin diğer yöntemler de ayrıca teknikte uzman kişiler için açıktır. Bunlar doğal izolatlardan elde edilen nükleik asit sekanslarının kendi değerini endüstriyel, medikal, laboratuvar (araştırma), farmasötik, gıda ve besin ve gıda ve besin takviye işleme ve diğer uygulamalar ve işlemlerde arttıran özelliklere sahip olan polipeptitleri kodlayan yeni nükleik asitler oluşturmak için 20 modifiye edildiği prosedürleri içerir. Bu tür prosedürlerde doğal izolattan elde edilen sekansa göre bir veya daha fazla nükleotit farklılığına sahip olan çok sayıda varyant sekansı oluşturulur ve karakterize edilir. Bu nükleotit farklılıkları doğal izolatlardan nükleik asitler vasıtasıyla kodlanan polipeptitlere göre amino asit değişimleriyle sonuçlanabilir.
- 25 Örneğin varyantlar hata eğilimli PCR kullanılarak oluşturulabilir. Hata eğilimli PCR’da PCR, DNA polimerazın kopyalama üretkenliğinin düşük olduğu koşullar altında, nokta mutasyonların yüksek oranının PCR ürününün tüm uzunluğu boyunca elde edileceği şekilde gerçekleştirilir. Hata eğilimli PCR örn, Leung, D.W., et al., Technique, 1:11-15, 1989) and Caldwell, R. C. & Joyce G.F., PCR Methods Applic., 2:28-33, 1992 30 yayınında açıklanmaktadır. Kısaca bu prosedürlerde mutagenезe tabi tutulacak nükleik asit PCR primerleri, reaksiyon tamponu, MgCl₂, MnCl₂, Taq polimeraz ve PCR ürününün tüm uzunluğu boyunca yüksek oranda nokta mutasyona erişmek için uygun

bir konsantrasyonda dNTP ile karıştırılır. Örneğin reaksiyon 20 fmol mutageneze tabi tutulacak nükleik asit, 30 pmol PCR primeri, 50mM KCl, 10mM Tris HCl (pH 8.3) ve % 0,01 jelatin içeren reaksiyon tamponu, mM MgCl₂, 0,5mM MnCl₂, 5 birim Taq polimeraz, 0,2mM dGTP, 0,2mM dATP, 1mM dCTP ve 1mM dTTP kullanılarak gerçekleştirilebilir. PCR 1 dakika boyunca 94 °C, 1 dakika boyunca 45 °C ve 1 dakika boyunca 72 °C'lik 30 döngü ile gerçekleştirilebilir. Ancak bu parametrelerin uygun şekilde değiştirilebileceği takdir edilecektir. Mutageneze tabi tutulan nükleik asitler uygun bir vektör içine klonlanır ve mutageneze tabi tutulan nükleik asitler tarafından kodlanan polipeptitlerin aktiviteleri değerlendirilir.

Varyantlar ayrıca ilgili herhangi bir klonlanmış DNA'da alana özgü mutasyon meydana getirmek için oligonükleotide yönlendirilmiş mutagenез kullanılarak oluşturulabilir. Oligonükleotit mutagenезi örn, Reidhaar-Olson (1988) Science 241:53-57 yayınında açıklanmaktadır. Kısaca bu prosedürlerde klonlanmış DNA içine yerleştirilecek bir veya daha fazla mutasyon taşıyan birden çok çift sarmallı oligonükleotit sentezlenir ve mutageneze tabi tutulacak klonlanmış DNA'ya yerleştirilebilir. Mutageneze tabi tutulan DNA'yı içeren klonlar geri kazanılır ve kodladıkları polipeptitlerin aktiviteleri değerlendirilir.

Varyant oluşturmak için başka bir yöntem düzenek PCR'dır. Düzenek PCR bir küçük DNA fragmanı karışımından bir PCR ürününün düzenlenmesini içerir. Çok sayıda farklı PCR reaksiyonu aynı şişede başka bir reaksiyonun ürünlerini veren bir reaksiyonun ürünleriyle paralel şekilde meydana gelir. Düzenek PCR örn, U.S. 5,965,408 sayılı patent belgesinde açıklanmıştır.

Varyant oluşturmaya ilişkin başka bir yöntem cinsel PCR mutagenезdir. Cinsel PCR mutagenезde zorlanmış homolog rekombinasyonu sekans homolojisine bağlı olarak DNA molekülünün rastgele fragmentasyonunun, ardından bir PCR reaksiyonunda primer uzama vasıtasıyla çaprazlamanın sabitlenmesinin bir sonucu olarak farklı ancak son derece ilişkili DNA molekülleri arasında in vitro meydana gelir. Cinsel PCR mutagenез, örn, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 yayınında açıklanmaktadır. Kısaca bu prosedürlerde rekombine edilecek birden çok nükleik asit ortalama 50-200 nükleotitlik bir büyüklüğe sahip olan fragmanlar oluşturmak için DNaz ile parçalanır. İstenen ortalama büyüklükteki fragmanlar saflaştırılır ve bir PCR karışımında yeniden süspansiyon haline getirilir. PCR nükleik asit fragmanları arasındaki rekombinasyonu kolaylaştıran koşullar altında

gerçekleştirilir. Örneğin PCR 10-30ng/μl'lik bir konsantrasyondaki 100:1 reaksiyon karışımı başına 0,2mM dNTP, 2,2mM MgCl₂, 50mM KCL, 10mM Tris HCl, pH 9.0 ve % 0,1 Triton X-100, 2,5 birim Taq polimeraz içeren bir solüsyonda yeniden süspansiyon haline getirilmesi vasıtasıyla gerçekleştirilebilir ve PCR aşağıdaki rejim kullanılarak gerçekleştirilir: 60 saniye boyunca 943C, 30 saniye boyunca 943C, 30 saniye boyunca 50-553C, 30 saniye boyunca 723C (30-45 kere) ve 5 dakika boyunca 723C. Ancak bu parametrelerin uygun şekilde değiştirilebileceği takdir edilecektir. Bazı yönlerde oligonükleotitler PCR reaksiyonlarına dahil edilir. Diğer yönlerde DNA polimeraz I'in Klenow fragmanı bir birinci PCR reaksiyonu dizisinde kullanılabilir ve Taq polimeraz sonraki bir ikinci PCR reaksiyonu dizisinde kullanılabilir. Rekombinant sekanslar izole edilir ve kodladıkları polipeptitlerin aktiviteleri değerlendirilir.

Varyantlar ayrıca in vivo mutagenез vasıtasıyla oluşturulabilir. Bazı yönlerde ilgili sekanstaki rastgele mutasyonlar bir E.coli suşu gibi DNA onarım yollarının birinde veya daha fazlasında mutasyonlar taşıyan bir bakteri suşundaki ilgili sekansın çoğalması vasıtasıyla üretilebilir. Bu "mutatör" suşlar bir sokak türü ebeveyninkinden daha yüksek bir rastgele mutasyon oranına sahiptir. Bu suşların birinde DNA'nın çoğaltılması sonuç olarak DNA içinde rastgele mutasyonlar yaratacaktır. In vivo mutagenез için kullanıma uygun mutatör suşlar "Methods for Phenotype Creation from Multiple Gene Populations" başlıklı, 31 Ekim 1991'de yayınlanan WO 91/16427 sayılı PCT yayınında açıklanmaktadır.

Varyantlar ayrıca kaset mutagenезi kullanılarak oluşturulabilir. Kaset mutagenезinde çift sarmallı DNA molekülünün küçük bir bölgesi doğal sekanstan farklılık gösteren sentetik bir oligonükleotit "kaseti" ile değiştirilir. Oligonükleotit sıklıkla tamamen ve/veya kısmen rastgele hale getirilmiş doğal sekans içerir.

Tekrarlı topluluk mutagenезi ayrıca varyantlar oluşturmak için kullanılabilir. Tekrarlı topluluk mutagenезi elemanları amino asit sekansı açısından farklılık gösteren fenotipik olarak ilişkili mutantların farklı popülasyonlarını üretmek için geliştirilen protein üretimi (protein mutagenезi) için bir algoritmadır. Bu yöntem kombinasyonel kaset mutagenезinin ardışık turlarını kontrol etmek için bir geri bildirim mekanizması kullanır.

Tekrarlı topluluk mutagenезi Arkin, A.P. and Youvan, D.C., PNAS, USA, 89:7811-7815, 1992 yayınında açıklanmaktadır.

Bazı yönlerde varyantlar üssel topluluk mutagenezi kullanılarak oluşturulur. Üssel topluluk mutagenezi yüksek kendine özgü ve fonksiyonel mutant yüzdesi olan kombinasyonel kütüphaneler oluşturmak için bir işlem olup, burada küçük kalıntı grupları fonksiyonel proteinlere neden olan amino asitleri her bir değiştirilmiş pozisyonu tanımlamak için paralel olarak rastgele hale getirilir. Üssel topluluk mutagenezi Delegrave, S. and Youvan, D.C., *Biotechnology Research*, 11: 1548-1552, 1993 yayınında açıklanmaktadır. Rastgele ve alana yönlendirilmiş mutagenez Arnold, F.H., *Current Opinion in Biotechnology*, 4:450-455, 1993 yayınında açıklanmaktadır.

Varyantlar farklı polipeptitleri kodlayan birden çok nükleik asit kısmının U.S. 5,965,408 sayılı, 9 Haziran 1996'da dosyalanan, "Method of DNA Reassembly by Interrupting Synthesis" başlıklı ve U.S. 5,939,250 sayılı, 22 Mayıs 1996'da dosyalanan, "Production of Enzymes Having Desired Activities by Mutagenesis" başlıklı patent belgelerinde açıklandığı gibi kimerik polipeptitleri kodlayan kimerik nükleik asit sekansları oluşturmak için birbirine kaynaştığı karıştırma prosedürleri kullanılarak oluşturulur.

Buluşun polipeptitlerinin varyantları buluşun polipeptitlerinin amino asit kalıntılarının birinin veya daha fazlasının bir korunmuş veya korunmamış amino asit kalıntısı ile ornatıldığı (tercih edilen şekliyle korunmuş bir amino asit kalıntısı) ve bu ornatılmış amino asit kalıntılarının genetik kod tarafından kodlanan biri olabildiği veya olamadığı varyantlar olabilir.

Koruyucu ornatımlar bir polipeptit içindeki belirli bir amino asidi benzer özelliklere sahip başka bir amino asitle ornatımlardır. Tipik olarak koruyucu ornatımlar olarak görülen aşağıdaki değişimlerdir; Alanin, Valin, Lösin ve İzölösin gibi bir alifatik amino asidin başka bir alifatik amino asitle değiştirilmesi; bir Serin ile bir Treoninin değiştirilmesi ve tersi de geçerlidir; Aspartik asit ve Glutamik asit gibi bir asit kalıntısının başka bir asit kalıntısı ile değiştirilmesi; Asparjin ve Glutamin gibi bir amin grubu taşıyan bir kalıntının bir amin grubu taşıyan başka bir kalıntıyla değiştirilmesi; Lizin ve Arginin gibi bazik bir kalıntının başka bir bazik kalıntıyla değiştirilmesi ve Fenilalanin, Tirozin gibi bir aromatik kalıntının başka bir aromatik kalıntıyla değiştirilmesi.

Diğer varyantlar buluşun polipeptitlerinin amino asit kalıntılarının bir veya daha fazlasının bir ornatım grubu içerdiği varyantlardır.

Yine başka varyantlar polipeptitin, polipeptitin yarı ömrünü arttırmak için bir bileşik (örneğin polietilen glikol) gibi başka bir bileşikle birleştirildiği varyantlardır.

5 İlave varyantlar bir lider sekans, bir sekreter sekans, bir proprotein sekans veya polipeptitin saflaştırmasını, zenginleştirilmesini veya stabilizasyonu kolaylaştıran bir sekans gibi polipeptite kaynaştığı varyantlardır.

Fragmanlar, türevler ve analoglar buluşun polipeptitleri ve bununla büyük ölçüde özdeş sekanslarla aynı biyolojik fonksiyonu veya aktiviteyi koruyabilir. Veya fragman, türev veya analog fragmanın, türevin veya analogun bir aktif polipeptit üretmek için proprotein kısmının yarılması vasıtasıyla aktive olacağı şekilde bir proprotein içerir.

10 **Konak hücrelerde yüksek seviyelerde protein ekspresyonuna erişmek için kodonların optimize edilmesi**

Ksilanaz kodlayan nükleik asitleri modifiye etmek için yöntemler bir konak hücrede ekspresyonunu arttırmak veya azaltmak için olabilir. Yöntem bir ksilanaz kodlayan nükleik asitte “tercih edilmeyen” veya “az tercih edilen” bir kodon tanımlanmasını ve bu tercih edilmeyen ve az tercih edilen kodonların birinin veya daha fazlasının değiştirilmiş kodonla aynı amino asidi kodlayan “tercih edilen bir kodonla” değiştirilmesini içerir ve nükleik asitteki en az bir tercih edilmeyen veya az tercih edilen kodon aynı amino asidi kodlayan tercih edilen bir kodonla değiştirilmiştir. Tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekansında fazla eksprese edilen kodondur ve tercih edilmeyen veya az tercih edilen bir kodon konak hücredeki genlerde kodlama sekanslarında az sunulan bir kodondur.

Buluşun nükleik asitlerini, ekspresyon kasetlerini ve vektörlerini eksprese etmeye yönelik konak hücreler bakterileri, mayayı, mantarı, bitki hücrelerini, böcek hücrelerini ve memeli hücrelerini içerir. Örnek konak hücreler *Escherichia coli* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi gram negatif bakterileri; *Streptomyces diversa*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis* gibi gram pozitif bakterileri içerir. Örnek konak hücreler ayrıca ökaryotik organizmaları, örn, çeşitli mayaları örneğin *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, ve *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger* dahil olmak üzere *Saccharomyces sp.* ve memeli hücrelerini ve hücre hatlarını ve böcek hücrelerini ve hücre hatlarını içerir.

Orneğin bir bakteri hücresinden izole edilen bir ksilanaz kodlayan bir nükleik asidin kodonları nükleik asidin ksilanazın türetildiği bakterilerden farklı bir bakteri hücresine, bir maya, bir mantar, bir bitki, bir böcek hücresine veya bir memeli hücresine optimal olarak eksprese edileceği şekilde modifiye edilebilir. Kodonları optimize etmek için yöntemler teknikte iyi bilinmektedir, bkz, örn, U.S. 5,795,737; Baca (2000) J. Parasitol. 30:113-118; Hale (1998) Protein Expr. Purif. 12:185-188; Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253. Ayrıca bkz, Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253 fare sistemlerinde kodonları optimize etmeyi açıklamaktadır; Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24 mayalarda kodonların optimize edilmesini açıklar; Feng (2000) Biochemistry 39:15399-15409 E. coli'de kodonların optimize edilmesini açıklar Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264 E. coli'de sekresyonu etkileyen kodon kullanımını optimize etmeyi açıklar.

Transjenik insan olmayan hayvanlar

Buluş buluşun bir nükleik asidini, bir polipeptitini (bir ksilanaz), bir ekspresyon kasetini veya vektörünü veya bir transfekte edilmiş veya transforme edilmiş hücresini içeren transjenik insan olmayan hayvanlar sağlar.

Transjenik insan olmayan hayvanlar örn, buluşun nükleik asitlerini içeren keçiler, tavşanlar, koyun, domuzlar, inekler, sıçanlar, atlar, köpekler, balık ve fareler olabilir. Bu hayvanlar örn, ksilanaz aktivitesini çalışmak için in vivo modeller olarak veya in vivo ksilanaz aktivitesini değiştiren ajanları taramak için modeller olarak kullanılabilir. Transjenik insan olmayan hayvanlarda eksprese edilecek polipeptitler için kodlama sekansları dokuya özgü, gelişmeye özgü ve indüklenebilir transkripsiyonel regülatör faktörlerin kontrolü altında tasarlanabilir. Transjenik insan olmayan hayvanlar teknikte bilinen herhangi bir yöntem kullanılarak tasarlanabilir ve oluşturulabilir, bkz, örn, U.S. 6,211,428; 6,187,992; 6,156,952; 6,118,044; 6,111,166; 6,107,541; 5,959,171; 5,922,854; 5,892,070; 5,880,327; 5,891,698; 5,639,940; 5,573,933; 5,387,742; 5,087,571 bunlar transforme edilmiş hücreleri ve yumurtaları ve transjenik fareleri, sıçanları, koyunu, domuzları, tavukları, keçileri, balık ve inekleri kullanmayı ve üretmeyi açıklamaktadır. Bkz, ayrıca Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157 yayını transjenik süt üreten hayvanların sütünde rekombinant proteinlerin üretimini açıklamaktadır; Baguisi (1999) Nat. Biotechnol. 17:456-461, transjenik keçilerin üretimini göstermektedir. U.S. 6,211,428 kendi beyninde bir DNA sekansı içeren bir nükleik asit yapısını eksprese eden transjenik insan olmayan memeliler üretmeyi ve

kullanmayı açıklar. U.S. 5,387,742 rekombinant veya sentetik DNA sekanslarının döllenen fare yumurtalarına enjekte edilmesini, enjekte edilen yumurtaların, psödo-hamile dişilere nakledilmesini ve hücresi Alzheimer hastalığının patolojisiyle ilişkili proteinleri eksprese eden transjenik farelerin büyütülmesini açıklar. U.S. 6,187,992

5 genomu gen kodlayan amiloid öncül proteinin (APP) bozulmasını içeren bir transjenik fare yapılmasını ve üretilmesini açıklamaktadır.

“Knockout hayvanlar” ayrıca kullanılabilir. Örneğin buluşun transjenik veya modifiye edilmiş hayvanları buluşun bir ksilanazını eksprese eden bir genle veya buluşun bir ksilanazını içeren bir füzyon proteiniyle değiştirilen bir endojen geni eksprese etmemek üzere üretilen bir “knockout hayvan”, örn, bir “knockout fare” içerir.

10

Transjenik Bitkiler ve Kökler

Buluş buluşun bir nükleik asidini, bir polipeptitini (bir ksilanaz), bir ekspresyon kasetini veya vektörünü veya bir transfekte edilmiş veya transforme edilmiş hücrelerini içeren transjenik bitkiler ve tohumlar sağlar. Buluş ayrıca bitki ürünleri veya yan ürünler, örn, meyveler, yağlar, tohumlar, yapraklar, ekstraktlar ve benzerlerini sağlamakta olup,

15 buluşun bir nükleik asidini ve/veya bir polipeptitini (bir ksilanaz) içeren herhangi bir bitki parçasını içerir, örn, burada buluşun nükleik asidi veya polipeptiti bitki, bitki parçası, tohum, vs. için heterologdur. Transjenik bitki (bitki parçalarını, meyveleri, tohumları, vs. içermektedir) çift çenekli (bir iki çenekli) veya tek çenekli (bir çenekli) olabilir. Buluş

20 ayrıca bu transjenik bitkileri ve tohumları yapmak ve kullanmak için yöntemler sağlar. Mevcut buluşun bir polipeptitini eksprese eden transjenik bitki veya bitki hücresi teknikte bilinen herhangi bir yöntemle uygun olarak yapılandırılabilir. Bkz, örneğin, U.S. Patent No. 6,309,872.

Buluşun nükleik asitleri ve ekspresyon yapıları herhangi bir araç vasıtasıyla bir bitkiye

25 yerleştirilebilir. Örneğin nükleik asitler veya ekspresyon yapıları istenen bir bitki konağının genomuna yerleştirilebilir veya nükleik asitler veya ekspresyon yapıları epizomlar olabilir. Genomun istenen bir bitkiye yerleştirilmesi konağın ksilanaz üretiminin endojen transkripsiyonel veya translasyonel kontrol elemanları vasıtasıyla regüle edileceği şekilde olabilir. Buluş ayrıca örn, homolog rekombinasyonu vasıtasıyla

30 gen sekansının yerleştirilmesi endojen genin ekspresyonu aksatıldığında “knockout bitkiler” sağlar. “Knockout” bitkiler oluşturmak için araçlar teknikte iyi bilinmektedir, bkz,

örn, Strepp (1998) Proc Natl. Acad. Sci. USA 95:4368-4373; Miao (1995) Plant J 7:359-365. Bkz, aşağıda transjenik bitkiler üzerine tartışma.

Buluşun nükleik asitleri esasen herhangi bir bitkiye, örn, patates, buğday, pirinç, arpa ve benzerleri gibi nişasta üreten bitkilere istenen özellikleri sağlamak için kullanılabilir.

- 5 Buluşun nükleik asitleri ksilanazın konak ekspresyonunu optimize etmek veya değiştirmek için bir bitkinin metabolik yollarını maniple etmek için kullanılabilir. Bu bir bitkideki ksilanaz aktivitesini değiştirebilir. Alternatif olarak buluşun bir ksilanazı bitki tarafından doğal olarak üretilmeyen bir bileşik üretmek için bir transjenik bitkinin üretiminde kullanılabilir. Bu üretim maliyetlerini düşürür ve yeni bir ürün meydana
- 10 getirir.

- Bir transjenik bitki üretiminde ilk adım bir bitki hücresinde ekspresyon için bir ekspresyon yapısı yapılmasını içerir. Bu teknikler teknikte iyi bilinmektedir. Bunlar bir promotörün, bir kodlama sekansının ribozomların mRNA'ya etkili bağlanmasını kolaylaştırmak için seçilmesini ve klonlanmasını ve uygun gen sonlandırma sekansının
- 15 seçilmesini içerebilir. Bir örnek genel olarak bitkilerde yüksek derecede ekspresyonla sonuçlanan karnıbahar mozaik virüsünden yapıcı promotör CaMV35S'tir. Diğer promotörler daha spesifik olabilir ve bitkinin dahili ve harici ortamındaki işaretlere tepki verir. Örnek bir ışıkla indüklenebilen promotör esas klorofil a/b bağlama proteinini kodlayan cab geninden promotördür.

- 20 Nükleik asit bir bitki hücresinde daha fazla ekspresyona erişmek için modifiye edilebilir. Örneğin buluşun bir sekansının bir bitkide görüleninkiyle karşılaştırıldığı zaman daha yüksek bir A-T nükleotit çifti yüzdesine sahip olması olasıdır, bunların bazıları G-C nükleotit çiftlerini tercih eder. Dolayısıyla kodlama sekansındaki A-T nükleotitleri bitki hücrelerinde gen ürünü üretimini arttırmak için amino asit sekansında dikkate değer bir
- 25 değişim olmadan G-C nükleotitleri ile ornatılabilir.

- Seçilebilir markörler transgene başarılı şekilde entegre olmuş olan bitki hücrelerini veya dokularını tanımlamak için gen yapısına eklenebilir. Bu gereklidir çünkü bitki hücresinde genlerin dahil edilmesine ve ekspresyonuna erişmek nadir bir olaydır, hedeflenen dokuların veya hücrelerin az bir kısmında meydana gelir. Seçilebilir markör
- 30 genler antibiyotikler veya herbisitler gibi bitkiler için normalde toksik olan ajanlara karşı direnç sağlayan proteinleri kodlar. Uygun antibiyotik veya herbisit içeren bir ortamda büyüdüğü zaman sadece seçilebilir markör genine entegre edilmiş bitki hücreleri

kurtulacaktır. Diğer eklenen genlerde olduğu gibi markör genler ayrıca doğru fonksiyon için promotör ve sonlandırma sekanslarını gerektirir.

Transjenik bitkiler veya tohumlar yapmak buluşun sekanslarının ve bir yönde (isteğe bağlı olarak) markör genlerin bir hedef ekspresyon yapısına (örn, bir plazmid) dahil edilmesi ile birlikte promotör ve sonlandırıcı sekansların yerleştirilmesini içerir. Bu modifiye edilmiş genlerin uygun bir yöntem aracılığıyla bitkiye transfer edilmesini içerir. Orneğin bir yapı elektroporasyon ve bitki hücresi protoplastlarının mikroenjeksiyonu gibi teknikler kullanılarak bitki hücresinin genomik DNA'sının içine doğrudan yerleştirilebilir veya yapı DNA parçacık bombardımanı gibi balistik yöntemler kullanılarak bitki dokusuna doğrudan yerleştirilebilir. Orneğin, bkz, örn, Christou (1997) Plant Mol. Biol. 35:197-203; Pawlowski (1996) Mol. Biotechnol. 6:17-30; Klein (1987) Nature 327:70-73; Takumi (1997) Genes Genet. Syst. 72:63-69, bunlar buğday içine transgenleri yerleştirmek için parçacık bombardımanının kullanımını tartışmaktadır ve yukarıda bahsedilen Adam (1997), YAC'lerin bitki hücrelerine yerleştirilmesi için parçacık kullanımı. Orneğin yukarıda bahsedilen Rinehart (1997) transjenik pamuk bitkileri üretmek için parçacık bombardımanı kullanmıştır. Parçacıkları hızlandırmak için aparat U.S. No. 5,015,580 sayılı patent belgesinde açıklanır ve ticari olarak bulunabilen (Biolistics) PDS-2000 parçacık hızlandırma aleti, bkz, ayrıca John, U.S. 5,608,148 ve Ellis, U.S. 5, 681,730 kabuksuz tohumlu bitkinin parçacık aracılı transformasyonunu açıklamaktadır.

Protoplastlar hareketsiz hale getirilebilir ve bir nükleik asit, örn, bir ekspresyon yapısı enjekte edilir. Her ne kadar protoplastlardan bitki rejenerasyonu tahıllarla kolay olmasa da bitki rejenerasyonu protoplast türevi kallusdan somatik embriyogenez kullanılarak baklagillerde mümkündür. Organize dokular gen silahı tekniği kullanılarak çıplak DNA ile transforme edilebilir, burada DNA tungsten mikro mermiler üzerine kaplanır, atış 1/100. hücre büyüklüğü, DNA'yı hücrelerin ve organellerin derinliklerine taşır. Transforme edilen doku daha sonra genellikle somatik embriyogenez vasıtasıyla yeniden oluşturulmak üzere indüklenir. Bu teknik darı ve pirinç dahil olmak üzere çeşitli tahıl türlerinde başarılı olmuştur.

Nükleik asitler, örn, ekspresyon yapıları ayrıca rekombinant virüsler kullanılarak bitki hücrelerine yerleştirilir. Bitki hücreleri örn, tütün mozai virüsü türevi vektörler gibi viral vektörler kullanılarak transforme edilebilir (Rouwendal (1997) Plant Mol. Biol. 33:989-

999), bkz Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants," Mol. Biotechnol. 5:209-221.

Alternatif olarak nükleik asitler, örn, bir ekspresyon yapısı uygun T-DNA bitişik bölgeleri ile kombine edilebilir ve geleneksel bir *Agrobacterium tumefaciens* konak vektörüne yerleştirilebilir. *Agrobacterium tumefaciens*'in virülans fonksiyonları hücre bakteriyelle enfekte edildiği zaman yapının ve bitişik markörün bitki DNA'sına eklenmesini yönlendirecektir. *Agrobacterium tumefaciens*-aracılı transformasyon teknikleri ikili vektörlerin kullanımını içermekte olup, bilimsel literatürde iyi açıklanmıştır. Bkz, 5 örn, Horsch (1984) Science 233:496-498; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803 (1983); Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995). Bir *A. tumefaciens* hücreindeki DNA bakteriyel kromozomların yanı sıra bir Ti (tümör indükleyen) plazmid olarak bilinen başka bir yapı da içerir. Ti plazmid T-DNA olarak adlandırılan, enfeksiyon işleminde bitki hücrelerine transfer edilen bir DNA parçası ve enfeksiyon işlemi yönlendiren vir (virülans) geni dizileri içerir. Bir *A. tumefaciens* bir bitkiyi sadece yaralar aracılığıyla enfekte eder: bir bitki kökü veya gövdesi yaralandığı 15 zaman belirli kimyasal sinyaller verir, buna cevaben *A. tumefaciens*'in vir genlerinin aktive olduğu ve Ti plazmidten bitkinin kromozomuna T-DNA transferi için gerekli bir dizi olayı yönlendirdiği bir tepki verir. T-DNA daha sonra yara aracılığıyla bitki hücrelerine girer. Bir spekülasyon T-DNA'nın bitki DNA'sı kopyalanana veya transkribe olana kadar beklediği, daha sonra kendisini açıkta kalan bitki DNA'sına yerleştirdiğidir. Bir *A. tumefaciens*'i bir transgen vektörü olarak kullanmak için T-DNA sınır bölgeleri ve vir genleri korunurken T-DNA'nın tümör indükleyen bölümünün çıkartılması gerekir. Transgen daha sonra T-DNA sınır bölgeleri arasına yerleştirilir, burada bitki hücrelerine transfer olur ve bitkinin kromozomuna entegre hale gelir.

25 Tek çenekli bitkiler buluşun nükleik asitlerini kullanarak transforme olabilir, bkz. Hiei (1997) Plant Mol. Biol. 35:205-218. Bkz, ayrıca örn, Horsch, Science (1984) 233:496; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803; yukarıda bahsedilen Thykjaer (1997); Park (1996) Plant Mol. Biol. 32:1135-1148, T-DNA'nın genomik DNA içine entegasyonunu tartışmaktadır. Bkz, ayrıca bir tahılın veya başka bir tek çenekli bitkinin bir hücrelerinde fonksiyonel olan bir gen içeren bir DNA'nın stabil entegrasyonuna yönelik bir işlemi açıklayan D'Halluin, U.S. 5,712,135 sayılı patent 30 belgesi.

Uçuncü adım dahil edilen hedef genin sonraki jenerasyona iletilmesi kabiliyetine sahip tam bitkilerin seçimini ve rejenerasyonunu içerebilir. Bu rejenerasyon teknikleri bir doku kültürü büyüme ortamında belirli fitohormonların maniple edilmesine dayanır, tipik olarak istenen nükleotit sekanslarıyla birlikte yerleştirilmiş olan bir biyosit ve/veya herbisit markörüne dayanır. Kültürlenmiş protoplastların bitki rejenerasyonu Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983 ve Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985 yayınlarında açıklanmıştır. Rejenerasyon ayrıca bitki organlarından kallustan, eksplanttan veya bunların parçalarından elde edilebilir. Bu rejenerasyon teknikleri genel olarak Klee (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486 yayınında açıklanmaktadır. Gelişmemiş embriyolar gibi transjenik dokulardan tam bitki elde etmek için bunlar besinleri ve hormonları içeren bir dizi ortamda kontrollü çevre koşulları altında doku kültürü olarak bilinen bir işlemde büyütülebilir. Tam bitki oluşturulup tohum verdikten sonra soyun evrimi başlar.

Ekspresyon kaseti stabil şekilde transjenik bitkilere yerleştirildikten sonra cinsel çaprazlama vasıtasıyla diğer bitkilere yerleştirilebilir. Çaprazlanacak türlere dayanarak herhangi bir sayıda standart dölleme tekniği kullanılabilir. Buluşun nükleik asitlerinin transjenik ekspresyonu fenotipik değişimlere neden olduğundan dolayı buluşun rekombinant nükleik asitlerini içeren bitkiler bir nihai ürün elde etmek için bir ikinci bitkiyle cinsel olarak çaprazlanır. Dolayısıyla buluşun tohumu buluşun iki transjenik bitkisi arasındaki bir çaprazlamadan veya buluşun bir bitkisi ve başka bir bitki arasındaki bir çaprazlamadan türetilebilir. İstenen etkiler (örn, çiçeklenme davranışının değiştirildiği bir bitki üretmek için buluşun polipeptitlerinin ekspresyonu) her iki parental bitki buluşun polipeptitlerini (örn, bir ksilanaz) eksprese ettiği zaman arttırılabilir. İstenen etkiler standart propagasyon araçları vasıtasıyla gelecekteki bitki jenerasyonlarına geçirilebilir.

Buluşun nükleik asitleri ve polipeptitleri herhangi bir bitkide veya tohumda eksprese edilir veya buraya yerleştirilir. Buluşun transjenik bitkileri tek çenekli veya çift çenekli olabilir. Buluşun çift çenekli transjenik bitkilerine ilişkin örnekler çayır otu (mavi çim, *Poa*) gibi çimleri, delice otu gibi otları, *Agrostis* gibi ılımlı çimleri ve örn, buğday, arpa, çavdar, pirinç ve darı (mısır) gibi tahıllardır. Buluşun tek çenekli bitkilerine ilişkin örnekler, tütün, patates, şeker kamışı, fasulye ve soya fasulyesi gibi baklagiller ve karnıbahar, kolza tohumu gibi turpgillerden bitkiler ve yakından ilişkili model organizma

Arabidopsis thaliana'dır. Dolayısıyla buluşun transjenik bitkileri ve tohumları geniş aralıkta bitkileri içermekte olup, bunlar Anacardium, Arachis, Asparagus, Atropa, Avena, Brassica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Elaeis, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoscyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Olea, Oryza, Panieum, Pannisetum, Persea, Phaseolus, Pistachia, Pisum, Pyrus, Prunus, Raphanus, Ricinus, Secale, Senecio, Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, ve Zea takımlarından türleri içerir ancak bunlarla sınırlı değildir. Buluşun transjenik bitkileri ve tohumları tek çenekli veya çift çenekli olabilir, örneğin bir tek çenekli mısır, şeker kamışı, pirinç, buğday, arpa veya Miscanthus veya bir tek çenekli yağ tohumu, soya, kanola, kolza tohumu, keten, pamuk, palm yağı, şeker kamışı, ağaç veya acıbakla.

Alternatif uygulamalarda buluşun nükleik asitleri örn, pamuk dahil olmak üzere fiber içeren bitkilerde (ve/veya bunların tohumlarında), silk cotton ağacında (Kapok, Ceiba pentandra), kreozot çalısında, Krascheninnikovia lanata, balza, kenevir, kerkede, kenaf, jüt, sisal abaka ve ketende eksprese edilir. Alternatif uygulamalarda buluşun transjenik bitkileri G. arboreum; G. herbaceum, G. barbadense ve G. hirsutum gibi herhangi bir Gossypium türünün elemanları dahil olmak üzere Gossypium takımının elemanları olabilir.

Buluş ayrıca buluşun polipeptitlerini fazla miktarda üretmek için kullanılacak transjenik bitkiler (ve/veya kökler sağlar. Örneğin, bkz. Palmgren (1997) Trends Genet. 13:348; Chong (1997) Transgenic Res. 6:289-296 (Agrobacterium tumefaciens-aracı yaprak disk transformasyonu yöntemleri ile bir auksinle indüklenebilen, iki yönlü mnpin sintaz (mas¹,2') promotorü kullanarak transjenik patates bitkisinde insan süt proteini beta-kaseinin üretilmesi).

Bilinen prosedürler kullanılarak teknikte uzman bir kişi buluşun bitkilerini (ve/veya köklerini transjenik bitkilerde transgen RNA'nın veya proteinin artmasını veya azalmasını tespit ederek tarayabilir. mRNA'ların veya proteinlerin tespit edilmesi ve ölçülmesi için araçlar teknikte iyi bilinmektedir.

Polipeptitler ve peptitler

Bir yönde buluş ksilanaz aktivitesine sahip izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler ve peptitleri veya bu buluşun bir ksilanazına spesifik olarak bağlanan bir antikoru üretebilen polipeptitleri ve peptitleri sağlar.

- 5 Burada açıklanan polipeptitlerin çeşitli karakteristikleri ve özellikleri aşağıda 13 ila 15 arasındaki Örneklerde tarif edilmiş ve listelenmiştir.

Açıklama ayrıca "X14 modülünü" içeren bir ksilanaz alt kümesini veya bir kladı kodladıkları için ortak bir yeniliğe sahip enzim şifreleyici nükleik asitler sağlarlar. Enzim kodlayan nükleik asitler, "X14 modülü" içeren bir kladı kodladıkları için ortak bir yeniliğe sahiptirler (J Bacteriol. 2002 August; 184(15): 4124- 4133). Bu kladın X14- içeren ksilanaz üyeleri, aşağıdaki Tablo 9'da listelenmiştir. Aşağıdaki Tablo 9'da listelenen klada ait ksilanaz üyelerini içeren yeni bir ksilanaz cinsi, örneğin aşağıdaki Tablo 9'da listelendiği gibi buluşun bir örnek enzimiyle % 50 veya daha fazla özdeşliğine sahip ksilanazlar ve ilgili enzimler açıklanmaktadır. Aşağıdaki Tablo 9'da tarif edilen kladdaki sekanslar, hepsinin tanımlanan kladdaki tüm ksilanazlar arasında oldukça benzer olan CBM- benzeri X14 modülünü içermesiyle eşsizdir.

Tablo 9

| SEK ID NO'lar: | X14 | benzersiz aynı soydan gelen canlı |
|----------------|-----|-----------------------------------|
| 169, 170 | y | y |
| 195, 196 | y | y |
| 215, 216 | y | y |
| 161, 162 | y | y |
| 225, 226 | y | y |
| 159, 160 | y | y |
| 299, 300 | y | y |

| | | |
|----------|---|---|
| 233, 234 | y | y |
| 181, 182 | y | y |
| 165, 166 | y | y |
| 217,218 | y | y |
| 153, 154 | y | y |
| 219, 220 | y | y |
| 183, 184 | y | y |
| 253, 254 | y | y |
| 255, 256 | y | y |
| 221, 222 | y | y |
| 191, 192 | y | |
| 353, 354 | y | |
| 367, 368 | y | |
| 261, 262 | y | |
| 365, 366 | y | |
| 205, 206 | y | |
| 211, 212 | y | |

Kimerik ksilanazlar, örneğin açıklanan işlemlerde ve çeşitli endüstriyel, tıbbi, farmasötik, araştırma, gıda ve yem ve gıda ve yem takviyesi işlemlerinde ve diğer uygulamalarda kullanım için heterolog karbonhidrat bağlayıcı modüller (CBM'ler) içerebilir. Örneğin glikozil hidrolazlar (ksilanazlar, glukanazlar gibi) da dahil olmak üzere enzimler, örneğin hidrolazlar, Tablo 9'da özetlendiği gibi yukarıda tartışılan CBM

benzeri X14 modülü dahil olmak üzere buluşun bir enziminin bir veya daha fazla CBM'sini içerir. Veya CBM'ler, örneğin X14 modülleri, tarifnamenin farklı enzimleri arasında değiştirilebilir veya alternatif olarak tarifnamenin bir veya daha fazla enziminin bir veya daha fazla CBM'si bir enzim, örneğin bir hidrolaz, örneğin bir ksilanaz gibi herhangi bir glikosil hidrolazın içine eklenebilir.

Çözünmeyen substratları kullanan glikosil hidrolazlar, genellikle bir veya daha fazla katalitik olmayan karbonhidrat bağlayıcı modüle (CBM'ler) eklenmiş katalitik modüller içerecek şekilde modülerdir. Doğada CBM'lerin, glikosil hidrolazın hedef substrat polisakkaridiyle etkileşimini teşvik ettiği düşünülmektedir. Örneğin yukarıda tartışıldığı gibi X14 bir ksilan bağlama modülüdür. Bu nedenle "uçları birleştirilen" heterolog CBM'lerin, örneğin uçları birleştirilen X14 modülünün doğası gereği çoklu substratlara sahip olan, dolayısıyla kimerik enzime, ksilan ve galaktan için yeni özgülük ya da ksilan ve galaktan için gelişmiş bağlanma sağlayan kimerik enzimler dahil olmak üzere kimerik enzimler heterolog, doğal olmayan substratlara sahiptir. Kimerik enzimlerin heterolog CBM'leri modüler olacak şekilde yani aynı zamanda enzime heterolog olabilen veya homolog olabilen bir katalitik modül veya katalitik alana (örneğin bir aktif yer) eklenmek üzere tasarlanabilir.

Sadece bir ksilanazın veya bir glukanaazın katalitik modülünün kullanılmasının etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle peptitler ve polipeptitler, homolog olarak eşleştirilebilen veya kimerik (heterolog) aktif yer- CBM çiftleri olarak birleştirilebilen modüler CBM / aktif bölge modüllerinden (ör. X14, bakınız Tablo 9) oluşabilir veya bunları içerebilir. Dolayısıyla bu kimerik polipeptitler / peptitler münferit bir enzimin, örneğin bir ksilanaz enziminin performansını geliştirmek veya değiştirmek için kullanılabilir. Bir kimerik katalitik modül (örneğin en az bir CBM, ör. X14 içeren), enzimi bir substratın belirli bölgelerine, örneğin bir hamurun belirli bölgelerine hedeflemek üzere tasarlanabilir. Örneğin bu, ksilanaz ve çeşitli CBM'lerin (ya heterolog CBM ile bir ksilanaz ya da tarifnamenin bir CBM'sinin bir başka enzime, örneğin bir ksilanaz gibi bir hidrolaz ile) füzyonlarını yapmak suretiyle gerçekleştirilir. Örneğin CBM4, CBM6 ve CBM22'nin ksilanı bağladığı bilinmektedir ve hamur biyo- ağartmada ksilanazın etkinliğini artırabilir (bakınız ör. Czjzek (2001) J. Biol. Chem. 276 (51): 48580- 7 , CBM4, CBM6 ve CBM22'nin ilişkili olduğunu ve CBM'nin esas olarak ksilan ile etkileştiğine dikkat ediniz). Kristalize selülozu bağlayan ksilanaz ve CBM3a veya CBM3b füzyonu, ksilanazın hamurun kompleks polisakkarit matrisine nüfuz etmesine

ve erişilemeyen ksilanlara ulaşmasına yardımcı olabilir. Herhangi bir CBM, örneğin Boraston (2004) *Biochem. J.* 382:769- 781: tarafından incelenen gibi kullanılabilir.

| Aile | Protein | PDB kod |
|-------|--|------------|
| CBM1 | Selülaz 7A (<i>Trichoderma reesei</i>) | 1CBH |
| CBM2 | Ksilanaz 10A (<i>Cellulomonas fimi</i>) | 1EXG |
| | Ksilanaz 11A (<i>Cellulomonas fimi</i>) | 2XBD |
| | Ksilanaz 11A (<i>Cellulomonas fimi</i>) | 1HEH |
| CBM3 | Scaffoldin (<i>Clostridium cellulolyticum</i>) | 1G43 |
| | Scaffoldin (<i>Clostridium thermocellum</i>) | 1NBC |
| | Selülaz 9A (<i>Thermobifida fusca</i>) | 1TF4 |
| CBM4 | Laminarinaz 16A (<i>Thermotoga maritima</i>) | 1GUI |
| | Selülaz 9B (<i>Cellulomonas fimi</i>) | 1ULO; 1GU3 |
| | Selülaz 9B (<i>Cellulomonas fimi</i>) | 1CX1 |
| | Ksilanaz 10A (<i>Rhodothermus marinus</i>) | 1K45 |
| CBM5 | Selülaz 5A (<i>Erwinia chrysanthemi</i>) | 1AIW |
| | Kitinaz B (<i>Serratia marcescens</i>) | 1E15 |
| CBM6 | Ksilanaz 11A (<i>Clostridium thermocellum</i>) | 1UXX |
| | Ksilanaz 11A (<i>Clostridium stercorarium</i>) | 1NAE |
| | Ksilanaz 11A (<i>Clostridium stercorarium</i>) | 1UY4 |
| | Endoglukanaz 5A (<i>Cellvibrio mixtus</i>) | 1UZ0 |
| CBM9 | Ksilanaz 10A (<i>Thermotoga maritima</i>) | 1I8A |
| CBM10 | Ksilanaz 10A (<i>Cellvibrio japonicus</i>) | 1QLD |
| CBM12 | Kitinaz Chi1 (<i>Bacillus circulans</i>) | 1ED7 |

| | | |
|--------|--|------------|
| CBM13* | Ksilanaz 10A (<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>) | 1XYF |
| | Ksilanaz 10A (<i>Streptomyces lividans</i>) | 1MC9 |
| | Risin toksin B- zinciri (<i>Ricinus communis</i>) | 2AAI |
| | Abrin (<i>Abrus precatorius</i>) | 1ABR |
| CBM14 | Takistin (<i>Tachypleus tridentatus</i>) | 1DQC |
| CBM15 | Ksilanaz 10C (<i>Cellvibrio japonicus</i>) | 1GNY |
| CBM17 | Selülaz 5A (<i>Clostridium cellulovorans</i>) | 1J83 |
| CBM18* | Aglütinin (<i>Triticum aestivum</i>) | 1WGC |
| | Antimicrobial peptide (<i>Amaranthus caudatus</i>) | 1MMC |
| | Kitinaz/aglütinin (<i>Urtica dioica</i>) | 1EIS |
| CBM20* | Glukoamilaz (<i>Aspergillus niger</i>) | 1AC0 |
| | β -amilaz (<i>Bacillus cereus</i>) | 1CQY |
| CBM22 | Ksilanaz 10B (<i>Clostridium thermocellum</i>) | 1DYO |
| CBM27 | Mannanaz 5A (<i>Thermotoga maritima</i>) | 1OF4 |
| CBM28 | Selülaz 5A (<i>Bacillus</i> sp. 1139) | 1UWW |
| CBM29 | Katalitik olmayan protein 1 (<i>Pyromyces equi</i>) | 1GWK |
| CBM32 | Siyalidaz 33A (<i>Micromonospora viridifaciens</i>) | 1EUU |
| | Galaktoz oksidaz (<i>Cladobotryum dendroides</i>) | 1GOF clade |
| CBM34* | α -Amilaz 13A (<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>) | 1UH2 |
| | Neopülulanaz (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>) | 1J0H |
| CBM36 | Ksilanaz 43A (<i>Paenibacillus polymyxa</i>) | 1UX7 |

* Bu aileler, bunları listelemek için çok fazla yapı girişi içermektedir, bu yüzden yalnızca temsilcileri verilmektedir.

Bu nedenle bir uygulamadaki performansı arttırmak için enzimi belirli çözünmez polisakkaritlere hedeflemek üzere farklı (ör. heterolog) CBM'lerle bir glikosidazın bir füzyonu gibi kimerik hidrolazlar sağlanır. Kimerik glikosidaz buluşun bir enzimini içerebilir. Kimerik enzim, örneğin ağartma kimyasallarının daha büyük oranda azaltılması için hamur biyo- ağartma performansını arttırmak üzere farklı CBM'lerin füzyonlarını içerebilir. Yöntemler farklı ksilanazlara sahip farklı CBM'lerin (örneğin tarifnamenin ksilanaz CBM'leri) yeniden birleştirilmesini ve belirli bir uygulama veya substrat için en iyi kombinasyonu bulmak için elde edilen kimeriklerin taranmasını içerir.

10 SEK ID NO: 160'da (ör. SEK ID NO: 159 tarafından kodlanan) belirtilen bir sekansa sahip olan ksilanazın sinyal sekansının çıkarıldığı, "karbonhidrat- bağlama modülü"nden (CBM) çıkarıldığı ve bir başlangıç metiyoninin eklendiği SEK ID NO: 382'de belirtilen gibi bir sekansa sahip bir protein kesik bir versiyonu, SEK ID NO: 382'de (ör. SEK ID NO: 381 ile kodlanan) belirtilen bir sekansa sahip ksilanazı verir.

15 Daha sonra üç amino asit kalıntısı SEQ ID NO: 382 polipeptitinin karboksi ucundan çıkarılmış, SEK ID NO: 384 (SEK ID NO: 383 ile kodlanan) elde edilmiştir. Bu kalıntılardan biri, çıkarıldığında proteinin pl'sini arttıran bir glutamat olmuştur. Bu silme, enzimin vahşi tip enzime kıyasla alkali pH'ta odun hamurunu parlaklaştırma yeteneğinde bir artışa neden olmuştur. Bir başka yönde SEQ ID NO: 382'nin bir GSSM varyantının, ör. polipeptit SEK ID NO: 482 (aşağıya bakınız), karboksi terminal ucundan üç amino asit kalıntısı çıkarılır.

25 Bu nedenle bir ksilanazın performansı, örneğin yüksek pH'ta bir ksilanaz sekansının C terminal ucunda veya yakınında "EGG" (veya eşdeğeri) amino asit kalıntılarının çıkarılmasıyla artırılır. Bir yönde "EGG" (veya eşdeğeri), modifiye edilecek olan ksilanazın glikozil hidrolaz bölgesinden hemen sonra (derhal) çıkarılır.

Örneğin buluşun herhangi bir polipeptitinin karboksi- veya amino terminal uçlarından bir, iki, üç, dört veya beş veya daha fazla kalıntının uzaklaştırıldığı diğer varyasyonlar da bu açıklamanın kapsamı dahilindedir. Başka bir varyasyon bir polipeptitin pl'sini

arttırmak veya azaltmak için herhangi bir kalıntıyı modifiye etmeyi, örneğin bir glutamatin örneğin çıkarılmasını veya değiştirilmesini (başka bir amino aside) içerir. Bu yöntem hiç bir amino asit mutasyona uğratılmadığından, düzenleyici sorunlar yaratmadan enzimin özelliklerini iyileştirmek için genel bir şema olarak kullanılmıştır ve bu genel şema buluşun herhangi bir polipeptiti ile kullanılabilir.

SEK ID NO: 384 polipeptiti, Tablo 11'de özetlendiği gibi GSSM kullanılarak daha da geliştirilmiştir:

| Mutasyon | Amino asidi değiştirilmiş pozisyonları | asidi nükleotit | Vahşi tip (WT) Sekans | GSSM Sekans | Değiştirilmiş aynı amino asidi de kodlayan diğer kodonlar |
|----------|--|-----------------|-----------------------|-------------|---|
| T4L | 10- 12 | | ACC | CTT | TTA, TTG, CTC, CTA, CTG |
| S9P | 25- 27 | | AGT | CCC | CCG, CCA, CCT |
| Q10S | 28- 30 | | CAA | TCA | TCC, TCT, TCG, AGT, AGC |
| T13F | 37- 39 | | ACT | TTT | TTC |
| T13Y | 37- 39 | | ACT | TAC | TAT |
| T13I | 37- 39 | | ACT | ATA | ATT, ATC |
| T13W | 37- 39 | | ACT | TGG | - |
| N14H | 40- 42 | | AAC | CAC | CAT |
| Y18F | 52- 54 | | TAT | TTC | TTT |
| S25E | 73- 75 | | AGT | GAG | GAA |
| S25P | 73- 75 | | AGT | CCC | CCG, CCA, CCT |
| N30V | 88- 90 | | AAT | GTG | GTC, GTA, GTT |
| Q34C | 100- 102 | | CAG | TGT | TGC |
| Q34H | 100- 102 | | CAG | CAT | CAC |

| | | | | |
|-------|----------|-----|-----|-------------------------|
| Q34L | 100- 102 | CAG | TTG | TTA, CTT, CTC, CTA, CTG |
| S35E | 103- 105 | TCC | GAG | GAA |
| S35D | 103- 105 | TCC | GAT | GAC |
| S71T | 211- 213 | TCA | ACA | ACT, ACC, ACG |
| S71C | 211- 213 | TCA | TGT | TGC |
| S194H | 508- 582 | AGT | CAT | CAC |

SEK ID NO: 384 polipeptiti, örneğin SEK ID NO: 481 ile kodlanan SEK ID NO: 482'yi oluşturmak için GSSM kullanılarak evrimleşmiştir:

5 MAQTCLTSPQTCFHNCFFYSEWKDSPGTVNFCLLEGC RYTSNWSGJNNWVGGKQW
 QIGSRRNILYSGSENFPGNGYLALYGWFTNPLVEYYVADSWGSRPFGSIXGTHIGT
 VNSDGGTYDIYRAQRVNAPSHIGNATEFYQYWVYRQSKRVGGTITICNHEDAWASVQ
 LNLGTHNYQIMATLGYQSSGSSDHTVS (SEQ ID NO: 482)

ATGGGCCAGACCTGCCCTCACCTGGCCCCAAACCGCCTTTCACAAATGGCTTCTTCT
 ATTCTTCTTGGAAACGACAGTCCGGGCACGGGIGAAATTTTIGCTTGTTCGAGGGCCCG
 CCGTTACACATCGAAGCTCGACGGGCATCAACAACCTGGGTGGCGGCCAAGGGGATG
 GCAGACCGGTTCACGGCCGGAACATCACGTACTGGGGACGTTCAATACACCCCGG
 CAACGGCTACCTGGCCCTTTACGGATGGACCACCAATCCACTCGTCGAGTACTAC
 GTCTTCCATAGCTCGGGGACGTTGGCGTCCGGCCGGCTTCGGACCGCAACGTTCTTG
 GCGACGGTCAACACCGATCGCGCAACGTAATGACATCTATCGCCCGCACCGGCTC
 AACGGCCCGGCCATCATCGGCAACGCCACGTTCTATCAATACTGGAGCGTTCGGC
 ACTCGAAGCGGGTAGGTTGGGACCGTCAACACCGGAACCACTTCGGACCGGTGGG
 CCACCGTGGGCTTGAACCTGGGCACCTACAACCTACCAGATCATGGCGACCGGAGG
 CCTACCAAAGCAGCGGCACCTCCGACATCAAGCTGAGTTGA (SEQ ID NO: 481)

10 **SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482 arasındaki farklar:**

İlk olarak SEK ID NO: 382'nin C- ucundan üç amino asit çıkarılmıştır. Bu, enzimin pH performansını arttırmak için yapılmıştır. İkinci olarak enzimin performansını yüksek sıcaklıklarda ve yüksek pH'ta arttırmak için yedi amino asit değiştirilmiştir. Bu nedenle ürünlerdeki aktif SEK ID NO: 482 enzimi, biraz değiştirilmiş SEK ID NO: 382 katalitik alanını içerir.

15

Ornek sekans SEK ID NO: 382'de yapılan değişikliklerin özeti

Buluşun örnek sekansı SEK ID NO: 382'ye yapılan değişikliklerin bir özeti, Şekil 13'te verilmiştir, buradaki şekil yüksek pH'ta arttırılmış performans sağlamak için C- ucu EGG sekansının çıkarılmasını göstermektedir, bunu yedi (7) amino asit kalıntısında bir değişiklik takip eder- bu ürün yüksek pH ve yüksek sıcaklıkta yüksek performansa sahiptir, nihai ürün SEK ID NO: 482 sekansına sahiptir.

SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482 arasındaki amino asit değişikliklerinin ayrıntıları :

10

| Amino Asit pozisyonu | 9 | 13 | 14 | 18 | 34 | 35 | 71 |
|----------------------|---|----|----|----|----|----|----|
| SEK ID NO: 382 | S | T | N | Y | Q | S | S |
| SEK ID NO: 482 | P | F | H | F | L | E | T |

Dolayısıyla tarifname ksilanaz etkinliğine sahip izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlar, burada polipeptit (yukarıda tanımlandığı gibi SEK ID NO: 2 ila SEK ID NO: 636 arasındaki tüm çift sekanslar dahil olmak üzere, sekans listesine bakınız) tarifnamenin örnek herhangi bir amino asit sekansını içeren bir sekans modifikasyonuna sahiptir, burada sekans modifikasyonu en az bir, iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on, on bir, on iki, on üç, on dört, on beş, on altı, on yedi, on sekiz, on dokuz veya aşağıdaki değişikliklerin tümünü içerir: SEK ID NO: 384'ün kalıntı 4'ündeki treonine eşdeğer amino asidi lösindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 9'undaki serinin eşdeğer amino asidi prolindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 10'undaki glutaminin eşdeğeri amino asidi serindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 13'ündeki treoninin eşdeğer amino asidi fenilalanindir, SEK ID NO. : 384'ün kalıntı 13'ündeki treonine eşdeğer amino asit tiroindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı13'ündeki treonine eşdeğer amino asidi izolösindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 13'ündeki treonine eşdeğer amino asidi triptofandır, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 14'ündeki asparajin eşdeğeri amino asit histidindir SEK ID NO: 384'ün kalıntı 18'indeki tirozin eşdeğeri amino asidi fenilalanindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 25'indeki serin eşdeğeri aminoasidi glutamik

20

25

asittir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 25'indeki serin eşdeğeri amino asidi prolindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 30'undaki asparajın eşdeğeri amino asidi valindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 34'ündeki glutamin eşdeğeri amino asit sistindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 34'ündeki glutamin eşdeğeri amino asit histidindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 34'ündeki glutamin eşdeğeri amino asit lösindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 35'indeki serin eşdeğeri amino asit glutamik asittir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 35'indeki serin eşdeğeri amino asit aspartik asittir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 71'indeki serin eşdeğeri amino asit treonindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 71'indeki serin eşdeğeri amino asit sisteindir, SEK ID NO: 384'ün kalıntı 194'ündeki serin eşdeğeri amino asit histidindir.

10 Sekans değişiklik(ler)i bir polipeptitin pl'sini değiştirmek için herhangi bir amino asit modifikasyonunu, örneğin bir glutamatın silinmesini veya modifikasyonunu veya bir glutamatı bir başka kalıntıyla değiştirmeyi de içerebilir.

Buluş ayrıca ksilanaz etkinliğine sahip izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlar, burada polipeptit bir, iki, üç, dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on, on bir, on iki, onüç, on dört, on beş, on altı, on yedi, on sekiz, on dokuz değişikliğe veya SEK ID NO: 384'ün amino asit sekansında yapılan aşağıdaki değişikliklerin tümüne sahiptir: amino asit pozisyon 4'teki treonin lösindir, amino asit pozisyon 9'daki serin prolindir, aminoda asit pozisyon 10'daki glutamin serindir, amino asit pozisyon 13'teki treonin fenilalanindir, amino asit pozisyon 13'teki treonin tirosindir, amino asit pozisyon 13'teki treonin izolösindir, amino asit pozisyon 13'teki treonin triptofandır, amino asit pozisyon 14'deki asparajın histidindir, amino asit pozisyon 18'deki tirozin fenilalanindir, amino asit pozisyon 25'deki serin glutamik asittir, amino asit pozisyon 25'deki serin prolindir, amino asit pozisyon 30'daki asparajın valindir, amino asit pozisyonun 34'deki glutamin sisteindir, amino asit pozisyon 34'deki glutamin histidindir, amino asit pozisyon 34'deki glutamin lösindir, amino asit pozisyon 35'deki serin glutamik asittir, amino asit pozisyon Şekil 35'deki serin aspartik asittir, amino asit pozisyon 71'deki serin treonindir, amino asit pozisyon 71'deki serin sisteindir veya amino asit pozisyon 194'deki serin histidindir.

Açıklama ayrıca tarifmanemin örnek bir sekansı ile (örneğin en az yaklaşık % 50, % 51, % 52, % 53, % 54, % 55, % 56, % 57, % 58, % 59, % 60, % 61, % 62, % 63, % 64, % 65, % 66, % 67, % 68, % 69, % 70, % 71, % 72, % 73, % 74, % 75, % 76, % 77, % 78, % 79, % 80, % 81, % 82, % 83, % 84, % 85, % 86, % 87, % 88, % 89, % 90, % 91, % 92, % 93, % 94, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 veya daha fazla veya tam (% 100)

sekans özdeşliği) bir sekans özdeşliğine sahip izole edilmiş, sentetik veya rekombinant polipeptitler sağlar.

Bir yönde polipeptitin bir ksilanaz aktivitesi vardır, örneğin burada ksilanaz aktivitesi bir polisakkaritte, örneğin bir ksilanda bir glikozidik bağın hidrolize edilmesini içerebilir. Bir yönde polipeptit iç β - 1,4- ksilosidik bağların hidrolizini katalize eden bir ksilanaz aktivitesine sahiptir. Bir yönde ksilanaz aktivitesi bir endo- 1,4- beta- ksilanaz aktivitesi içerir. Bir yönde ksilanaz aktivitesi daha küçük molekül ağırlıklı bir ksiloz ve ksilol-oligomer üretmek üzere bir ksilanın hidrolize edilmesini içerir. Bir yönde ksilan suda çözünür bir arabinoksilan gibi bir arabinoksilan içerir.

- 10 Teknikte bilinen herhangi bir ksilanaz analizi, bir polipeptitin ksilanaz aktivitesine sahip olup olmadığını ve buluşun kapsamında olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir. Örneğin Nelson- Somogyi yöntemi veya dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi gibi şeker analizlerinin azaltılması, ürün şekerlerinin (ve dolayısıyla ksilanaz aktivitesinin) analiz edilmesi için kullanılabilir. Reaksiyonlar enzim preparatı seyreltiğinin tamponlanmış bir
- 15 pH ve ayarlanan sıcaklıkta bilinen bir miktarda substrat ile karıştırılması ve inkübe edilmesi ile gerçekleştirilir. Ksilanaz analizleri ksilan (örneğin yulaf kavuzu veya huş) çözeltisinin CMC veya filtre kağıdının yerini alması haricinde selüloz analizlerine benzerdir. DNS analiz Nelson- Somogyi analizinden daha kolaydır. DNS analizi selüloz aktiviteleri için tatmin edici olmakla birlikte, ksilanaz aktivitesini büyütme eğilimindedir.
- 20 Somogyi- Nelson prosedürü indirgeyici şekerlerin belirlenmesinde, spesifik aktivitelerin ölçülmesinde ve optimize edilmiş büyüme koşullarında üretilen toplam ksilanaz miktarının tayin edilmesinde daha doğrudur, bkz. ör. Breuil (1985) Comparison of the 3, 5- dinitrosalicylic acid and Nelson- Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity, *Enzyme Microb. Technol.* 7:327-332; Somogyi, M. 1952, Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* 195:19- 23'Te'te
- 25 açıklandığı gibi. Any reducing sugar assay may be used, e.g., by Nelson- Somogyi, e.g., based on references Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.* 153:375- 380, and Somogyi, M. (1952) *J. Biol. Chem.* 195:19- 23.

- 30 SEK ID NO: 182'de (ör. SEK ID NO: 181 ile kodlanan) ("SEK ID NO: 181/182") belirtilen bir sekansa sahip olan ksilanazın ve SEK ID NO: 382'de (ör. SEK ID NO: 381 ile kodlanan) ("SEK ID NO: 381/382") belirtilen bir sekansa sahip olan ksilanazın diğer enzimlere göre pH 8'de hamur parlaklığını arttırdığı gösterilmiştir. Parlaklık artışı eşit miktarda birim dozlandığında her iki enzim için benzerdir. Bu iki üst düzey performans

SEK ID NO: 381/ 382'den daha büyük parlaklık seviyelerine yol açacak şekilde SEK ID NO: 182 (ör. SEK ID NO: 181 ile kodlanmış) ("SEK ID NO: 181/182") ile pH 10'da denendiğinde farklılık gösterir. SEK ID NO: 181/182, 8,8'lik pl'ye ve SEQ ID NO: 382 (ör. SEK ID NO: 381 tarafından kodlanan) 7,9'luk bir pl'ye sahiptir. SEK ID NO: 381/382

5 197 amino asit uzunluğundadır. SEK ID NO: 384 ile sonuçlanacak şekilde (SEK ID NO: 383 ile kodlanan) E195, G196 ve G194 çıkarıldığında, pl 8,5 olur. Bu yapının yüksek pH'ta daha iyi etkinliği vardır çünkü proteinin pl'si kesik yapıdaki SEK ID NO: 181 / 182'ye daha yakındır.

SEK ID NO: 182 (ör. SEK ID NO: 181 tarafından kodlanan), SEK ID NO: 382 (ör. SEK ID NO: 381 tarafından kodlanan) ve SEK ID NO: 384 (ör. SEK ID NO: 383 tarafından kodlanan) üç gen eksprese edilmiş ve gen ürünleri Nelson- Somogyi indirgeyici şeker analizi kullanılarak analiz edilmiştir, enzimin U / ml'si bir birimin 1 μmol ksiloz dk^{-1} serbest bırakacak enzim miktarıdır. Enzimler 2 U / g'lık OD (fırında kurutulmuş) hamurda dozlanmış ve aşağıdaki Örnek 8'de tarif edilen uygulamaların biyolojik

10 15 ağartma protokolüne göre analiz edilmiştir.

"Biyoağartma" çalışmasının sonuçları, Şekil 12 ve pH 8'de gösterilmektedir. SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 182 geçmişte görüldüğü üzere pH = 10'da kontrol, C- 0,21'den daha iyi performans göstermiştir. SEK ID NO: 382 performansı geçmişte görüldüğü gibi pH = 10'da kontrolün, C- 0,21, altına düşmüştür, SEK ID NO: 182 performansı

20 25 geçmişte görüldüğü gibi kontrolün, C- 0,21, altına düşmemiştir, SEK ID NO: 384 pH = 8'de SEK ID NO: 382'den ve SEK ID NO: 182'den daha iyi performans göstermiştir, SEK ID NO: 384'ün pH = 10'daki performansı kontrolün, C- 0,21, altına düşmemiştir ve SEK ID NO: 182'ninkiyle karşılaştırılabilir. Bu sonuçlar kesik SEK ID NO: 384'ün (ör. SEK ID NO: 383 tarafından kodlanan), SEK ID NO: 182 (SEK ID NO: 181

30 tarafından kodlanmış) gibi performans sergilediğini ancak SEK ID NO: 382'nin bu koşullar altında yetersiz performans sergilediğini gösterir. Enzimler SSWB'nin 0,18 Kappa Faktöründe muamele edilmesi için kullanılmıştır. Şekil 12'de siyah çizgiler 0,18 (alt çizgi) ve 0,21 (üst çizgi) kontrol parlaklık seviyelerini temsil etmektedir. Bu "biyo-ağartma" çalışması, ksilanaz enzimlerinin özelliklerini geliştirmek için gen kesilmesi

30 kullanımı göstermektedir. Bu "biyo- ağartma" çalışması ayrıca bir ksilanazın artmış pl'sinin, Southern Softwood Pine Brownstock'un (SSWB) daha yüksek performansına yol açtığını göstermektedir.

- Buluşun polipeptitleri aktif veya inaktif bir formda ksilanazları içerir. Örneğin buluşun polipeptitleri "aktif" bir olgun protein üretmek için "olgunlaşma"dan ya da " bir proprotein konvertaz gibi bir proprotein- işleme enzimi gibi prepro sekanslarının işlenmesinden önce proproteinleri içerir. Buluşun polipeptitleri diğer nedenlerden ötürü, örneğin bir
- 5 translasyon sonrası işleme olayı ile "aktivasyon"dan önce, örneğin bir endo- veya ekso- peptitaz veya proteinaz eylemi, bir fosforilasyon olayı, bir amidasyon, bir glikozilasyon veya bir sülfasyon, bir dimerizasyon olayı ve benzerlerinden ötürü inaktif olan ksilanazları içerir. Buluşun polipeptitleri ksilanazın aktif alt sekanslar, örneğin katalitik alanlar veya aktif yerler dahil olmak üzere tüm aktif formlarını içerir.
- 10 "Prepro" alan sekanslarının ve sinyal sekanslarının tanımlanması için yöntemler, teknikte iyi bilinmektedir, bakınız örneğin Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115- 136. Örneğin bir prepro sekansını tanımlamak için protein hücre dışı boşluktan arındırılır ve N- uçlu protein sekansı belirlenir ve işlenmemiş form ile karşılaştırılır.
- 15 Buluş bir sinyal sekansı olan ve olmayan polipeptitleri ve / veya bir prepro sekansını içerir. Buluş heterolog sinyal dizileri ve / veya prepro dizileri olan polipeptitleri içerir. Prepro dizisi (bir heterolog prepro alanı olarak kullanılan buluşun bir sekansı da dahil olmak üzere), proteinin amino terminali veya karboksi terminali ucunda bulunabilir. Buluş ayrıca buluşun sekanslarını içeren izole edilmiş, sentetik veya rekombinant
- 20 sinyal dizilerini, prepro dizilerini ve katalitik bölgeleri (örneğin "aktif yerler") içerir.
- Sekans yüzdesi özdeşliği polipeptitin tam uzunluğu boyunca olabilir veya özdeşlik en az yaklaşık 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 veya daha fazla kalıntı içeren bir bölge üzerinde olabilir. Buluşa ait polipeptitler aynı zamanda örnek polipeptitlerin tam uzunluğundan daha kısa olabilir.
- 25 Alternatif yönlerde buluş yaklaşık 5 ile bir polipeptitin, örneğin bir ksilanaz gibi bir enzimin tam uzunluğu arasında değişen boyutlarda polipeptitler (peptitler, fragmanlar) sağlar, örnek boyutlar yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 veya daha fazla kalıntı, örneğin buluşun bir örnek ksilanazının bitişik kalıntılarıdır.
- 30 Buluşa ait peptitler (ör. buluşun örnek bir polipeptitinin bir alt sekansı), örneğin etiketleme problemleri, antijenler, tolerojenler, motifler, ksilanaz aktif yerleri (ör. "katalitik alanlar"), sinyal sekansları ve / veya prepro alanları olarak faydalı olabilirler.

Buluşa ait polipeptitler ve peptitler doğal kaynaklardan izole edilebilir, sentetik olabilir veya rekombinant olarak üretilen polipeptitler olabilirler. Peptitler ve proteinler rekombinant olarak in vitro veya in vivo olarak eksprese edilebilir. Buluşa ait peptitler ve polipeptitler teknikte bilinen herhangi bir yöntem kullanılarak yapılabilir ve izole edilebilir. Buluşa ait polipeptit ve peptitler ayrıca teknikte iyi bilinen kimyasal yöntemler kullanılarak kısmen veya tamamen sentezlenebilir. Bakınız örneğin Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215- 223; Horn (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225- 232; Banga, A. K. , Therapeutic peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co. , Lancaster, PA. Örneğin peptit sentezi çeşitli katı faz teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir (bakınız ör. Roberge (1995) Science 269: 202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289: 3- 13) ve otomatik sentezler, ör. üretici tarafından sağlanan talimatlara göre ABI 431A peptit Sentezleyici (Perkin Elmer) kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Buluşa ait peptitler ve polipeptitler ayrıca glikozile edilebilir. Glikozilasyon ya kimyasal olarak ya da hücrenel biyosentetik mekanizmalarla translasyonel olarak eklenebilir, burada daha sonra bilinen glikozilasyon motiflerinin kullanımı diziye doğal olabilir ya da bir peptit olarak eklenebilir ya da nükleik asit kodlama sekansına eklenebilir. glikozilasyon O bağlantılı veya N bağlantılı olabilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "amino asit" veya "amino asit sekansı" bir oligopeptit, peptit, polipeptit veya protein sekansı veya bunların herhangi birinin bir fragmanı, kısmı veya alt birimini ve doğal olarak oluşan veya sentetik molekülleri belirtir. "Amino asit" veya "amino asit sekansı" bir oligopeptit, peptit, polipeptit veya protein sekansı veya bunların herhangi birinin bir fragmanı, kısmı veya alt birimi ve doğal olarak oluşan veya sentetik molekülleri içerir. Burada kullanıldığı şekliyle "polipeptit" terimi peptit bağları veya modifiye edilmiş peptit bağları, yani peptit izosterleri ile birbirine bağlanmış amino asitleri belirtir ve 20 gen kodlu amino asitler dışında modifiye amino asitleri içerebilir. Polipeptitler ya translasyon sonrası işleme gibi doğal işlemlerle ya da teknolojiye iyi bilinen kimyasal modifikasyon teknikleriyle modifiye edilebilir. Modifikasyonlar peptit omurgası, amino asit yan zincirleri ve amino veya karboksil uçları dahil olmak üzere polipeptitin herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Aynı tip modifikasyonun, belirli bir polipeptitteki çeşitli bölgelerde aynı veya değişken derecelerde mevcut olabileceği takdir edilecektir. Ayrıca belirli bir polipeptitin birçok tipte modifikasyonu olabilir. Modifikasyonlar arasında asetilasyon, açilasyon, ADP- ribozilasyon, amidasyon, flavin

kovalent bağı, bir heme grubunun kovalent bağı, bir nükleotit veya nükleotit türevinin kovalent bağı, bir lipit veya lipit türevinin kovalent bağı, bir fosfitidinilinositolün kovalent bağı, çapraz siklizasyon, disülfid bağ oluşumu, demetilasyon, kovalent çapraz bağlarının oluşumu, sistein oluşumu, piroglutamat oluşumu, formilasyon, gama-karboksilasyon, glikozilasyon, GPI ankor oluşumu, hidroksilasyon, iyodinasyon, metilasyon, miristoliyasyon, oksidasyon, pegilasyon, ksilan hidrolaz işleme, fosforilasyon, prenilleme, rasemizasyon, selenoilasyon, sülfasyon ve arjinilasyon gibi aminoasitlerin proteine transfer- RNA aracılı eklenmesini içerir. (Bakınız Creighton, T. E. , Proteins - Structure and Molecular Properties 2nd Ed. , W. H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed. , Academic Press, New York, sayfa 1- 12 (1983)). Buluşa ait peptitler ve polipeptitler ayrıca aşağıda daha detaylı olarak tarif edildiği gibi tüm "mimetik" ve "peptitomimetik" formları içerir.

"Rekombinant" polipeptitler veya proteinler, rekombinant DNA teknikleriyle üretilen polipeptitleri veya proteinleri belirtir yani istenen polipeptiti veya proteini kodlayan bir eksojen DNA yapısı tarafından dönüştürülmüş hücrelerden üretilir. "Sentetik" polipeptitler veya protein kimyasal sentezle hazırlananlardır. Katı- fazlı kimyasal peptit sentezi yöntemleri buluşun polipeptitlerini sentezlemek için de kullanılabilir. Bu yöntem 1960'ların başından beri bilinmektedir (Merrifield, RB, J. Am. Chem. Soc. , 85: 2149-2154, 1963) (ayrıca bakınız Stewart, JM ve Young, J. D. , Solid Phase peptite Synthesis, 2nd Ed. , Pierce Chemical Co. , Rockford, I11. , sayfa 11- 12)) ve son zamanlarda ticari olarak temin edilebilen laboratuvar peptit tasarım ve sentez kitlerinde (Cambridge Research Biochemicals) kullanılmıştır. Bu tür ticari olarak temin edilebilen laboratuvar kitleri genellikle HM Geysen vd. , Proc. Natl. Acad. Sci. , ABD, 81: 3998 (1984) öğretilerini kullanırlar ve hepsi tek bir plakaya bağlı olan çok sayıda "çubuk" veya "iğne"nin uçları üzerinde peptitlerin sentezlenmesini sağlarlar. Böyle bir sistem kullanıldığında, bir çubuk veya iğne plakası ters çevrilmekte ve uygun bir amino asidin iğnenin veya çubuğun uçlarına tutturulması veya bağlanması için çözeltiler içeren, karşılık gelen kuyu veya rezervuarların ikinci bir plakasına sokulmaktadır. Böyle bir işlem adımının tekrarlanmasıyla, yani çubukların ve iğnelerin uçlarının uygun çözeltilere çevrilmesi ve sokulması ile amino asitler istenen peptitlere dönüştürülür. Ek olarak birtakım kullanılabilir Fmoc peptit sentezi sistemleri mevcuttur. Örneğin bir polipeptit veya fragmanın bir araya getirilmesi, bir Applied Biosystems, Inc. Model

431A otomatik peptit sentezleyicisi kullanılarak katı bir destek üzerinde gerçekleştirilebilir. Bu tür ekipmanlar ya doğrudan sentez yoluyla ya da bilinen diğer teknikler kullanılarak birleştirilebilen bir dizi fragmanın sentezi yoluyla buluşun peptitlerine kolay erişim sağlar.

- 5 Burada kullanılan "fragmanlar" en az iki farklı konformasyonda bulunabilen doğal olarak oluşan bir proteinin bir kısmıdır. Fragmanlar doğal olarak meydana gelen proteinle aynı veya büyük ölçüde aynı amino asit sekansına sahip olabilir. "Büyük ölçüde aynı" ifadesi bir amino asit sekansının büyük ölçüde aynı olduğu ancak tamamen aynı olmadığı ancak ilgili olduğu sekansın en az bir fonksiyonel aktivitesini muhafaza ettiği anlamına gelir. Genel olarak iki amino asit sekansı, en az yaklaşık %
- 10 85 özdeş olduklarında "büyük ölçüde aynı" veya "büyük ölçüde homolog"dur. Doğal olarak meydana gelen protein olarak farklı üç boyutlu yapılar sahip fragmanlar da dahil edilmiştir. Bunun bir örneği önemli ölçüde daha yüksek aktiviteye sahip olgun bir enzim üretmek üzere bölünme ile modifiye edilebilen düşük aktivite proproteini gibi bir
- 15 "pro- form" molekülüdür.

Yukarıda tarif edildiği gibi buluşun peptitleri ve polipeptitleri tüm "mimetik" ve "peptitomimetik" formları içerir. "Mimetik" ve "peptitomimetik" terimleri buluşun polipeptitlerinin büyük ölçüde aynı yapısal ve / veya fonksiyonel özelliklerine sahip olan bir sentetik kimyasal bileşiği ifade eder. Mimetik tamamen sentetik, doğal olmayan

20 amino asit analoglarından oluşabilir veya kısmen doğal peptit amino asitlerinin ve kısmen doğal olmayan amino asit analoglarının kimerik bir molekülüdür. Mimetik ayrıca bu tür sübstitüsyonlar mimetik yapısını ve / veya aktivitesini önemli ölçüde değiştirmedeği sürece herhangi bir miktarda doğal amino asit muhafazakar sübstitüsyonlarını da içerebilir. Muhafazakar varyantlar olan buluşun polipeptitleri ile

25 ilgili olarak rutin deneyler bir mimitiğin buluşun kapsamı içinde olup olmadığını, yani yapısının ve / veya fonksiyonunun büyük ölçüde değiştirilip değiştirilmediğini belirleyecektir. Dolayısıyla bir yönüyle bir ksilanaz aktivitesi varsa, bir mimetik bileşim buluşun kapsamı dahilindedir.

Buluşun polipeptit mimetik bileşimleri, doğal olmayan yapısal bileşenlerin herhangi bir

30 kombinasyonunu içerebilir. Alternatif açıdan buluşun mimetik bileşimleri aşağıdaki üç yapısal grubun birini veya hepsini içerir: a) doğal amid bağı ("peptit bağı") bağlayıcıları dışındaki kalıntı bağlayıcı gruplar; b) doğal olarak meydana gelen amino asit kalıntıları yerine doğal olmayan kalıntılar; veya c) sekonder yapısal taklidi indükleyen, yani ikincil

- bir yapıyı, örneğin bir beta dönüşü, gama dönüşü, beta tabakası, alfa sarmal konformasyonunu ve benzerlerini indükleyen veya stabilize etmek için kullanılan kalıntılar. Örneğin buluşun bir polipeptiti kalıntılarının tümü veya bir kısmı doğal peptit bağları dışındaki kimyasal yollarla birleştirildiğinde bir mimetik olarak karakterize edilebilir. Bireysel peptitomimetik kalıntıları, örneğin glutaraldehit, N-hidroksisüksinimid esterleri, bifonksiyonel maleimidler, N, N'-disikloheksilkarbodiimid (DCC) veya N, N'-diizopropilkarbodiimid (DIC) gibi peptit bağları, diğer kimyasal bağlar veya birleştirme araçları ile birleştirilebilir. Geleneksel amid bağı ("peptit bağı") bağlayıcılarına alternatif olabilecek bağlayıcı gruplar, örneğin ketometilen (örneğin - C(=O)- NH- için - C(=O)- CH₂-), aminometilen (CH₂- NH), etilen, olefin (CH=CH), eter (CH₂- O), tiyoeter (CH₂- S), tetrazol (CN₄-), tiyazol, retroamid, tiyoamid veya esteri içerir (bakınız, ör. Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267- 357, "peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY).
- Buluşun bir polipeptiti doğal olarak meydana gelen amino asit kalıntılarının yerine tüm doğal olmayan kalıntıları içererek bir mimetik olarak da karakterize edilebilir. Doğal olmayan kalıntılar bilimsel ve patent literatüründe iyi tanımlanmıştır, doğal amino asit kalıntılarının taklitleri olarak faydalı birkaç örnek doğal olmayan bileşim ve kılavuzlar aşağıda açıklanmaktadır. Aromatik amino asitlerin mimetikleri, ör. D- veya L-nafilalanin; D- veya L-fenilglisin; D- veya L-2 tiyeneylalanin; D- veya L-1, -2, 3- veya 4-pirenilalanin; D- veya L-3 tiyeneylalanin; D- veya L-(2-piridinil) - alanin; D- veya L-(3-piridinil) - alanin; D- veya L-(2-pirazinil) - alanin; D- veya L-(4-izopropil) - fenilglisin; D-(triflorometil) - fenilglisin; D-(triflorometil) - fenilalanin; D-p-floro-fenilalanin; D- veya L-p-bifenilfenilalanin; D- veya L-p-metoksi-bifenilfenilalanin; D- veya L-2-indol(alkil) alaninler ve D- veya L-alkilalaninler, burada alkil süstitüe edilmiş veya süstitü edilmemiş metil, etil, propil, heksil, butil, pentil, izopropil, izo-butil, sek-izotil, izopentil veya asidik olmayan bir amino asit olabilir, ile değiştirilerek üretilebilir. Doğal olmayan bir amino asidin aromatik halkaları, örneğin tiyazolil, tiyofenil, pirazolil, benzimidazolil, naftil, furanil, pirolil ve piridil aromatik halkaları içerir.
- Asidik amino asitlerin mimetikleri, örneğin bir negatif yük muhafaza edilirken, karboksilat olmayan amino asitlerle; (fosfono) alanin; sülfatlanmış treonin ile süstitüe edilerek üretilebilir. Karboksil yan grupları (ör. aspartil veya glutamil) ayrıca, örneğin 1-sikloheksil-3 (2-morfolinil- (4-etil) karbodiimid veya 1-etil-3 (4-azonia-4,4-

dimetolpentil) karbodiimid gibi karbodiimidler (R'- NCN- R ') ile reaksiyona sokularak seçici olarak modifiye edilebilir. Aspartil veya glutamil, amonyum iyonları ile reaksiyona sokularak asparajnil ve glutaminil kalıntılarına da dönüştürülebilir. Bazik amino asitlerin mimetikleri, örneğin (lizin ve arjinin ek olarak) ornitin, sitrülün veya (guanidino) -asetik asit veya (guanidino) alkil-asetik asit ile süstitüe edilerek üretilebilir, burada 5 -asetik asit veya (guanidino) alkil-asetik asit ile süstitüe edilerek üretilebilir, burada alkil yukarıda tanımlandığı gibidir. Nitril türevi (örneğin COOH yerine CN- grubu içeren) asparajin veya glutaminin yerini alabilir. Asparajnil ve glutaminil kalıntıları, ilgili aspartil veya glutamil kalıntılarında deamine edilebilir. Arjinin kalıntısı mimetikleri, arjininin örneğin fenilpiroksal, 2,3- butanedion, 1,2- siklo- heksandion, veya ninhidrini içeren bir 10 veya daha fazla geleneksel reaktan ile tercih edilen şekliyle alkali koşullar altında reaksiyona sokularak üretilebilir. Tirosin kalıntısı mimetikleri tirosilin, örneğin aromatik diazonyum bileşikleri veya tetranitrometan ile reaksiyona sokulmasıyla oluşturulabilir. Sırasıyla O-asetil tirosil türleri ve 3- nitro türevlerini oluşturmak için N-asetilimidazol ve tetranitrometan kullanılabilir. Sistein kalıntı mimetikleri karboksimetil veya 15 karboksamidometil türevlerini vermek üzere sisteinil kalıntılarının, örneğin 2- kloroasetik asit veya kloroasetamid gibi alfa- haloasetatlar ve karşılık gelen aminler ile reaksiyona sokulmasıyla üretilebilir. Sistein kalıntı mimetikleri sisteinil kalıntılarının, örneğin bromo- trifloroaseton, alfa- bromo- beta- (5- imidozöl) propiyonik asit; kloroasetil fosfat, N- alkilmaleimidler, 3- nitro- 2- piridil disülfür; metil 2- piridil disülfür; 20 p- kloromerküribenzoat; 2- kloromerküri- 4 nitrofenol; veya kloro- 7- nitrobenzo- oksa- 1,3- diazol ile reaksiyona sokulmasıyla da üretilebilir. Lizin mimetikleri lisinilin, örneğin süksinik veya diğer karboksilik asit anhidritleri ile reaksiyona sokulmasıyla üretilebilir (ve amino terminal kalıntıları değiştirilebilir). Lizin ve diğer alfa- amino içeren kalıntı mimetikleri metil pikolinimidat, piridoksal fosfat, piridoksal, kloroborohidrit, trinitro- 25 benzensülfonik asit, O- metilizoüre, 2,4, pentandion gibi imidoesterlerle reaksiyona sokularak ve glioksilat ile transamidaz katalizli reaksiyonlar ile üretilebilir. Metiyonin mimetikleri, ör. metiyonin sülfoksit ile reaksiyonu yoluyla üretilebilir. Prolin mimetikleri, örneğin pipekolik asit, tiyazolidin karboksilik asit, 3- veya 4- hidroksi prolin, dehidroprolin, 3- veya 4- metilprolin veya 3,3- dimetilprolini içerir. Histidin kalıntısı 30 mimetikleri, histidilin ör. dietilprokarbonat veya para- bromofenasil bromür ile reaksiyona sokulmasıyla üretilebilir. Diğer mimetikler, örneğin prolin ve lisinin hidroksilasyonu, seril veya treonil kalıntılarının hidroksil gruplarının fosforilasyonu; lizin, arginin ve histidin alfa- amino gruplarının metilasyonu; N- uçlu aminin

asetilasyonu; ana zincir amid kalıntılarının metilasyonu veya N- metil amino asitlerle süstitasyonu veya C- uçlu karboksil gruplarının amidasyonu ile üretilenleri içerir.

Buluşa ait bir polipeptitin bir kalıntısı, örneğin bir amino asidi aynı zamanda zıt kiralitede bir amino asit (veya peptitomimetik kalıntısı) ile de değiştirilebilir. Bu nedenle doğal olarak L- konfigürasyonunda meydana gelen (kimyasal varlığın yapısına bağlı olarak R veya S olarak da adlandırılabilir) herhangi bir amino asit, aynı kimyasal yapısal tipte, fakat zıt kiraliteye sahip, D- amino asit olarak adlandırılan ancak aynı zamanda R- veya S- formu olarak da adlandırılabilen bir amino asitle veya bir peptitomimetik ile değiştirilebilir.

10 Buluşun polipeptitlerini modifiye etmeye yönelik yöntemler ya translasyon sonrası işlem (örneğin fosforilasyon, açilasyon, vb.) gibi doğal işlemlerle ya da kimyasal modifikasyon teknikleri ile gerçekleştirilebilir. Modifikasyonlar peptit omurgası, amino asit yan zincirleri ve amino veya karboksil uçları dahil olmak üzere polipeptitin herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Aynı tip modifikasyonun belirli bir polipeptitteki çeşitli

15 bölgelerde aynı veya değişken derecelerde mevcut olabileceği takdir edilecektir. Ayrıca belirli bir polipeptitin birçok tipte modifikasyonu olabilir. Modifikasyonlar asetilasyon, açilasyon, ADP- ribozilasyon, amidasyon, flavin kovalent bağı, bir heme grubunun kovalent bağı, bir nükleotit veya nükleotit türevinin kovalent bağı, bir lipit veya lipit türevinin kovalent bağı, bir fosfatidilinositolün kovalent bağı, çapraz

20 siklizasyon, disülfid bağ oluşumu, demetilasyon, kovalent çapraz bağların oluşumu, sistein oluşumu, piroglutamat oluşumu, formilasyon, gama- karboksilasyon, glikozilasyon, GPI ankor oluşumu, hidroksilasyon, iyodinasyon, metilasyon, miristolyasyon, oksidasyon, pegilasyon, proteolitik işlem, fosforilasyon, prenilleme, rasemizasyon, selenoilyasyon, sülfasyon ve arginilyasyon gibi proteine amino asitlerin

25 transfer- RNA aracılı eklenmesini içerir. Bakınız, örneğin Creighton, T. E. , Proteins - Structure and Molecular Properties 2. baskı, W. H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed. , Academic Press, New York, sayfa 1- 12 (1983).

Katı- fazlı kimyasal peptit sentezi yöntemleri buluşun polipeptitlerini sentezlemek için de kullanılabilir. Bu yöntem 1960'ların başından beri bilinmektedir (Merrifield, RB, J. Am. Chem. Soc. , 85: 2149- 2154, 1963) (ayrıca bakınız Stewart, JM ve Young, J. D. , Solid Phase peptide Synthesis, 2nd Ed. , Pierce Chemical Co. , Rockford, Ill. , sayfa 11- 12)) ve son zamanlarda ticari olarak temin edilebilen laboratuvar peptit tasarım ve

sentez kitlerinde (Cambridge Research Biochemicals) kullanılmıştır. Bu tür ticari olarak temin edilebilen laboratuvar kitleri genellikle HM Geysen ve arkadaşları, Proc. Natl. Acad. Sci. , ABD, 81: 3998 (1984) öğretilerini kullanırlar ve hepsi tek bir plakaya bağlı olan çok sayıda "çubuk" veya "iğne"nin uçları üzerinde peptitlerin sentezlenmesini sağlarlar. Böyle bir sistem kullanıldığında, bir çubuk veya iğne plakası ters çevrilmekte ve uygun bir amino asidin iğnenin veya çubuğun uçlarına tutturulması veya bağlanması için çözeltiler içeren, karşılık gelen kuyu veya rezervuarların ikinci bir plakasına sokulmaktadır. Böyle bir işlem adımının tekrarlanmasıyla, yani çubukların ve iğnelerin uçlarının uygun çözeltilere çevrilmesi ve sokulmasıyla amino asitler istenen peptitlere dönüştürülür. Ek olarak birtakım kullanılabilir FMOC peptit sentezi sistemleri mevcuttur. Örneğin bir polipeptit veya fragmanın birleştirilmesi, bir Applied Biosystems, Inc. Model 431A TM otomatik peptit sentezleyicisi kullanılarak katı bir destek üzerinde gerçekleştirilebilir. Bu tür ekipmanlar ya doğrudan sentez yoluyla ya da bilinen diğer teknikler kullanılarak birleştirilebilen bir dizi fragmanın sentezi yoluyla buluşun peptitlerine kolay erişim sağlar.

Buluş sinyal içeren ve içermeyen buluşun ksilanazlarını içerir. Buluşun bir sinyal sekansını içeren polipeptit, buluşun bir ksilanazı veya başka bir ksilanaz veya başka bir enzim veya başka bir polipeptit olabilir.

Buluşun polipeptitleri çeşitli koşullar altında, örneğin pH ve / veya sıcaklıktaki aşırılıklara, oksitleyici ajanlara ve benzerleri altında bir ksilanaz aktivitesine sahip olabilir. Burada, örneğin sıcaklık, oksitleyici ajanlar ve değişen yıkama koşulları gibi farklı katalitik verim ve stabilitelere sahip alternatif ksilanaz preparatlarına yol açan yöntemler açıklanmaktadır. Ksilanaz varyantları alana- yönelik mutagenез ve / veya rasgele mutagenез teknikleri kullanılarak üretilebilir. Yönlendirilmiş evrim alternatif özgünlükler ve stabilite ile çok çeşitli ksilanaz varyantları üretmek için kullanılabilir.

Buluşun ait proteinler, ksilanaz modülatörlerini, örneğin aktivatörleri veya ksilanaz aktivitesinin inhibitörlerini tanımlamak için araştırma reaktifleri olarak da yararlıdır. Kısaca test numuneleri (bileşikler, sıvı besiyerler, özütler ve benzerleri), substrat bölünmesini engelleme yeteneklerini belirlemek için ksilanaz analizlerine eklenir. Bu şekilde tanımlanan inhibitörler, istenmeyen proteolizi azaltmak veya önlemek için endüstride ve araştırmada kullanılabilir. Ksilanazlarda olduğu gibi inhibitörler aktivite spektrumunu artırmak için birleştirilebilir.

Buluşun enzimleri, proteinleri sindirmek için veya protein sekanslamasında araştırma reaktifleri olarak da yararlıdır. Örneğin ksilanazlar, örneğin bir otomatik sekanslayıcı kullanılarak sekanslama için polipeptitleri daha küçük parçalara ayırmak üzere kullanılabilir.

- 5 Yeni ksilanları keşfetme yöntemleri, buluşun nükleik asitlerini ve polipeptitlerini kullanır. Fajmid kütüphaneleri ksilanazların ekspresyona dayalı keşfi için taranır. Lambda faj kütüphaneleri ksilanazların ekspresyona dayalı keşfi için taranır. Faj veya fajmid kütüphanelerinin taranması toksik klonların saptanmasına, substrata daha iyi erişime, kütüphanenin kitlesel eksizyonundan kaynaklanan herhangi bir yanlılığın potansiyelini baypas ederek bir konak tasarlama ihtiyacını azaltmaya ve düşük klon yoğunluklarında 10 daha hızlı büyümeye izin verebilir. Faj veya fajmid kütüphanelerinin taranması sıvı fazda veya katı fazda olabilir. Bu, analiz koşullarında daha büyük bir esneklik, ek substrat esnekliği, zayıf klonlar için daha yüksek hassasiyet ve katı faz taraması üzerinde otomasyon kolaylığı sağlar.
- 15 Tarama yöntemleri buluşun proteinlerini ve nükleik asitlerini ve robotik otomasyonu kullanarak binlerce biyokatalitik reaksiyonun ve tarama analizlerinin kısa bir sürede, örneğin günlük olarak gerçekleştirilmesini ve yüksek düzeyde doğruluk ve tekrarlanabilirliğin garanti edilmesini sağlar (aşağıdaki dizilerin tartışmasına bakınız). Sonuç olarak bir türev bileşikler kütüphanesi birkaç hafta içinde üretilebilir. Küçük 20 moleküller dahil olmak üzere moleküllerin modifikasyonu hakkında daha fazla bilgi için PCT / US94 / 09174'e bakınız .

Bir izole edilmiş veya saflaştırılmış bir polipeptit, buluşun bir dizisini ve bunlara büyük ölçüde özdeş olan dizileri veya bunların en az yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asitlerini içeren fragmanları içerebilir. Yukarıda 25 tartışıldığı gibi bu tür polipeptitler, polipeptiti kodlayan bir nükleik asidin bir vektöre kodlanmasıyla böylece kodlama sekansının kodlanmış polipeptitin ekspresyonunu uygun bir konak hücrede tahrik edebilen bir sekansa işlevsel olarak bağlanmasıyla elde edilebilir. Örneğin ekspresyon vektörü translasyon başlatma ve bir transkripsiyon sonlandırıcısı için bir promotör, bir ribozom bağlanma alanı içermektedir. Aynı 30 zamanda vektör, ekspresyonu amplifiye etmeye yönelik uygun sekansları da içerebilir. Homolog polipeptitler veya fragmanlar biyokimyasal zenginleştirme veya saflaştırma prosedürleri ile elde edilebilir. Potansiyel olarak homolog polipeptitlerin veya

fragmanların dizisi ksilan hidrolaz sindirimi, jel elektroforezi ve / veya mikrosekanslama ile belirlenebilir. Prospektif homolog polipeptit veya fragmanının sekansı, yukarıda tarif edilen programlardan herhangi biri kullanılarak buluşun polipeptitlerinden biri ile veya bunların en az yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asidini içeren bir fragman ile karşılaştırılabilir.

Varyantların fragmanlarının buluşun polipeptitlerinin enzimatik aktivitesini muhafaza edip etmediğini belirlemek için analiz aşağıdaki adımları içerir: polipeptit fragmanının veya varyantının çalışmasına izin veren koşullar altında bir substrat molekülü ile polipeptit fragmanının veya varyantının temas ettirilmesi ve ya substrat seviyesinde bir azalma ya da polipeptit ve substrat arasındaki reaksiyonun spesifik reaksiyon ürünü seviyesinde bir artışın belirlenmesi.

Hak talebinde bulunulan buluşa göre olan polipeptitler veya bunların en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asidini içeren fragmanlar (hak talep edilmemiştir) çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Örneğin polipeptitler veya bunların fragmanları biyokimyasal reaksiyonları katalize etmek için kullanılabilir. Bir işlem, buluşun polipeptitlerini veya glikozidik bağları hidrolize etmek için bu gibi polipeptitleri kodlayan polinükleotitleri kullanır. Bu prosedürlerde bir glikosidik bağlantı (ör . bir nişasta) içeren bir madde buluşun polipeptitlerinden biri ile veya glikozidik bağlantının hidrolizini kolaylaştıran koşullar altında büyük ölçüde özdeş sekanslarla temas ettirilir.

Mevcut buluş enzimlerin eşsiz katalitik özelliklerini kullanır. Kimyasal dönüşümlerde biyokatalizörlerin (yani saflaştırılmış veya ham enzimler, yaşamayan veya yaşayan hücreler) kullanımını normal olarak spesifik bir başlangıç bileşiği ile reaksiyona giren belirli bir biyokatalizörün tanımlanmasını gerektirirken, mevcut buluş küçük moleküller gibi birçok başlangıç bileşiğinde bulunan fonksiyonel gruplar için spesifik olan, seçilen biyokatalizörleri ve reaksiyon koşullarını kullanır. Her bir biyokatalizör bir fonksiyonel gruba veya birkaç ilgili fonksiyonel gruba özgüdür ve bu fonksiyonel grubu içeren birçok başlangıç bileşiği ile reaksiyona girebilir.

Biyokatalitik reaksiyonlar tek bir başlangıç bileşiğinden bir türevler popülasyonu üretir. Bu türevler ikinci bir türev bileşikleri popülasyonu üretmek için başka bir tur biyokatalitik reaksiyona tabi tutulabilir. Orijinal küçük molekülün veya bileşiğin binlerce varyasyonu her bir biyokatalitik türevlendirme yinelemesi ile üretilebilir.

Enzimler molekülün geri kalanını etkilemeden bir başlangıç bileşiğinin belirli bölgelerinde reaksiyona girer, bu da geleneksel kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilmesi çok zor olan bir işlemdir. Bu yüksek derecede biyokatalitik özgülük, kütüphane içindeki tek bir aktif bileşiğin tanımlanması için araçlar sağlar. Kütüphane, "biyosentetik tarih" olarak adlandırılan, onu üretmek için kullanılan biyokatalitik reaksiyonlar dizisi ile karakterizedir. Biyolojik aktiviteler için kütüphanenin taranması ve biyosentetik öykünün izlenmesi aktif bileşiği üreten spesifik reaksiyon dizisini tanımlar. Reaksiyon dizisi tekrarlanır ve sentezlenen bileşiğin yapısı belirlenir. Bu tanımlama biçimi, diğer sentez ve tarama yaklaşımlarından farklı olarak immobilizasyon teknolojilerini gerektirmez ve bileşikler hemen hemen her tür tarama analizi kullanılarak çözelti içinde serbestçe sentezlenebilir ve test edilebilir. Fonksiyonel gruplar üzerindeki enzim reaksiyonlarının yüksek derecedeki özgüllüğünün, biyokatalitik olarak üretilen kütüphaneyi oluşturan spesifik enzimatik reaksiyonların "izlenmesini" mümkün kıldığını belirtmek önemlidir.

Prosedürel adımların birçoğu binlerce biyokatalitik reaksiyonun ve tarama analizlerinin günde bir kez gerçekleştirilmesini sağlamanın yanı sıra yüksek bir doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlayarak robotik otomasyon kullanılarak gerçekleştirilir. Sonuç olarak mevcut kimyasal yöntemler kullanılarak üretilmesi yıllar sürececek bir türev bileşikler kütüphanesi bir hafta içinde üretilebilir.

Küçük molekülleri modifiye etmek için bir usul, burada tarif edilen bir polinükleotit tarafından kodlanan bir polipeptitin veya bunun enzimatik olarak aktif fragmanlarının, modifiye edilmiş küçük bir molekül üretmek için küçük bir molekül ile temas ettirilmesini içerir. Modifiye edilmiş küçük moleküllerden oluşan bir kütüphane, istenen aktiviteyi sergileyen kütüphanede modifiye edilmiş küçük bir molekülün mevcut olup olmadığını belirlemek için test edilir. Arzu edilen aktiviteye sahip modifiye edilmiş küçük molekülü üreten spesifik bir biyokatalitik reaksiyon, kütüphanenin bir bölümünü üretmek için kullanılan her bir biyokatalitik reaksiyonun sistematik olarak ortadan kaldırılmasıyla ve daha sonra kütüphanenin bir kısmında bulunan istenen aktiviteye sahip değiştirilmiş küçük moleküllerin varlığının veya yokluğunun test edilmesiyle tanımlanır. İstenen aktiviteye sahip modifiye edilmiş küçük molekülü üreten spesifik biyokatalitik reaksiyonlar bir yönüyle (isteğe bağlı olarak) tekrarlanır. Biyokatalitik reaksiyonlar küçük bir molekülün yapısı içinde bulunan ayrı yapısal kısımlarla reaksiyona giren bir grup biyokatalizör ile gerçekleştirilir, her bir biyokatalizör bir yapısal parçaya veya ilgili

yapısal gruplara özgüdür ve her bir biyokatalizör farklı yapısal parçayı içeren birçok farklı küçük molekül ile reaksiyona girer.

Ksilanaz sinyal sekansları, prepro ve katalitik alanlar

- 5 Ksilanaz sinyal sekansları (ör. sinyal peptitleri (SP'ler)), prepro alanları ve katalitik alanlar (CD'ler) izole, sentetik veya rekombinant peptitler olabilir veya bir füzyon proteininin bir parçası, ör. bir kimerik protein içindeki bir heterolog alan olabilir. Tarifname bu katalitik alanları (CD'ler), prepro alanlarını ve sinyal dizilerini (SP'ler, ör. buluşun bir polipeptidinin amino ucu kalıntılarında sahip / içeren bir sekansa sahip olan bir peptit) kodlayan nükleik asitler sağlar. Bir sinyal sekansı buluşun bir polipeptidinin 10 1 ila 12, 1 ila 13, 1 ila 14, 1 ila 15, 1 ila 16, 1 ila 17, 1 ila 18, 1 ila 19, 1 ila 20, 1 ila 21, 1 ila 22, 1 ila 23, 1 ila 24, 1 ila 25, 1 ila 26, 1 ila 27, 1 ila 28, 1 ila 28, 1 ila 30, 1 ila 31, 1 ila 32 1 ila 33, 1 ila 34, 1 ila 35, 1 ila 36, 1 ila 37, 1 ila 38, 1 ila 39, 1 ila 40, 1 ila 41, 1 ila 42, 1 ila 43, 1 ila 44, 1 ila 45, 1 ila 46, 1 ila 47, 1 ila 48, 1 ila 49 veya 1 ila 50 kalıntılarında belirtilen bir sekanstan meydana gelen / içeren bir peptiti içerir.
- 15 Bir sinyal sekansı aşağıdaki Tablo 4'te belirtilen bir sekanstan meydana gelen / içeren bir peptiti içerir. Örneğin Tablo 4'ün okunmasında SEK ID NO: 102'nin 1 ila 23 kalıntılarında meydana gelen / içeren bir sinyal dizisi (ör. SEK ID NO: 101 tarafından kodlanan), SEK ID NO: 104'ün 1 ila 41 kalıntılarında meydana gelen / içeren bir sinyal dizisi (ör. SEK ID NO: 103 tarafından kodlanan) sağlanmıştır.

20 Tablo 4:

| SEK ID NO: | Sinyal sekansı (amino asit pozisyonları) |
|------------|--|
| 101,102 | 1- 23 |
| 103, 104 | 1- 41 |
| 105, 106 | 1- 22 |
| 109, 110 | 1- 26 |
| 11, 12 | 1- 28 |
| 113, 114 | 1- 28 |

| | |
|----------|-------|
| 119, 120 | 1- 33 |
| 121, 122 | 1- 20 |
| 123, 124 | 1- 20 |
| 131, 132 | 1- 26 |
| 135, 136 | 1- 25 |
| 139, 140 | 1- 24 |
| 141, 142 | 1- 25 |
| 143, 144 | 1- 32 |
| 147, 148 | 1- 28 |
| 149, 150 | 1- 18 |
| 15, 16 | 1- 20 |
| 151, 152 | 1- 21 |
| 153, 154 | 1- 16 |
| 155, 156 | 1- 21 |
| 157, 158 | 1- 29 |
| 159, 160 | 1- 23 |
| 161, 162 | 1- 32 |
| 163, 164 | 1- 26 |
| 165, 166 | 1- 23 |
| 167, 168 | 1- 36 |
| 169, 170 | 1- 24 |

| | |
|----------|-------|
| 17, 18 | 1- 31 |
| 171, 172 | 1- 29 |
| 173, 174 | 1- 22 |
| 175, 176 | 1- 27 |
| 177, 178 | 1- 26 |
| 179, 180 | 1- 19 |
| 181, 182 | 1- 25 |
| 183, 184 | 1- 32 |
| 185, 186 | 1- 27 |
| 187, 188 | 1- 28 |
| 19, 20 | 1- 29 |
| 191, 192 | 1- 27 |
| 193, 194 | 1- 21 |
| 195, 196 | 1- 23 |
| 197, 198 | 1- 28 |
| 199, 200 | 1- 30 |
| 203, 204 | 1- 30 |
| 205, 206 | 1- 29 |
| 207, 208 | 1- 27 |
| 209, 210 | 1- 25 |
| 21, 22 | 1- 28 |

| | |
|----------|-------|
| 211, 212 | 1- 29 |
| 215, 216 | 1- 31 |
| 217, 218 | 1- 29 |
| 219, 220 | 1- 23 |
| 221, 222 | 1- 24 |
| 223, 224 | 1- 28 |
| 225, 226 | 1- 25 |
| 227, 228 | 1- 39 |
| 229, 230 | 1- 28 |
| 23, 24 | 1- 29 |
| 231, 232 | 1- 41 |
| 233, 234 | 1- 26 |
| 235, 236 | 1- 28 |
| 237, 238 | 1- 32 |
| 239, 240 | 1- 30 |
| 241, 242 | 1- 28 |
| 243, 244 | 1- 33 |
| 245, 246 | 1- 32 |
| 249, 250 | 1- 33 |
| 253, 254 | 1- 24 |
| 255, 256 | 1- 51 |

| | |
|----------|-------|
| 259, 260 | 1- 24 |
| 261, 262 | 1- 26 |
| 263, 264 | 1- 29 |
| 267, 268 | 1- 30 |
| 27, 28 | 1- 27 |
| 271, 272 | 1- 22 |
| 273, 274 | 1- 74 |
| 277, 278 | 1- 19 |
| 279, 280 | 1- 22 |
| 283, 284 | 1- 28 |
| 287, 288 | 1- 23 |
| 289, 290 | 1- 22 |
| 295, 296 | 1- 26 |
| 299, 300 | 1- 24 |
| 301, 302 | 1- 28 |
| 303, 304 | 1- 74 |
| 305, 306 | 1- 32 |
| 309, 310 | 1- 20 |
| 311, 312 | 1- 33 |
| 313, 314 | 1- 22 |
| 315, 316 | 1- 28 |

| | |
|----------|-------|
| 319, 320 | 1- 27 |
| 325, 326 | 1- 27 |
| 327, 328 | 1- 29 |
| 329, 330 | 1- 35 |
| 33, 34 | 1- 23 |
| 331, 332 | 1- 28 |
| 333, 334 | 1- 30 |
| 335, 336 | 1- 50 |
| 339, 340 | 1- 23 |
| 341, 342 | 1- 45 |
| 347, 348 | 1- 20 |
| 349, 350 | 1- 20 |
| 351, 352 | 1- 73 |
| 353, 354 | 1- 18 |
| 355, 356 | 1- 21 |
| 357, 358 | 1- 25 |
| 359, 360 | 1- 31 |
| 361, 362 | 1- 26 |
| 365, 366 | 1- 65 |
| 367, 368 | 1- 23 |
| 369, 370 | 1- 27 |

| | |
|--------|-------|
| 39, 40 | 1- 24 |
| 41, 42 | 1- 37 |
| 45, 46 | 1- 25 |
| 47, 48 | 1- 26 |
| 5, 6 | 1- 47 |
| 51, 52 | 1- 30 |
| 53, 54 | 1- 37 |
| 55, 56 | 1- 24 |
| 57, 58 | 1- 22 |
| 59, 60 | 1- 21 |
| 63, 64 | 1- 20 |
| 65, 66 | 1- 22 |
| 67, 68 | 1- 28 |
| 69, 70 | 1- 25 |
| 7, 8 | 1- 57 |
| 73, 74 | 1- 21 |
| 75, 76 | 1- 22 |
| 77, 78 | 1- 27 |
| 79, 80 | 1- 36 |
| 83, 84 | 1- 30 |
| 87, 88 | 1- 29 |

| | |
|---------|-------|
| 89, 90 | 1- 40 |
| 9, 10 | 1- 36 |
| 95, 96 | 1- 24 |
| 99, 100 | 1- 33 |

| SEK ID NO: | Sinyal sekansı (amino asit pozisyonları) | Sinyal Sekansı | KAYNAK |
|------------|--|--|----------|
| 385, 386 | 1- 25 | ADLRRRRLQLQAATLPLLGWCSAQA | Çevresel |
| 387, 388 | 1- 28 | MLKVLKRPVLSGLSLALLLPVGITSVGA | Çevresel |
| 389, 390 | 1- 25 | MSVKPFWRQWILCFMVMFFSAQAAA | Çevresel |
| 391, 392 | 1- 22 | MMKGFRCVMAMVVMAATNVRA | Çevresel |
| 393, 394 | 1- 36 | MVMEGKGLLMRRRSVSLGLAGLLAVP L TVLPQAQA | Bakteri |
| 395, 396 | 1- 30 | MKVFRNSIIRKSVVLFCAVLWILPAGLSL A | Çevresel |
| 397, 398 | | | Çevresel |
| 399, 400 | 1- 28 | MTSGRNTCVCLLLIVLAIGLLSKPPASA | Çevresel |

| | | | |
|-------------|-------|---|----------|
| 401, 402 | 1- 26 | MLKVLRKPIISGLALALLLPAGAAGA | Çevresel |
| 403, 404 | 1- 34 | MSQLDLNLKLFRRVFFALVLTSHIASVLS ASVAS | Çevresel |
| 405, 406 | | | Çevresel |
| 407, 408 | 1- 26 | MAFSKDKASFTRRSIAAAGLAAGVSA | Çevresel |
| 409, 410 | 1- 19 | MKVTAAFAGLLATVLAAPA | Çevresel |
| 411, 412 | 1- 19 | MVAFTSLLAGFAAIAGVLS | Çevresel |
| 413, 414 | 1- 34 | MKKRQGFIIKKG LVLGVSLLLLALIMMSATSQTSA | Çevresel |
| 415, 416 | 1- 22 | MKGFRWCVLAVLMLAATNLRAA | Çevresel |
| 417, 418 | 1- 21 | MNVLRSGLVTMLLLAAFSVQA | Çevresel |
| 419, 420 | 1- 19 | MLVRLLIAMTVLFSAFAHA | Çevresel |
| 421, 422 | 1- 16 | MKANIIFCLLAPLVAA | Çevresel |
| 423, 424 | 1- 35 | MPTGLRAKPCLTRWLAASACALAPLLL GAPASALA | Çevresel |

| | | | |
|-------------|-------|---|--|
| 425, 426 | 1- 23 | MLQTIALIFLALVILIALISFR | Çevresel |
| 427, 428 | | | Çevresel |
| 429, 430 | 1- 21 | MNVLRSGIVTMLLLAAFSVQA | Çevresel |
| 431, 432 | 1- 19 | MVQIKAAALAVLFASNVLS | Çevresel |
| 433, 434 | 1- 39 | MNTLLPRRRLWSSTAILRTLAAGALAAG MVLAPVSAANA | Çevresel |
| 435, 436 | | | Cochliobolus heterostrophusA TCC 48331 |
| 437, 438 | 1- 23 | MRKPACATLAVMMSLLFTPFSQA | Çevresel |
| 439, 440 | | | Çevresel |
| 441, 442 | | | Çevresel |
| 443, 444 | | | Çevresel |
| 445, 446 | 1- 21 | MKNIILNLSPVVFALLILTAA | Çevresel |
| 447, 448 | 1- 22 | MNALRTGAILVLMMLAAAQVSAA | Çevresel |

| | | | |
|-------------|-------|------------------------|--|
| 449, 450 | 1- 22 | MMKAFRWCVIALMLAAAPLRAA | Çevresel |
| 451, 452 | | | Çevresel |
| 453, 454 | | | Cochliobolus heterostrophus ATCC 48332 |
| 455, 456 | | | Bakteri |
| 457, 458 | | | Çevresel |
| 459, 460 | | | Cochliobolus heterostrophus ATCC 48333 |
| 461, 462 | 1- 22 | MWQRSKTLVVLGLLLLSHQAF | Çevresel |
| 463, 464 | | | Çevresel |
| 465, 466 | | | Çevresel |
| 467, 468 | 1- 16 | MKFFTVLLFFLSFVFS | Bakteri |
| 469, 470 | | | Çevresel |
| 471, 472 | 1- 21 | MRIHWLGLSSRASLMTAALLA | Çevresel |

| | | | |
|-------------|-------|-----------------------------------|----------|
| 473, 474 | | | Çevresel |
| 475, 476 | 1- 28 | MKTHSFNLRSRITLLTAALLFIGATAGA | Çevresel |
| 477, 478 | 1- 29 | MKRFLSWSLTGILVASALVALALPGSSQ A | Çevresel |
| 479, 480 | 1- 16 | MKVFATLAGLLATALA | Çevresel |

| SEK ID NO: | Sinyal sekansı (amino asit pozisyonları) | Sinyal Sekansı |
|-----------------------|---|---|
| 483, 484 | 1- 33 | MKKRLLALIVTLVFIISLFNPIFTTPLTNVAKA |
| 485, 486 | | |
| 487, 488 | 1- 23 | MQTVLLTVSLVFLASCMMATTNS |
| 489, 490 | 1- 18 | MKPILRSSLSCLGILVLA |
| 491, 492 | 1- 65 | MNNYRAFVLGLCWLGGLMLTGCGADQGSPDPGTSSAT SSTSSSSEGFSSAVSESSASAISSSASS |
| 493, 494 | 1- 23 | MHVLAKICLVVLIALSTCASTMA |

| | | |
|-------------|-------|---------------------------------------|
| 495, 496 | 1- 23 | MRTRVLTLLGGFLGSTIAASVTV |
| 497, 498 | | |
| 499, 500 | 1- 26 | MITFRNTLFTVVILAIVGSGLPACEA |
| 501, 502 | 1- 24 | MKYSHVVTLSLALVLCIAGLGVSA |
| 503, 504 | 1- 37 | MNTTQTTSKKSSRKRFAYTAFVVLISALTIFVSTALA |
| 505, 506 | 1- 28 | MRLKPTLKWAVSLLVTTAAMTFTSAVNA |
| 507, 508 | 1- 29 | MLTAKRSRPVWWSLLVTASALLLSAAAHS |
| 509, 510 | | |
| 511, 512 | 1- 27 | MKFSHIRSLSLALVLCFTGFGVSTVHA |
| 513, 514 | 1- 27 | MRSKRMMFFFIMLVSFALALPAVNVSA |
| 515, 516 | 1- 28 | MLHILRKPIIAG LALSLVFSGGMGSVSA |
| 517, 518 | 1- 31 | MSFFKTITRNSKTCAATLALAATVSAVSANA |

| | | |
|-------------|-------|-----------------------------------|
| 519, 520 | 1- 33 | MSFASVKNITIAGKGLVALFTFALLSGISSVNA |
| 521, 522 | 1- 28 | MSFSRRRFILSATAMLAATQLKSRALAA |
| 523, 524 | 1- 29 | MNLKNKLTCLKSSIAAAACVAAMSFSTANA |
| 525, 526 | 1- 28 | MNNSKDFFYKARGFLSALLLVPIAAHA |
| 527, 528 | 1- 30 | MTAISRRKFLSSAGALALAQMKVSAIACA |
| 529, 530 | 1- 34 | MKHNVFSTRALRRVLPGLLIAGLIGATATGLQA |
| 531, 532 | 1- 29 | MKLTNKITLKGSLAAAACVAAMGFSTANA |
| 533, 534 | | |
| 535, 536 | | |
| 537, 538 | 1- 29 | MPSRRQFLLGSAQVTGLMMLAKHQAIASA |
| 539, 540 | 1- 28 | MKTLLKITLSTLFAFIVLMGCDMGLRDA |
| 541, 542 | 1- 27 | MKRKSVKLFLAILFCILLILPAGMVSA |

| | | |
|-------------|-------|--|
| 543, 544 | | |
| 545, 546 | 1- 24 | MNKTFRLPIILMGILLTFSSARCS |
| 547, 548 | 1- 20 | MTRLSRRNFLVGSAAVAAMA |
| 549, 550 | | |
| 551, 552 | | |
| 553, 554 | 1- 35 | MTGISTGRGKNPGRIYTTLSTALVFVVMGALESWA |
| 555, 556 | 1- 27 | MKFSHIRSLSLALVLCFTGFGVSTVHA |
| 557, 558 | 1- 27 | MSSLIAGTIACCMMLLILAPSQVHA |
| 559, 560 | | |
| 561, 562 | 1- 35 | MSLSKHKSLLLAVSRYTCAALLAGSLVACGGNTTT |
| 563, 564 | 1- 20 | MQSLFLFLVFFFTQTQVFG |
| 565, 566 | 1- 60 | MNSYRALMLGLLGGLILTGCGAGQDSPTPGSSSAISSSS ESFSSVTSESSSSAISSTASS |

| | | |
|-------------|-------|-------------------------------|
| 567, 568 | 1- 28 | MTFSRRNFIWGTAAVLAATQLKARALAA |
| 569, 570 | | |
| 571, 572 | 1- 25 | MNNSIKIVLGLIVLVFLLPACSGNS |
| 573, 574 | | |
| 575, 576 | | |
| 577, 578 | 1- 29 | MFMLSKKILMVLLTISMSFISLFTVTAYA |
| 579, 580 | | |
| 581, 582 | 1- 23 | MSIRNFFTATVILVALGASLTWG |
| 583, 584 | 1- 27 | MVKLKLKLNLLLVISILTLIGNNVFS |
| 585, 586 | | |
| 587, 588 | | |
| 589, 590 | 1- 29 | MKKRITSIAIVFALVFGFVLCSSNKQG |

| | | |
|-------------|-------|--|
| 591, 592 | 1- 39 | MLKQIGDQTVNLPLNKLTALKSSLTAAACVAAMSFSTANA |
| 593, 594 | 1- 29 | MNLLSTLPIKRSLTAAACIAAMGFSAANA |
| 595, 596 | 1- 31 | MVRSDTRRTRRFALLAVGAMLAGLAALPAAA |
| 597, 598 | 1- 31 | MVRSDTTRTRRFALLVVSAMVAGMAVLPAAA |
| 599, 600 | 1- 29 | MGRQLKKIISMVLAFALLIPMMPITAAAA |
| 601, 602 | 1- 23 | MENKKFVRAIFLITTACCLSANA |
| 603, 604 | 1- 30 | MKKILKKLKETSVLHFVVIASIFLSSCGNA |
| 605, 606 | 1- 30 | MTFSRRQFLLQTSAGLALLSTAKMRAFARA |
| 607, 608 | 1- 33 | MSFASVKNITTAGKGLVALFTFALLFGTSSVNA |
| 609, 610 | 1- 31 | MTISRRKFMWGTAALLAATQLKTRALAAAMA |
| 611, 612 | | |
| 613, 614 | 1- 30 | MTFSRRQFLLQTSAGLALLSTAKMRAFARA |

| | | |
|-------------|-------|---|
| 615, 616 | 1- 27 | MIKRAIFLMTAVLLFSLAFLPPAGA |
| 617, 618 | 1- 20 | MRTFILIPMLLVLSACTNG |
| 619, 620 | | |
| 621, 622 | 1- 22 | MLRRFTGGALIMVLCASAAKG |
| 623, 624 | 1- 41 | MHIVKSSAYLLLASVSLALSACSSSSSSGSETSSSSASSS S |
| 625, 626 | 1- 30 | MNPLINRLALKSSLAAATCVAAMSFSTANA |
| 627, 628 | 1- 24 | MWKKFKVSLAYVLISVLLVSQGWA |
| 629, 630 | 1- 27 | MHSRRKFLRSAQATGLMLFAKQQAFA |
| 631, 632 | 1- 26 | MNLSRRKFLGSAAGLAALTNLKACA |
| 633, 634 | 1- 20 | MRKLLIIVLILALLPVIS |
| 635, 636 | 1- 30 | MNPLINRLALKSSLAAATCVAAMSFSTANA |

Ksılanaz sinyal sekansları (SP'ler) ve / veya prepro sekansları, izole edilmiş peptitler veya başka bir ksılanaza veya bir ksılanaz olmayan polipeptite, ör. Bir füzyon (kimerik) protein olarak eklenmiş sekanslar olabilir. polipeptitler bu gibi ksılanaz sinyal sekanslarını SP'leri içerebilir ve / veya prepro açıklanan bir ksılanaza heterolog sekanslar içerebilir (örneğin bir SP ve / veya prepro ve başka bir ksılanaz veya bir

ksilanaz olmayan proteinden sekanslar içeren bir füzyon proteini). Ksilanazlar, heterolog SP'ler ve / veya prepro dizileri, örneğin bir maya sinyal sekansına sahip sekanslar olabilir. Bir ksilanaz bir vektör içinde bir heterolog SP ve / veya prepro, örneğin bir pPIC seri vektörü (Invitrogen, Carlsbad, CA) içerebilir.

- 5 Yeni ksilanaz polipeptitlerinin tanımlanmasından sonra SP'ler ve / veya prepro dizileri tanımlanır. Proteinlerin uygun hücresele lokasyonlarına göre sekanslandığı ve taşındığı yollar genellikle protein hedefleme yolları olarak adlandırılır. Tüm bu hedefleme sistemlerinde en önemli unsurlardan biri sinyal sekansı olarak adlandırılan yeni sentezlenmiş bir polipeptitin amino ucunda kısa bir amino asit sekansıdır. Bu sinyal
- 10 sekansı bir proteini hücre içindeki uygun konumuna yönlendirir ve taşıma sırasında veya protein nihai hedefine ulaştığında çıkarılır. Çoğu lizozomal, membran veya salgılanmış proteinler kendilerini endoplazmik retikulumun lümenine translokasyon için işaretleyen bir amino- uçlu sinyal sekansına sahiptir. Bu gruptaki proteinler için 100'den fazla sinyal sekansı belirlenmiştir. Sinyal sekansları yaklaşık 11 ila 41 arasında veya
- 15 yaklaşık 13 ila 36 amino asit kalıntısı arasında değişebilir. Sinyal sekanslarının tanımlanmasına yönelik yöntemler teknikte uzman kişilerce bilinmektedir. Örneğin yeni ksilanaz sinyal peptitleri, SignalP olarak adlandırılan bir yöntemle tanımlanır. SignalP, hem sinyal peptitlerini hem de bunların bölünme yerlerini tanıyan bir kombine nöral ağ kullanır; bakınız, örneğin Nielsen (1997) "Identification of prokaryotic and eukaryotic
- 20 signal peptides and prediction of their cleavage sites. " Protein Engineering 10:1- 6.

Bazı açılardan ksilanazların SP ve / veya prepro dizileri veya "alan adları"na sahip olmayabileceği anlaşılmalıdır. Bir yönde buluş bir SP'nin ve / veya bir prepro alanının bir kısmını içeren veya hiç bir kısmını içermeyen buluşun ksilanazlarını sağlar. Bir yönde buluş farklı bir ksilanazın bir nükleik asit sekansına işlevsel olarak bağlı bir ksilanazdan

25 bir sinyal sekansını (SP) ve / veya preproyu kodlayan bir nükleik asit sekansı sağlar veya bir yönde (isteğe bağlı olarak) bir sinyal sekansı (SP'ler) ve / veya ksilanaz olmayan bir proteinden prepro alanı istenebilir.

Buluş ayrıca açıklandığı gibi heterolog sekanslar olarak sinyal dizileri (SPler), prepro alanı ve / veya katalitik alanlar (CD'ler) içeren izole edilmiş, sentetik veya rekombinant

30 polipeptitler sağlar. Heterolog sekanslar, bir SP, prepro alanı ve / veya CD ile doğal olarak ilişkili olmayan (örneğin bir ksilanaza) sekanslardır. SP, prepro alanı ve / veya CD'nin doğal olarak ilişkili olmadığı sekans SP, prepro alanı ve / veya CD'nin amino terminal ucu, karboksi terminal ucu ve / veya SP ve / veya CD'nin her iki ucunda olabilir.

Bir yönde buluş doğal olarak ilişkili olduğu (örneğin bir ksilanaz sekansı) herhangi bir sekansla ilişkili olmaması koşuluyla bir sinyal sekansı (SP), prepro alanı ve / veya katalitik alan (CD) içeren bir polipeptiti içeren (veya bundan meydana gelen) izole edilmiş, sentetik veya rekombinant bir polipeptit sağlar. Benzer şekilde bir yönüyle buluş bu polipeptitleri kodlayan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asitler sağlar. Dolayısıyla bir yönüyle buluşun izole edilmiş, sentetik veya rekombinant nükleik asidi bir sinyal sekansı (SP), prepro alanı ve / veya katalitik alan (CD) ve bir heterolog sekansın (yani bir sinyal dizisi (SP), prepro alanı ve / veya katalitik alan (CD) ile doğal olarak ilişkili olmayan bir sekansın) kodlama dizisini içerir. Heterolog sekans 3' terminal ucu, 5' terminal ucu üzerinde ve / veya SP'nin her iki ucunda, prepro alanı ve / veya CD kodlama sekansında olabilir.

Hibrit (kimerik) ksilanazlar ve peptit kütüphaneleri

Peptit kütüphaneleri dahil olmak üzere hibrit ksilanazlar ve füzyon proteinleri buluşun sekanslarını içerebilir. peptit kütüphaneleri ksilanaz substratları, reseptörleri, enzimleri gibi hedeflerin peptit modülatörlerini (ör. aktivatörleri veya inhibitörleri) izole etmek için kullanılabilir. Peptit kütüphaneleri ligandlar, örneğin sitokinler, hormonlar ve benzerleri gibi hedeflerin resmi bağlayıcı partnerlerini tanımlamak için kullanılabilir. Kimerik proteinler bir sinyal dizisi (SP), prepro alanı ve / veya katalitik alan (CD) veya bunların bir kombinasyonunu ve bir heterolog diziyi içerebilir (yukarıya bakınız).

Bir yönde füzyon proteinleri (ör. peptit grubu) hedefler için daha yüksek bir bağlanma afinitesine izin vermek üzere konformasyonel olarak (doğrusal peptitlere göre) stabilize edilmiştir. Buluşun ksilanaz füzyonları ve diğer peptitler bilinen ve rastgele peptitleri içerebilir. Bunlar ksilanazların yapısının önemli ölçüde bozulmadığı ve peptitin metabolik veya yapısal olarak konformasyonel olarak stabilize olacağı şekilde kaynaştırılabilir. Bu, hem hücre içindeki varlığı hem de miktarı açısından kolaylıkla izlenebilen bir peptit kütüphanesinin oluşturulmasına izin verir.

Buluşun ait amino asit sekansı varyantları, varyasyonun önceden belirlenmiş bir niteliği ile karakterize edilebilir; bu, onları bir ksilanaz sekansının bir allelik veya türler arası varyasyonu gibi doğal olarak oluşan bir formdan ayıran bir özelliktir. Bir yönüyle buluşun varyantları doğal olarak oluşan analog olarak aynı niteliksel biyolojik aktiviteyi sergiler. Alternatif olarak varyantlar değiştirilmiş özelliklere sahip olmak için seçilebilir. Bir yönde bir amino asit sekansı varyasyonunu sokmak için bölge veya bölge önceden

belirlenirken, mutasyonun önceden belirlenmiş olması gerekmez. Örneğin belirli bir yerdeki bir mutasyonun performansını optimize etmek için hedef kodon veya bölgede rastgele mutagenез gerçekleştirilebilir ve istenen aktivitenin optimal kombinasyonu için ksilanaz varyantları taranabilir. Bilinen bir diziye sahip DNA'da önceden belirlenmiş

5 bölgelerdeki süstitüsyon mutasyonları yapma teknikleri, örneğin M13 primer mutagenез ve PCR mutagenезi gibi burada tartışıldığı gibi iyi bilinmektedir. Mutantların taranması, örneğin ksilan hidrolizinin analizleri kullanılarak yapılabilir. Alternatif yönlerde amino asit süstitüsyonları tek kalıntı olabilir, daha büyük eklemeler yapılabilmesine rağmen, eklemeler yaklaşık 1 ila 20 amino asit arasında yapılabilir.

10 Silinmeler yaklaşık 1 ila yaklaşık 20, 30, 40, 50, 60, 70 kalıntı veya daha fazla olabilir. Optimal özellikler ile bir son türev elde etmek için süstitüsyonlar, silinmeler, eklemeler veya bunların herhangi bir kombinasyonu kullanılabilir. Genel olarak bu değişiklikler molekülün değişimini en aza indirmek için birkaç amino asit üzerinde yapılır. Bununla birlikte bazı durumlarda büyük değişiklikler tolere edilebilir.

15 Buluş, polipeptit omurgasının, ikincil veya üçüncül yapının, örneğin bir alfa- sarmal veya beta- yaprak yapısının modifiye edildiği ksilanazlar sağlar. Bir yönde yük veya hidrofobiklik modifiye edilmiştir. Bir yönde bir yan zincirin büyüklüğü modifiye edilmiştir. Fonksiyonda veya immünolojik özdeşlikte önemli değişiklikler, daha az muhafazakar olan süstitüsyonlar seçilerek yapılır. Örneğin daha belirgin olarak aşağıdakileri

20 etkileyen süstitüsyonlar yapılabilir: örneğin alfa- sarmal veya beta- yaprak yapısı gibi alterasyon alanında polipeptit omurgasının yapısı; aktif bir bölgede bulunabilen molekülün bir yükü veya hidrofobik bölgesi veya bir yan zincir. Buluş buluşun polipeptitinde (a) bir hidrofilik kalıntının, ör. seril veya treonilin bir hidrofobik kalıntının, örneğin lösil, izolösil, fenilalanil, valil veya alanin yerini aldığı (veya bununla

25 değiştirildiği); (b) bir sistein veya prolinin başka herhangi bir kalıntının yerini aldığı (veya bununla değiştirildiği); (c) bir elektropozitif yan zincire sahip bir kalıntının, örneğin lisil, arjinil veya histidilin, bir elektronegatif kalıntının, örneğin glutamil veya aspartilin yerini aldığı (veya bununla değiştirildiği); veya (d) bir hacimli yan zincire sahip bir kalıntının, örneğin fenilalaninin, bir yan zincire sahip bir diğerinin, örneğin glisinin yerini

30 aldığı (veya bununla değiştirildiği) süstitüsyonlar sağlar. Varyantlar, ihtiyaç halinde ksilanazların özelliklerini modifiye etmek için varyantların seçilebilmesine rağmen, aynı kalitatif biyolojik aktiviteyi (yani ksilanaz aktivitesi) sergileyebilirler.

Bir yönde buluşun ksilanazları epitoplari veya saflaştırma etiketlerini, sinyal sekanslarını veya diğer füzyon sekanslarını, vs. içerir. Bir yönüyle buluşun ksilanazları, bir füzyon polipeptitini oluşturmak için rastgele bir peptite kaynaştırılabilir. Burada "kaynaşmış" veya "işlevsel olarak bağlı" ifadesi ile, ksilanaz yapısının stabilitesinin bozunmasını en aza indirecek şekilde, örneğin ksilanaz aktivitesini koruyacak şekilde rastgele peptit ve ksilanazın birbirine bağlı olduğu kastedilmektedir. Füzyon polipeptiti (veya füzyon polipeptitini kodlayan füzyon polinükleotiti), çoklu ilmeklerde çoklu peptitler de dahil olmak üzere başka bileşenler de içerebilir.

Bir yönde onları kodlayan peptitler ve nükleik asitler randomize edilir, ya tamamen randomize edilir ya da randomizasyonlarında, örneğin genel olarak nükleotid / kalıntı frekansında ya da pozisyon başına yanlıdır. "Randomize" her nükleik asit ve peptitin sırasıyla rasgele nükleotitler ve amino asitlerden oluştuğunu ifade eder. Bir yönde peptitlere yol açan nükleik asitler kimyasal olarak sentezlenebilir ve bu nedenle herhangi bir pozisyonda herhangi bir nükleotit içerebilir. Dolayısıyla nükleik asitler peptitler oluşturmak için eksprese edildiğinde, herhangi bir amino asit kalıntısı herhangi bir pozisyonda dahil edilebilir. Sentetik proses, rasgele nükleik asitlerin üretilmesi için nükleik asidin uzunluğu boyunca olası kombinasyonların hepsinin veya çoğunun oluşturulmasını sağlamak ve böylece bir randomize nükleik asit kütüphanesi oluşturmak üzere tasarlanabilir. Kütüphane, arzu edilen bir yanıtı sergileyen bir veya daha fazla hücreyi temin etmek için olasılıksal olarak yeterli bir hücresel tepki aralığını etkilemek üzere yeterince yapısal olarak çeşitli randomize ekspresyon ürünleri popülasyonu sağlayabilir. Bu nedenle buluş üyelerinden en az birini bazı molekül, protein veya başka faktörler için afiniteye sahip kılacak bir yapıya sahip olacağı şekilde yeterince büyük bir etkileşim kütüphanesi sağlar.

Ksilanazlar bir yönden (isteğe bağlı olarak) bir sinyal peptiti, bir karbonhidrat bağlanma modülü, bir ksilanaz katalitik alanı, bir bağlayıcı ve / veya başka bir katalitik alandan oluşan çok alanlı enzimlerdir.

Kimerik polipeptitler biyolojik olarak aktif hibrit polipeptitleri (ör. hibrit ksilanazlar) kodlayabilir. Orijinal polinükleotidler biyolojik olarak aktif polipeptitleri kodlayabilir. Yeni hibrit polipeptitler, orijinal polinükleotidlerin sekansını entegre eden hücresel süreçler kullanılarak üretilebilir, böylece elde edilen hibrid polinükleotit, orijinal biyolojik olarak aktif polipeptitlerden türetilen aktiviteleri gösteren bir polipeptiti kodlar. Örneğin orijinal polinükleotitler farklı mikroorganizmalardan belirli bir enzimi kodlayabilir. Bir organizma

veya varyanttan bir birinci polinükleotid tarafından kodlanan bir enzim, örneğin belirli bir çevresel koşulda, örneğin yüksek tuzlulukta etkili bir şekilde işlev görebilir. Farklı bir organizma veya varyanttan ikinci bir polinükleotit tarafından kodlanan bir enzim, aşırı yüksek sıcaklıklar gibi farklı bir çevresel koşul altında etkili bir şekilde işlev görebilir.

- 5 Birinci ve ikinci orijinal polinükleotidlerden sekanslar içeren bir hibrid polinükleotid, orijinal polinükleotidler tarafından kodlanan her iki enzimin özelliklerini sergileyen bir enzimi kodlayabilir. Bu nedenle hibrid polinükleotid tarafından kodlanan enzim, birinci ve ikinci polinükleotidler, örneğin yüksek tuzluluk ve aşırı sıcaklıklar tarafından kodlanan enzimlerin her biri tarafından paylaşılan çevresel koşullar altında etkili bir şekilde işlev görebilir.

10 Glikozidaz hidrolazlar ilk olarak 1991'de ailelere sınıflandırılmıştır, bakınız örneğin Henrissat (1991) *Biochem. J.* 280:309- 316. O zamandan beri sınıflandırmalar sürekli olarak güncellenmiştir, bakınız, örneğin Henrissat (1993) *Biochem. J.* 293:781-788; Henrissat (1996) *Biochem. J.* 316:695- 696; Henrissat (2000) *Plant Physiology* 124:1515- 1519. 87 belirlenmiş glikosidaz hidrolaz ailesi vardır. İlgili ksilanazlar 8, 10, 11, 26 ve 30 numaralı ailelerde kategorize edilebilir. Ksilanaz kodlayan nükleik asitler ortak bir aileden, örneğin aşağıda Tablo 5'de gösterildiği gibi, örneğin aile 5, 6, 8, 10, 11, 26 veya 30'dan türetildiklerinden ortak bir yeniliğe sahiptir.

Tablo 5

| SEK ID | AİLE |
|----------|------|
| 9, 10 | 8 |
| 1, 2 | 8 |
| 5, 6 | 8 |
| 7, 8 | 8 |
| 99, 100 | 10 |
| 11, 12 | 10 |
| 127, 128 | 10 |

| | |
|----------|----|
| 27, 28 | 10 |
| 97, 98 | 10 |
| 45, 46 | 10 |
| 141, 142 | 10 |
| 107, 108 | 10 |
| 129, 130 | 10 |
| 93, 94 | 10 |
| 63, 64 | 10 |
| 25, 26 | 10 |
| 49, 50 | 10 |
| 67, 68 | 10 |
| 85, 86 | 10 |
| 29, 30 | 10 |
| 51, 52 | 10 |
| 35, 36 | 10 |
| 147, 148 | 10 |
| 119, 120 | 10 |
| 123, 124 | 10 |
| 249, 250 | 10 |
| 149, 150 | 10 |
| 83, 84 | 10 |

| | |
|----------|----|
| 43, 44 | 10 |
| 133, 134 | 10 |
| 113, 114 | 10 |
| 105, 106 | 10 |
| 75, 76 | 10 |
| 111, 112 | 10 |
| 117, 118 | 10 |
| 115, 116 | 10 |
| 125, 126 | 10 |
| 137, 138 | 10 |
| 135, 136 | 10 |
| 69, 70 | 10 |
| 89, 90 | 10 |
| 31, 32 | 10 |
| 13, 14 | 10 |
| 65, 66 | 10 |
| 57, 58 | 10 |
| 77, 78 | 10 |
| 73, 74 | 10 |
| 109, 110 | 10 |
| 59, 60 | 10 |

| | |
|----------|----|
| 71, 72 | 10 |
| 139, 140 | 10 |
| 55, 56 | 10 |
| 15, 16 | 10 |
| 131, 132 | 10 |
| 95, 96 | 10 |
| 101, 102 | 10 |
| 39, 40 | 10 |
| 143, 144 | 10 |
| 103, 104 | 10 |
| 17, 18 | 10 |
| 53, 54 | 10 |
| 21, 22 | 10 |
| 151, 152 | 10 |
| 23, 24 | 10 |
| 121, 122 | 10 |
| 41, 42 | 10 |
| 47, 48 | 10 |
| 247, 248 | 10 |
| 33, 34 | 10 |
| 19, 20 | 10 |

| | |
|----------|----|
| 87, 88 | 10 |
| 81, 82 | 10 |
| 91, 92 | 10 |
| 61, 62 | 10 |
| 37, 38 | 10 |
| 79, 80 | 10 |
| 231, 232 | 11 |
| 157, 158 | 11 |
| 189, 190 | 11 |
| 167, 168 | 11 |
| 207, 208 | 11 |
| 251, 252 | 11 |
| 213, 214 | 11 |
| 177, 178 | 11 |
| 187, 188 | 11 |
| 205, 206 | 11 |
| 211, 212 | 11 |
| 197, 198 | 11 |
| 209, 210 | 11 |
| 185, 186 | 11 |
| 229, 230 | 11 |

| | |
|----------|----|
| 223, 224 | 11 |
| 179, 180 | 11 |
| 193, 194 | 11 |
| 173, 174 | 11 |
| 217, 218 | 11 |
| 153, 154 | 11 |
| 219, 220 | 11 |
| 183, 184 | 11 |
| 253, 254 | 11 |
| 199, 200 | 11 |
| 255, 256 | 11 |
| 155, 156 | 11 |
| 169, 170 | 11 |
| 195, 196 | 11 |
| 215, 216 | 11 |
| 191, 192 | 11 |
| 175, 176 | 11 |
| 161, 162 | 11 |
| 221, 222 | 11 |
| 225, 226 | 11 |
| 163, 164 | 11 |

| | |
|----------|----|
| 159, 160 | 11 |
| 233, 234 | 11 |
| 171, 172 | 11 |
| 203, 204 | 11 |
| 181, 182 | 11 |
| 227, 228 | 11 |
| 165, 166 | 11 |
| 257, 258 | 26 |
| 237, 238 | 30 |
| 241, 242 | 30 |
| 239, 240 | 30 |
| 245, 246 | 30 |
| 235, 236 | 30 |
| 313, 314 | 30 |
| 345, 346 | 10 |
| 321, 322 | 10 |
| 323, 324 | 10 |
| 315, 316 | 10 |
| 201, 202 | 10 |
| 265, 266 | 10 |
| 145, 146 | 10 |

| | |
|----------|----|
| 287, 288 | 10 |
| 293, 294 | 10 |
| 351, 352 | 10 |
| 311, 312 | 10 |
| 279, 280 | 10 |
| 289, 290 | 10 |
| 283, 284 | 10 |
| 373, 374 | 10 |
| 337, 338 | 10 |
| 371, 372 | 10 |
| 291, 292 | 10 |
| 3, 4 | 10 |
| 307, 308 | 10 |
| 343, 344 | 10 |
| 349, 350 | 10 |
| 329, 330 | 10 |
| 355, 356 | 10 |
| 339, 340 | 10 |
| 295, 296 | 10 |
| 333, 334 | 10 |
| 281, 282 | 10 |

| | |
|----------|----|
| 361, 362 | 10 |
| 347, 348 | 10 |
| 319, 320 | 10 |
| 357, 358 | 10 |
| 365, 366 | 10 |
| 273, 274 | 10 |
| 277, 278 | 10 |
| 271, 272 | 10 |
| 285, 286 | 10 |
| 259, 260 | 10 |
| 325, 326 | 10 |
| 331, 332 | 10 |
| 359, 360 | 10 |
| 303, 304 | 10 |
| 363, 364 | 10 |
| 305, 306 | 10 |
| 341, 342 | 10 |
| 375, 376 | 11 |
| 377, 378 | 11 |
| 379, 380 | 11 |
| 301, 302 | 11 |

| | |
|----------|----|
| 309, 310 | 11 |
| 263, 264 | 11 |
| 269, 270 | 11 |
| 353, 354 | 11 |
| 299, 300 | 11 |
| 367, 368 | 11 |
| 261, 262 | 11 |
| 369, 370 | 11 |
| 267, 268 | 11 |
| 317, 318 | 11 |
| 297, 298 | 11 |
| 327, 328 | 5 |
| 275, 276 | 6 |

Burada açıklanan yöntemden kaynaklanan bir hibrid polipeptit, orijinal enzimlerde gösterilmeyen özel enzim aktivitesi sergileyebilir. Örneğin hidrolaz aktivitelerini kodlayan polinükleotidlerin rekombinasyon ve / veya indirgeyici yeniden sınıflandırılmasını takiben bir hibrid polinükleotid tarafından kodlanan nihai hibrid polipeptit, orijinal enzimlerin her birinden elde edilen özel hidrolaz aktiviteleri, yani hidrolazın üzerinde etkin olduğu bağ tipi ve hidrolazın çalıştığı sıcaklık için taranabilir. Bu nedenle, örneğin hidrolaz aşağıdaki gibi orijinal hidrolazlardan hibrid hidrolazı ayırt eden kimyasal işlevsellikleri belirlemek için taranabilir: (a) amid (peptit bağları), yani ksilanazlar; (b) ester bağları, yani esterazlar ve lipazlar; (c) asetaller, yani glikosidazlar ve örneğin hibrit polipeptitin işlev gördüğü sıcaklık, pH veya tuz konsantrasyonu.

Orijinal polinükleotidlerin kaynakları tek tek organizmalardan ("izolatlar"), tanımlı ortamlarda ("zenginleştirme kültürleri") yetiştirilen organizmaların koleksiyonları veya ekilmemiş organizmalardan ("çevresel numuneler") izole edilebilir. Çevresel numunelerden yeni biyoaktiviteleri kodlayan polinükleotidleri üretmek için kültürden 5 bağımsız bir yaklaşımın kullanılması, biyolojik çeşitliliğin kullanılmayan kaynaklarına erişime izin verdiğinden en çok tercih edilendir.

"Çevre kütüphaneleri" çevresel örneklerden üretilir ve uygun prokaryotik konakçılarda çoğaltılabilecek klonlama vektörlerinde arşivlenen doğal olarak meydana gelen organizmaların kolektif genomlarını temsil eder. Klonlanmış DNA başlangıçta 10 doğrudan çevresel örneklerden çıkarıldığı için kütüphaneler saf kültürde yetiştirilebilecek prokaryotların küçük fraksiyonları ile sınırlı değildir. Ek olarak bu örneklerde bulunan çevresel DNA'nın normalleşmesi, orijinal numunede bulunan tüm türlerden DNA'nın daha eşit şekilde temsil edilmesine izin verebilir. Bu, baskın türlere kıyasla birkaç büyüklük kertesini az temsil edilen numunenin küçük bileşenlerinden ilginç 15 genler bulma etkinliğini önemli ölçüde artırabilir.

Örneğin bir veya daha fazla ekilmemiş mikroorganizmadan üretilen gen kütüphaneleri ilgi konusu bir aktivite için taranır. İlgi konusu olan biyoaktif molekülleri kodlayan potansiyel yollar, ilk olarak gen ekspresyon kitaplıkları formunda prokaryotik hücrelerde yakalanır. İlgi aktivitelerini kodlayan polinükleotidler bu kütüphanelerden 20 izole edilir ve bir konak hücreye dahil edilir. Konak hücre, yeni veya geliştirilmiş aktivitelerle potansiyel olarak aktif biyomoleküller oluşturan rekombinasyonu ve / veya indirgeyici yeniden sınıflandırmayı teşvik eden koşullar altında büyütülür.

Ek olarak ilgili sekansları daha fazla izole etmek için alt klonlama yapılabilir. Alt klonlamada DNA'nın bir kısmı istenen sekansı kesmek için genellikle kısıtlama 25 enzimleri tarafından amplifiye edilir, sindirilir, istenen sekans bir alıcı vektörüne bağlanır ve amplifiye edilir. Alt klonlamada her adımda yapısal proteini kodlayan DNA'nın dışarıda tutulmadığından emin olmak için bu kısım ilgili aktivite açısından incelenir. Ek, alt klonlamanın herhangi bir aşamasında, örneğin bir vektöre bağlanmadan önce jel elektroforezi ile saflaştırılabilir veya alıcı vektörü ihtiva eden 30 hücreler ve alıcı vektörü ihtiva etmeyen hücreler, örneğin bir antibiyotik içeren seçici ortamlara yerleştirildiğinde, ki bu alıcı vektörü içermeyen hücreleri öldürecektir, saflaştırılabilir. Vektörler içine cDNA'nın alt klonlanmasıyla ilgili özel yöntemler teknikte iyi bilinmektedir (Sambrook vd. , Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. baskı,

Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Bu gibi alt klonlar, örneğin uzunluk, bir mutasyon, bir etiket veya bir işaret ile ana klondan farklı olabilir.

Buluşa ait ksilanazların bazılarının sinyal dizileri içerebileceği veya içermeyebileceği anlaşılmalıdır. Farklı bir ksilanazın bir nükleik asit sekansına işlevsel olarak bağlı bir ksilanazdan bir sinyal sekansını kodlayan bir nükleik asit sekansının veya bir yönde (isteğe bağlı olarak) bir ksilanaz olmayan proteinden gelen bir sinyal sekansının içerilmesi arzu edilebilir.

Polinükleotitin hazırlanabileceği mikroorganizmalar arasında, Eubacteria ve Archaeobacteria gibi prokaryotik mikroorganizmalar ve mantarlar, bazı algler ve protozoa gibi daha düşük ökaryotik mikroorganizmalar bulunur. Polinükleotidler çevresel numunelerden izole edilebilir, bu durumda nükleik asit bir organizmanın kültürlenmesi olmaksızın geri kazanılabilir veya bir veya daha fazla kültürlenmiş organizmadan geri kazanılabilir. Bu tür mikroorganizmalar hipertermofiller, psikrofiller, psikrotroflar, halofiller, barofiller ve asidofiller gibi ekstremofiller olabilir. Ekstremofilik mikroorganizmalardan izole edilen enzimleri kodlayan polinükleotidler kullanılabilir. Bu tür enzimler karasal sıcak sularda ve derin deniz ısı deliklerinde 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, kutup sularında 0 °C'nin altındaki sıcaklıklarda, Ölü Deniz'in doymuş tuz ortamında, kömür yataklarında ve kükürttен zengin jeotermal kaynaklarda 0 civarında pH değerlerinde veya atık çamurda 11'den büyük pH değerlerinde çalışabilirler. Örneğin ekstremofilik organizmalardan klonlanan ve eksprese edilen çeşitli esterazlar ve lipazlar, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında yüksek aktivite gösterir.

Yukarıda tarif edildiği gibi seçilen ve izole edilen polinükleotidler uygun bir konak hücre içine sokulur. Uygun bir konak hücre rekombinasyonu ve / veya indirgeyici yeniden sınıflandırmayı destekleyebilen herhangi bir hücredir. Seçilen polinükleotidler tercih edilen şekliyle uygun kontrol sekanslarını içeren bir vektörde zaten mevcuttur. Konak hücre bir memeli hücresi gibi daha yüksek bir ökaryotik hücre veya bir maya hücresi gibi bir alt ökaryotik hücre olabilir veya tercih edilen şekliyle konak hücre bir bakteri hücresi gibi bir prokaryotik hücre olabilir. Yapının konak hücreye sokulması, kalsiyum fosfat transfeksiyonu, DEAE- Dekstran aracılı transfeksiyon veya elektroporasyon yoluyla gerçekleştirilebilir (Davis vd. , 1986).

Uygun konakların temsili örnekleri olarak aşağıdakilerden söz edilebilir: E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium gibi bakteriyel hücreler; maya gibi mantar

hücreleri; *Drosophila* S2 ve *Spodoptera* Sf9 gibi böcek hücreleri; CHO, COS veya Bowes melanoma gibi hayvan hücreleri; adenovirüsler ve bitki hücreleri. Uygun bir konağın seçimi, buradaki öğretilerden yola çıkarak teknikte tecrübeli kişilerin bilgi kapsamı dahilinde kabul edilir.

- 5 Rekombinant proteini eksprese etmek için kullanılabilen çeşitli memeli hücre kültürü sistemlerine özel referanslar ile memeli ekspresyon sistemlerinin örnekleri arasında "SV40- transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981) belgesinde tarif edilen maymun böbrek fibroblastları COS- 7 hatları ve örneğin C127, 3T3, CHO, HeLa ve BHK hücre hatları gibi uyumlu bir vektörü
- 10 eksprese edebilen diğer hücre hatları bulunmaktadır. Memeli ekspresyon vektörleri bir replikasyon kökeni, gerekli herhangi bir ribozom bağlanma yeri, bir poliadenilasyon yeri, uçbirleştirme donör ve akseptör yerleri, transkripsiyonel sonlandırma sekansları ve 5' yan transkribe edilmemiş sekansları içerebilir. SV40 uçbirleştirme ve poliadenilasyon alanlarından türetilen DNA sekansları, transkribe edilmemiş genetik
- 15 elementlerin sağlanması için kullanılabilir.

Burada tarif edilen yöntemler bir veya daha fazla operon veya gen kümesinden veya bunların bölümlerinden biyokimyasal yolları kodlayan yeni polinükleotitlerin üretilmesi için kullanılabilir. Örneğin bakteriler ve birçok ökaryot, ürünleri ilgili süreçlere katılan genleri düzenlemek için koordineli bir mekanizmaya sahiptir. Genler tek bir kromozom

20 üzerinde "gen kümeleri" olarak adlandırılan yapılarda kümelenir ve bütün kümenin transkripsiyonunu başlatan tek bir promotör dahil olmak üzere tek bir düzenleyici sekansın kontrolü altında birlikte transkribe edilir. Dolayısıyla bir gen kümesi genellikle fonksiyonlarına göre özdeş veya ilişkili olan bir bitişik gen grubudur. Gen kümeleri tarafından kodlanan bir biyokimyasal yolun bir örneği poliketidlerdir.

- 25 Gen küme DNA'sı farklı organizmalardan izole edilebilir ve vektörlere, özellikle de bağlanabilir gen kümelerinden saptanabilir bir proteinin üretimini veya proteinle ilgili dizilim aktivitesini kontrol edebilen ve düzenleyen ekspresyon düzenleyici sekansları içeren vektörlere bağlanabilir. Ekzojen DNA girişi için son derece büyük bir kapasiteye sahip olan vektörlerin kullanımı, bu tür gen kümeleriyle kullanım için özellikle uygundur
- 30 ve *E. coli*'nin f- faktörünü (veya doğurganlık faktörünü) içermek üzere buradaki örnek yoluyla açıklanmaktadır. *E. coli*'nin bu f- faktörü konjugasyon sırasında kendi yüksek frekanslı transferini etkileyen bir plasmiddir ve karışık mikrobiyal numunelerden alınan gen kümeleri gibi büyük DNA fragmanlarının elde edilmesi ve stabil olarak ilerletilmesi

5 için idealdir. "Fosmidler" veya bakteriyel yapay kromozom (BAC) vektörleri olarak adlandırılan klonlama vektörleri, genomik DNA'nın büyük bölümlerini kararlı bir şekilde bütünleştirebilen *E. coli* f faktöründen türetilir. Karışık bir kültürlenmemiş çevre numunesinden gelen DNA ile entegre edildiğinde, bu, kararlı bir "çevresel DNA kütüphanesi" biçiminde geniş genomik fragmanların elde edilmesini mümkün kılar. Kullanım için bir başka vektör türü bir kozmid vektördür. Kozmid vektörleri orijinal olarak genomik DNA'nın büyük bölümlerini klonlamak ve çoğaltmak için tasarlanmıştır. Kozmid vektörleri içine klonlama Sambrook vd. , *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. baskı, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) belgesinde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Uygun bir vektöre bağlandıktan sonra, farklı poliketid sentaz geni kümeleri içeren iki veya daha fazla vektör uygun bir konakçı hücre içine sokulabilir. Gen kümeleri tarafından paylaşılan kısmi dizi homolojisinin bölgeleri, bir hibrid gen kümesine neden olan sekansın yeniden organize edilmesiyle sonuçlanan süreçleri destekleyecektir. Yeni hibrit gen kümesi, daha sonra orijinal gen kümelerinde bulunmayan geliştirilmiş aktiviteler için taranabilir.

Biyolojik olarak aktif hibrid polipeptit ve geliştirilmiş aktivite için böyle bir polipeptitin taranması şu şekilde olabilir:

- 1) işlevsel bir bağlantıdaki en az bir birinci polinükleotidin ve işlevsel bir bağlantıdaki en az bir ikinci polinükleotidin uygun bir konak hücre içine sokulması, en az bir birinci polinükleotit ve ikinci polinükleotidin en az bir kısmi sekans homoloji bölgesini paylaşması;
- 2) konak hücrenin işlevsel olarak bağlanabilen bir melez polinükleotit ile sonuçlanan sekansın yeniden düzenlenmesini teşvik eden koşullar altında büyütülmesi;
- 3) hibrid polinükleotid tarafından kodlanan bir hibrid polipeptiti eksprese etmesi;
- 4) geliştirilmiş biyolojik aktivitenin tanımlanmasını destekleyen koşullar altında hibrid polipeptitin taranması; ve
- 5) hibrid polipeptiti kodlayan bir polinükleotitin izole edilmesi.

Çeşitli enzim aktivitelerinin taranması için yöntemler, teknikte uzman kişilerce bilinir ve mevcut tarifname boyunca tartışılır. Bu tür yöntemler buluşun polipeptitlerini ve polinükleotitlerini izole ederken kullanılabilir.

Tarama Metodolojileri ve "On- line" İzleme Cihazları

Buluşun polipeptitleri ve nükleik asitleri ile birlikte, örneğin ksilanaz aktivitesi için polipeptitleri taramak üzere (örneğin zimogramlarda kazeinin hidrolizi, jelatinden floresanın salınması veya çeşitli küçük peptit substratlarından p- nitroanalidin salınması gibi analizlerde), buluşun bir nükleik asidine hibridize olan nükleik asitler için, buluşa ait bir polipeptite bağlanan antikolar için bir ksilanaz aktivitesinin potansiyel modülatörleri, örneğin aktivatörleri veya inhibitörleri olarak bileşikleri taramak üzere Buluşun asidi, buluşun bir polipeptitini ve benzerlerini eksprese eden hücreleri taramak üzere çeşitli aparatlar ve metodolojiler kullanılabilir. Örneklerin taranması için aşağıda detaylı olarak açıklanan dizilim formatlarına ek olarak, alternatif formatlar da kullanılabilir. Bu formatlar arasında, örneğin kütle spektrometreleri, kromatograflar, ör. yüksek verimli HPLC ve diğer sıvı kromatografisi formları ve 1536- kuyucuklu plakalar, 384- kuyucuklu plakalar ve benzerleri gibi daha küçük formatlar bulunur. Yüksek verimli tarama aparatı uyarlanabilir ve kullanılabilir, bakınız, örneğin ABD Patent Başvurusu No. 20020001809 .

Kapiler Diziler

Buluşa ait nükleik asitler veya polipeptitler bir dizide sabitlenebilir veya bir uygulanabilir. Diziler bir nükleik asit veya buluşun bir polipeptitinin aktivitesine bağlanma veya modüle etme yetenekleri için bileşimlerin (örneğin küçük moleküller, antikolar, nükleik asitler, vb.) kütüphanelerini taramak veya izlemek için kullanılabilir. GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA gibi kapiler diziler; ve örneğin U. S. Patent Başvuru No. 20020080350 A1; WO 0231203 A; WO 0244336 A belgelerinde tarif edilen diziler numunelerin tutulması ve taranması için alternatif bir aparat sağlar. Kapiler dizi bitişik kapiler bir dizi halinde oluşturulan çok sayıda kapiler içerebilir, burada her bir kapiler bir numuneyi tutmak için bir lümeni tanımlayan en az bir duvar içerir. Lümen, duvarların bir sıvı veya numunenin tutulması için bir lümen oluşturduğu sürece, silindirik, kare, altıgen veya başka herhangi bir geometrik şekilde olabilir. Kapiler dizinin kapilerleri düzlemsel bir yapı oluşturmak için birbirine yakın olarak tutulabilir. Kapilerler kaynaştırılarak (ör. kapilerlerin camdan yapıldığı yerde), yapıştırılarak, bağlanarak veya kenetlenerek yan yana birleştirilebilir. Ek olarak kapiler dizi, dizideki bitişik kapilerler arasına yerleştirilmiş interstisyel materyali içerebilir, böylece çok sayıda açık deliği içeren bir katı düzlemsel cihaz oluşturur.

Bir kapiler dizi herhangi bir sayıda bireysel kapiler kısımdan, örneğin 100 ila 4,000,000 arasında değişen kapilerlerden oluşturulabilir. Ayrıca standart laboratuvar ekipmanına takılmak üzere bir Microtiter® plakanın standart boyutu ve şekli içinde yaklaşık 100,000 veya daha fazla bireysel kapilere sahip bir kapiler dizi oluşturulabilir. Lümenler elle veya otomatik olarak ince bir iğne kullanılarak kılcal hareket veya mikroenjeksiyon ile 5 doldurulur. Daha sonra yapılacak analizler ya da karakterizasyon için sonrasında ilgili numuneler bireysel kapilerlerden çıkarılabilir. Örneğin ince, iğne benzeri bir prob lümenine materyal eklemek veya çıkarmak için seçilen bir kapiler ile sıvı iletişimde konumlandırılır.

10 Bir tek- kap tarama analizinde analiz bileşenleri kapiler diziyeye yerleştirilmeden önce bir ilgi konusu çözeltiyi vermek üzere karıştırılır. Lümen, dizinin en az bir kısmı ilgilenilen bir çözelti içine daldırıldığında kapiler eylemle doldurulur. Her bir kapilerdeki kimyasal veya biyolojik reaksiyonlar ve / veya aktivite, saptanabilir olaylar için izlenir. Saptanabilir bir olay genellikle "isabet" olarak adlandırılır; bu, genellikle "isabetsiz" 15 kapiler damarlardan optik saptama ile ayırt edilebilir. Böylece kapiler diziler "isabetlerin" büyük ölçüde paralel tespiti için izin verir.

Çok kaplı bir tarama analizinde bir polipeptit veya nükleik asit, örneğin bir ligand bir kapiler dizinin bir kapiler kısmının en azından bir kısmına sokulan bir birinci bileşene sokulabilir. Bir hava kabarcığı daha sonra birinci bileşenin arkasındaki kapilere 20 sokulabilir. İkinci bir bileşen daha sonra kapilere sokulabilir, burada ikinci bileşen birinci bileşenden hava kabarcığı ile ayrılır. Birinci ve ikinci bileşenler daha sonra kabarcığı çöktürmek için kapiler dizinin her iki tarafına hidrostatik basınç uygulanarak karıştırılabilir. Kapiler dizi daha sonra iki bileşenin reaksiyonundan veya reaksiyondan kaynaklanmadan saptanabilir bir olay için izlenir.

25 Bir bağlanma tarama analizinde ilgi konusu bir numune bir kapiler dizinin bir kapiler kısmına saptanabilir bir parçacık ile işaretlenmiş bir birinci sıvı olarak verilebilir, burada kapilerin lümeni algılanabilir parçacığı lümeneye bağlamak için bir bağlanma malzemesi ile kaplanır. Birinci sıvı daha sonra kapiler borudan çıkarılabilir, burada bağlı tespit edilebilir parçacık kapiler içinde muhafaza edilir ve ikinci bir sıvı kapiler boru içine 30 sokulabilir. Kapiler daha sonra partikülün ikinci sıvı ile reaksiyona girmesi veya reaksiyon girmemesi sonucu ortaya çıkan tespit edilebilir bir olay için izlenir.

Diziler veya 'Biyoçipler'

Buluşa ait nükleik asitler ve / veya polipeptitler bir diziye, örneğin bir "biyoçip"e immobilize edilebilir veya uygulanabilir. Diziler bir nükleik asit veya buluşun bir polipeptitinin aktivitesine bağlanma veya modüle etme yetenekleri için bileşimlerin (örneğin küçük moleküller, antikolar, nükleik asitler, vb.) kütüphanelerini taramak veya izlemek için kullanılabilir. Örneğin izlenen bir parametre bir ksilanaz geninin transkript ekspresyonudur. Bir veya daha fazla veya bir hücrenin tüm transkriptleri hücrenin transkriptlerini veya bir hücrenin transkriptlerinin temsilcisi veya tamamlayıcısı olan nükleik asitleri içeren bir numunenin hibridizasyonu, bir dizi veya "biyoçip" üzerinde hareketsizleştirilmiş nükleik asitlere hibritleme yoluyla ölçülebilir. Bir mikroçip üzerinde nükleik asitlerin bir "dizisini" kullanarak bir hücrenin transkriptlerinin bir kısmı veya tamamı eş zamanlı olarak ölçülebilir. Alternatif olarak genomik nükleik asit içeren diziler de yeni tasarlanmış bir suşun genotipini belirlemek için kullanılabilir. Polipeptit dizileri birden fazla proteinin aynı anda ölçülmesi için de kullanılabilir. "Mikrodizi" veya "nükleik asit dizisi" veya "polipeptit dizisi" veya "antikor dizisi" veya "biyoçip" veya bunların varyasyonları olarak da bilinen herhangi bir "dizi" kullanılabilir. Diziler genetik olarak çok sayıda "nokta" veya "hedef eleman" olup, her bir hedef eleman bir numune molekülüne, örneğin mRNA transkriptlerine spesifik bir bağlanma için bir substrat yüzeyinin belirli bir alanı üzerine hareketsizleştirilmiş bir veya daha fazla biyolojik molekülün, örneğin oligonükleotidlerin belirli bir miktarını içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle "dizi" veya "mikrodizi" veya "biyoçip" veya "çip" terimleri çok sayıda hedef elemandır, her bir hedef eleman aşağıda daha ayrıntılı olarak tartışıldığı gibi bir substrat yüzeyinin alanının tanımlanan bir alanında hareketsizleştirilen bir veya daha fazla polipeptitin (antikolar dahil) veya nükleik asitin belirlenmiş bir miktarını içerir.

Dizileri yapmak ve kullanmak için bilinen diziler ve / veya yöntemler örneğin aşağıdaki kaynaklarda tarif edildiği gibi tamamen veya kısmen veya bunların varyasyonları olarak dahil edilebilir: U. S. Patent No. 6,277,628; 6,277,489; 6,261,776; 6,258,606; 6,054,270; 6,048,695; 6,045,996; 6,022,963; 6,013,440; 5,965,452; 5,959,098; 5,856,174; 5,830,645; 5,770,456; 5,632,957; 5,556,752; 5,143,854; 5,807,522; 5,800,992; 5,744,305; 5,700,637; 5,556,752; 5,434,049; bkz. ayrıca, örn., WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; bakınız aynı zamanda, ör. Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171- R174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-

1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120- 124; Solinas- Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399- 407; Bowtell (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32. Ayrıca bkz. yayınlanmış US Patent Başvuru No. 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

5 **Antikorlar ve Antikor bazlı tarama yöntemleri**

Buluşun bir ksilanazına spesifik olarak bağlanan izole edilmiş, sentetik veya rekombinant antikorlar, buluşun ksilanazlarını veya ilgili polipeptitleri izole etmek, tanımlamak veya ölçmek için kullanılabilir. Bu antikorlar buluş kapsamındaki diğer polipeptitleri veya diğer ilgili ksilanazları izole etmek için kullanılabilir. Antikorlar bir ksilanazın aktif bir bölgesine bağlanmak üzere tasarlanabilir.

Buluş, buluşun bir polipeptitini veya peptitini ve adjuvanları veya taşıyıcıları ve benzerlerini içeren bileşimler sağlar.

Antikorlar immünoçöktürme, boyama, immünoafinite kolonları ve benzerlerinde kullanılabilir. İstenirse, spesifik antijenleri kodlayan nükleik asit sekansları immünizasyon, ardından polipeptit veya nükleik asit izolasyonu, polipeptitin amplifikasyonu veya klonlanması ve bir dizi üzerine immobilizasyonu ile üretilebilir. Alternatif olarak yöntemler modifiye edilecek bir hücre tarafından üretilen bir antikorun yapısını değiştirmek için kullanılabilir, örneğin bir antikorun afinitesi artırılabilir veya azaltılabilir.

Ayrıca antikorları yapma veya modifiye etme kabiliyeti, burada tarif edilen metotlarla bir hücreye dönüştürülmüş bir fenotip olabilir.

"Antikor" terimi, bir antijen veya epitopu spesifik olarak bağlayabilen bir immünooglobulin geni veya immünooglobulin genleri veya bunların fragmanlarından türetilmiş, bunlarla modellenmiş veya büyük ölçüde bunlarla kodlanmış bir peptit veya polipeptiti içerir, örneğin bakınız *Fundamental Immunology*, Üçüncü Baskı, W. E. Paul, ed. , Raven Press, NY (1993); Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85- 97. Antikor terimi antijen bağlama kapasitesini koruyan antijen bağlayıcı kısımları, yani "antijen bağlama yerleri" (ör. fragmanları, alt sekansları, tamamlayıcılık belirleyici bölgeleri (CDR'ler)) içerir, bunlar (i) bir Fab fragmanı, VL, VH, CL ve CH1 alanlarından meydana gelen tek değerlikli bir fragman; (ii) bir f (ab ') 2 fragmanı, menteşe bölgesinde bir disülfür köprüsüyle bağlanan iki Fab fragmanını içeren bir iki değerlikli fragman; (iii) VH ve CH1

alanlarından oluşan bir Fd fragmanı; (iv) bir antikorun tek bir kolunun VL ve VH alanlarından oluşan bir Fv fragmanı, (v) bir VH alanından meydana gelen bir dAb fragmanı (Ward vd, (1989) Nature 341: 544- 546) ve (vi) izole bir tamamlayıcılık belirleme bölgesini (CDR) içerir. Tek zincirli antikorlar "antikor" terimine de referans olarak dahil edilmiştir.

Antikorların (poliklonal ve monoklonal) immünizasyon, üretim ve izole edilmesi yöntemleri teknikte uzman kişilerce bilinir ve bilimsel literatürde ve patent literatüründe anlatılır, bkz. örneğin Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (ed.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2. baskı) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York. Antikorlar ayrıca in vitro olarak, örneğin hayvanları kullanan geleneksel in vivo yöntemlere ek olarak faj gösterim kütüphanelerini ekaprese eden rekombinant antikor bağlama bölgesi kullanılarak üretilebilir. Bakınız örneğin Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15: 62- 70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27- 45.

Buluşa göre olan polipeptitler veya bunların en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asitlerini içeren (hak talep edilen buluşun bir parçası olmayan) fragmanlar ayrıca spesifik olarak polipeptitlere veya fragmanlara bağlanan antikorlar üretmek için kullanılabilir. Elde edilen antikorlar polipeptiti izole etmek veya saflaştırmak veya polipeptitin bir biyolojik numunede mevcut olup olmadığını belirlemek için immünoafinite kromatografisi prosedürlerinde kullanılabilir. Bu tür prosedürlerde bir ekstrakt veya bir biyolojik numune gibi bir protein preparatı buluşa ait polipeptitlerden veya bunların en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asit içeren fragmanlarından birine spesifik olarak bağlanabilen bir antikor ile temas ettirilir.

İmmünoafinite prosedürlerinde antikor bir boncuk veya başka bir kolon matrisi gibi bir katı desteğe bağlanır. Protein preparasyonu antikorun buluşa ait polipeptitlerden birine veya bunun fragmanına spesifik olarak bağlandığı koşullar altında antikora temas ettirilir. Spesifik olarak bağlı olmayan proteinleri uzaklaştırmak için bir yıkamadan sonra, spesifik olarak bağlı polipeptitler ayrıştırılır.

Bir biyolojik numunedeki proteinlerin antikorlara bağlanma yeteneği, teknikte uzman kişilerce bilinen çeşitli prosedürlerden herhangi biri kullanılarak belirlenebilir. Örneğin bağlanma antikorun bir flüoresan ajan, bir enzimatik etiket veya bir radyoizotop gibi algılanabilir bir etiket ile etiketlenmesiyle belirlenebilir. Alternatif olarak antikorun numuneye bağlanması, üzerinde böyle bir saptanabilir etikete sahip olan bir ikincil antikor kullanılarak tespit edilebilir. Özel deneyler arasında ELISA deneyleri, sandviç analizleri, radyoimmüno analizler ve Western Blots bulunur.

Buluşun polipeptitlerine karşı üretilen poliklonal antikorlar veya bunların en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 veya daha fazla ardışık amino asitlerini içeren fragmanları polipeptitlerin bir hayvana doğrudan enjekte edilmesi veya polipeptitlerin bir hayvana, örneğin insan olmayanlara uygulanması yoluyla elde edilebilir. Bu şekilde elde edilen antikor daha sonra polipeptitin kendisine bağlanacaktır. Bu şekilde polipeptitin sadece bir parçasını kodlayan bir sekans bile tüm doğal polipeptide bağlanabilen antikorları üretmek için kullanılabilir. Bu gibi antikorlar daha sonra polipeptiti bu polipeptiti eksprese eden hücrelerden izole etmek için kullanılabilir.

Monoklonal antikorların hazırlanması için kesintisiz hücre çizgisi kültürleri tarafından üretilen antikorları sağlayan herhangi bir teknik kullanılabilir. Örnekler arasında hibridom tekniği (Kohler ve Milstein, Nature, 256: 495- 497, 1975), trioma tekniği, insan B- hücresi hibridom tekniği (Kozbor vd. , Immunology Today 4:72, 1983) ve EBV- hibridom tekniği (Cole, vd. , 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. , pp. 77- 96) bulunur.

Tek zincirli antikorların üretimi için tarif edilen teknikler (US Patent No. 4,946,778) buluşun polipeptitlerine veya bunların en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asidini içeren fragmanlarına tek zincirli antikorlar üretilmesi için adapte edilebilir. Alternatif olarak transgenik fareler bu polipeptitlere veya fragmanlarına insanlaştırılmış antikorları eksprese etmek için kullanılabilir.

Buluşun polipeptitlerine veya bunların en az 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 veya 150 ardışık amino asitlerini içeren fragmanlarına karşı üretilen antikorlar diğer organizmalardan ve numunelerden gelen benzer polipeptitlerin taranmasında kullanılabilir. Bu tekniklerde organizmadan gelen polipeptitler antikor ile temas ettirilir ve antikora spesifik olarak bağlanan polipeptitler tespit edilir. Yukarıda tarif edilen

prosedürlerden herhangi biri antikor bağlanmasını tespit etmek için kullanılabilir. Böyle bir tarama testi "Methods for Measuring Cellulase Activities", Methods in Enzymology, cilt 160, sayfa 87- 116belgesinde tarif edilir.

Kitler

- 5 Kitler, örneğin nükleik asitler, ekspresyon kasetleri, vektörler, hücreler, transgenik tohumlar veya bitkiler veya bitki kısımları, polipeptitler (ksilanazlar) ve / veya buluşa ait antikorlar gibi bileşimleri içerir. Kitler ayrıca metodolojileri ve endüstriyel, araştırma, tıbbi, farmasötik, gıda ve yem ve gıda ve yem takviyesi işlemlerini ve burada tarif edilen diğer uygulamaları ve işlemleri öğreten öğretim materyallerini içerebilir.

10 **Bütün hücre mühendisliği ve metabolik parametrelerin ölçülmesi**

Hücrenin genetik bileşimine modifiye ederek yeni bir fenotipe, örneğin yeni veya modifiye bir ksilanaz aktivitesine sahip yeni bir hücre suşu geliştirmek için bir hücrenin bütün hücre evrimi veya tam hücre mühendisliği. Genetik bileşim buluşun bir nükleik asidinin hücrelerine ilave edilerek, örneğin buluşun bir enzimi için bir kodlama sekansı ile modifiye edilebilir. Bakınız ör. WO0229032; WO0196551 .

Yeni fenotipi saptamak için modifiye edilmiş bir hücrenin en az bir metabolik parametresi "gerçek zamanlı" veya "on- line" zaman çerçevesinde hücrede izlenir. Bir hücre kültürü gibi bir çok hücre "gerçek zamanlı" veya "on- line" olarak izlenebilir. Çok sayıda metabolik parametre "gerçek zamanlı" veya "on- line" olarak izlenebilir.

20 Metabolik parametreler, buluşun ksilanazları kullanılarak izlenebilir.

Metabolik akış analizi (MFA) bilinen bir biyokimya çerçevesine dayanmaktadır. Doğrusal bağımsız bir metabolik matriks, kütle korunumu yasasına ve hücre içi metabolitlere ilişkin psödo- kararlı durum hipotezine (PSSH) dayanılarak oluşturulur. Aşağıdakileri içeren metabolik ağlar kurulur:

- 25
- tüm yolak substratlarının, ürünlerin ve ara metabolitlerin özdeşliği,
 - yolak metabolitlerini, yolak reaksiyonlarının stokiyometrisini birbirine dönüştürün tüm kimyasal reaksiyonların özdeşliği,
 - reaksiyonları katalize eden tüm enzimlerin özdeşliği, enzim reaksiyon kinetiği,
 - yolak bileşenleri arasındaki düzenleyici etkileşimler, örneğin alosterik
- 30 etkileşimler, enzim- enzim etkileşimleri vb.

- enzimlerin hücre içi bölümlere ayrılması veya enzimlerin herhangi başka bir supramoleküler organizasyonu, ve
 - metabolitlerin, enzimlerin veya efektör moleküllerin herhangi bir konsantrasyon gradyanının veya hareketleri için difüzyon engellerinin varlığı.
- 5 Belirli bir suş için metabolik ağ oluşturulduktan sonra matris nosyonu ile matematiksel sunum, on- line metabolom verileri mevcut ise hücre içi metabolik akışları tahmin etmek için eklenebilir. Metabolik fenotip bir hücre içindeki tüm metabolik ağın değişikliklerine dayanır. Metabolik fenotip çevre koşullarına, genetik düzenlemeye, gelişim durumuna ve genotipe ve benzerleri için yolak kullanımının değişmesine
- 10 dayanır. On- line MFA hesaplamasından sonra yolak kullanımı araştırılarak hücrelerin dinamik davranışı, fenotipi ve diğer özellikleri analiz edilir. Örneğin glikoz kaynağı artar ve maya fermantasyonu sırasında oksijen azalır, solunum yollarının kullanımı azaltılacak ve / veya durdurulacak ve fermentatif yolların kullanımı hakim olacaktır. Hücre kültürlerinin fizyolojik halinin kontrolü, yolak analizi sonrası mümkün olacaktır.
- 15 Yöntemler arzu edilen doğrultuda hareket etmek üzere hücrelerin fizyolojik durumunu kontrol etmek için substrat tedarikinin, sıcaklığın, indükleyicilerin kullanımının vb. nasıl değiştirileceğini belirleyerek fermantasyonun nasıl manipüle edileceğini belirlemeye yardımcı olabilir. MFA sonuçları ayrıca metabolik mühendislik veya gen karıştırma, vb için deney ve protokolleri tasarlamak için transkriptom ve proteom verileri ile
- 20 karşılaştırılabilir.

Hücrede yeni veya geliştirilmiş özellikler dahil olmak üzere değiştirilmiş veya yeni bir fenotip verilebilir ve tespit edilebilir. Metabolizmanın veya büyümenin herhangi bir yönü izlenebilir.

Bir mRNA transkriptinin ekspresyonunu izleme

- 25 Tasarlanan fenotip bir mRNA transkriptinin (örneğin bir ksilanaz mesajı) ekspresyonunun arttırılması veya azaltılması veya bir hücrede yeni (örneğin ksilanaz) transkriptlerin üretilmesini içerebilir. Bu artmış veya azaltılmış ekspresyon buluşun bir ksilanazının varlığına veya ksilanaz aktivitesi analizlerine göre test edilerek izlenebilir. mRNA transkriptleri veya mesajları ayrıca, ör. Northern blotları, kantitatif amplifikasyon
- 30 reaksiyonları, dizilere hibridizasyon ve benzerleri dahil olmak üzere teknikte bilinen herhangi bir yöntemle tespit edilebilir ve nicel olarak tayin edilebilir. Kantitatif amplifikasyon reaksiyonları arasında, örneğin kantitatif ters transkripsiyon polimeraz

zincir reaksiyonu veya RT- PCR dahil olmak üzere kantitatif PCR; kantitatif gerçek zamanlı RT- PCR veya "gerçek zamanlı kinetik RT- PCR" bulunur (bakınız ör. Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114:313- 318; Xia (2001) Transplantation 72:907- 914).

5 Tasarlanan fenotip, homolog bir genin ekspresyonunu nakavt ederek üretilebilir. Genin kodlama sekansı veya bir veya daha fazla transkripsiyonel kontrol elemanı, örneğin promotörler veya hızlandırıcılar nakavt edilebilir. Böylece bir transkript ekspresyonu tamamen kesip çıkarılabilir veya sadece azaltılabilir.

10 Tasarlanan fenotip, homolog bir genin ekspresyonunu arttırmayı içerebilir. Bu, cis- veya trans- içinde hareket eden bir transkripsiyonel düzenleyici eleman dahil olmak üzere bir negatif kontrol elemanının nakavt edilmesiyle veya bir pozitif kontrol elemanının mutagenize edilmesiyle gerçekleştirilebilir. Bir veya daha fazla transkript ya da bir hücrenin tüm transkriptleri, bir hücrenin transkriptlerini veya bir hücrenin transkriptlerini temsil eden veya bunlar için tamamlayıcı nükleik asitlerini içeren bir numunenin hibridizasyonu yoluyla, bir dizi üzerinde hareketsiz hale getirilmiş nükleik
15 asitlere hibridizasyonu ile ölçülebilir.

Bir polipeptit, peptit ve amino asit ekspresyonunun izlenmesi

Buluşun bir yönünde tasarlanan fenotip bir polipeptitin (örneğin bir ksilanaz) ekspresyonunu arttırmayı veya azaltmayı veya bir hücrede yeni polipeptitlerin üretilmesini içerir. Bu artmış veya azalmış ekspresyon mevcut ksilanaz miktarının veya
20 ksilanaz aktivitesi analizlerinin saptanmasıyla izlenebilir. polipeptitler, peptitler ve amino asitler aynı zamanda, örneğin nükleer manyetik rezonans (NMR), spektrofotometri, radyografi (protein radyo etiketleme), elektroforez, kapiler elektroforez, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), hiper difüzyon kromatografisi, çeşitli immünolojik yöntemler,
25 örneğin immünopresipitasyon, immünodifüzyon, immüno- elektroforez, radyoimmünoanalizler (RIA), enzim bağlantılı immünosorban analizleri (ELISA), immünofloresan analizler, jel elektroforezi (ör. SDS- PAGE), antikorlarla boyama, floresanla aktive edilmiş hücre sınıflandırıcı (FACS), piroliz kütle spektrometrisi, Fourier- Transform Kızılötesi Spektrometresi, Raman spektrometrisi, GC- MS ve LC-
30 Elektrosprey ve cap- LC- tandem- elektrosprey kütle spektrometreleri ve benzerleri dahil olmak üzere teknikte bilinen herhangi bir yöntemle saptanabilir ve nicel olarak tayin edilebilir. Yeni biyoaktiviteler US Patent No. 6,057,103'te açıklanan usuller veya

bunların varyasyonları kullanılarak da taranabilir. Ayrıca aşağıda detaylı olarak tartışıldığı gibi bir hücrenin bir veya daha fazla veya tüm polipeptitleri bir protein dizisi kullanılarak ölçülebilir.

Endüstriyel, Enerji, İlaç, Tıbbi, Gıda İşleme ve Diğer Uygulamalar

- 5 Buluşun polipeptitleri herhangi bir endüstriyel, tarımsal, gıda ve yem ve gıda ve yem takviyesi işleme, farmasötik, tıbbi, araştırma (laboratuvar) veya başka bir işlemde kullanılabilir. Buluşun enzimlerini kullanan endüstriyel prosesler, örneğin gıda hazırlama yöntemlerinde, örneğin farmasötik veya besin (diyet) takviyesi endüstrisinde, enerji endüstrisinde (örneğin "temiz" biyoyakıtların yapılması için) ve
- 10 örneğin yem ürünleri ile gıda ve yem katkı maddelerini yapmak için yöntemlerde gıda ve yem endüstrilerinde mevcuttur. Tıp endüstrisinde buluşun enzimlerini kullanan işlemler, örneğin farmasötikler veya diyet yardımcıları veya takviyeleri veya gıda takviyeleri ve katkı maddelerinin yapılması içindir. Ek olarak buluşun enzimleri biyoyakıt üretiminde, örneğin biyoetanol, biyometanol, biyobutanol veya biyopropanol
- 15 gibi bir biyoalkol dahil olmak üzere, "temiz" bir yakıt üretimini içeren biyoyakıt üretiminde kullanılır.

Buluşun ksilanaz enzimleri, yüksek derecede seçici katalizörler olabilir. Bunlar, geleneksel sentetik kimyada benzeri olmayan mükemmel stereo, regio ve kemo-seçiciliklerle reaksiyonları katalize edebilirler. Dahası enzimler dikkate değer ölçüde

20 çok yönlüdür. Buluşun ksilanaz enzimleri, organik çözücüler içinde işlev görmek üzere uyarlanabilir, aşırı pH'larda (örneğin yüksek pH'lar ve düşük pH'lar) aşırı sıcaklıklarda (örneğin yüksek sıcaklıklar ve düşük sıcaklıklar), aşırı tuzluluk seviyelerinde (örneğin yüksek tuzluluk ve düşük tuzluluk) çalışabilir ve doğal, fizyolojik substratlar ile yapısal olarak ilişkili olmayan bileşiklerle reaksiyonları katalize eder.

25 Ahşap, kağıt ve kağıt hamuru

Buluşun ksilanazları herhangi bir ahşap, ahşap ürün, odun atığı veya yan ürün, kağıt, kağıt ürünü, kağıt veya odun hamuru, Kraft hamuru veya ahşap veya kağıt geri dönüşüm işlemi veya endüstriyel proseste, örneğin herhangi bir odun, odun hamuru, kağıt atığı, kağıt veya kağıt hamuru işleme veya ahşap veya kağıt kesme prosesinde

30 kullanılabilir. Buluşun ksilanazları kağıt hamurunu ya da geri dönüştürülmüş kağıdı veya kağıt hamurunu ve benzerlerini işlemek / ön işleme tabi tutmak için kullanılır. Buluşun enzimi(leri) kağıt hamurunun ya da dönüştürülmüş kağıdın veya kağıt

küspesinin ve benzerlerinin işlenmesinde / ön işleme tabi tutulmasında kullanımları yoluyla kağıdın "parlaklığını" arttırmak için kullanılır. Kağıt derecesi arttıkça parlaklık artar; kağıt parlaklığı, optik tarama ekipmanının tarama yeteneğini etkileyebilir bu nedenle buluşun enzimleri, örneğin mürekkep püskürtmeli, lazer ve fotoğraf baskı kalitesinde kağıt dahil olmak üzere optik tarama ekipmanında kullanım için yüksek dereceli, "parlak" kağıt yapmak için kullanılabilir.

Örneğin buluşun enzimleri teknikte bilinen ksilanazları kullanan herhangi bir endüstriyel proseste, örneğin USPN 6,767,728 veya 6,426,200'de açıklandığı gibi atık kağıdın işlenmesi; örneğin USPN 6,623,953'te açıklandığı gibi örneğin gıda endüstrisindeki uygulamalar için odunun kurutulmasında; USPN 6,512,110'da açıklandığı gibi kağıt dereceli bir sert ağaç hamurundan ksiloz üretimi için; fibröz lignoselülozik ham maddenin, örneğin USPN 6,287,708'de açıklandığı gibi bir sulu ortamda bir ksilanaz ile işlenmesi; örneğin USPN 6,254,722'de açıklandığı gibi selülozik elyaftan hamurun çözündürülmesi; USPN 6,241,849 , 5,834,301 veya 5,582,681'de açıklandığı gibi basılı bir kâğıttan mürekkep ve rengin giderilmesi veya odun hamurundan rengin çıkarılması; USPN 5,645,686 veya 5,618,386'da açıklandığı gibi bir ksilanaz kullanılarak bir kimyasal kağıt hamuru veya lignoselüloz hamurunun ağartılması; USPN 5,591,304'de açıklandığı gibi tam olarak yıkanmamış kütükleri içeren odun hamurunun işlenmesi için; örneğin USPN 5,503,709'da açıklandığı gibi atık lignoselülozik bir malzemenin saflaştırılması için; örneğin USPN 5,110,412'de açıklandığı gibi, geri dönüştürülmüş selüloz elyaftan kağıt veya karton üretmek için; USPN 5,103,883'te açıklandığı gibi kütüklerin soyulması için; örneğin USPN 5,068,009'da ve benzerlerinde tarif edildiği gibi geliştirilmiş parçalama özelliklerine sahip olan havlı hamurunun üretilmesi için kullanılabilir. Buluşun ksilanazları, örneğin selülozik malzemeyi, örneğin odun, pamuk, kenevir, keten veya keten liflerini işlemek veya muamele etmek için kullanılabilir.

Buluşun ksilanazı hem klorin dioksit (örneğin aşağıdaki Örnek 6'ya bakınız) gibi bir kimyasal ağartma maddesi ihtiyacının azaltılmasında, hem de yüksek alkali ve yüksek sıcaklıktaki ortamlarda uygulanabilir. Çoğu lignin, hamur hazırlama işleminin pişirme aşamasında çözünür. Artık lignin, beyazlatma işleminde hamurdan çıkarılır. Hamurun ksilanaz ağartması (örneğin buluşun bir enzimi kullanılarak), hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın kısmi hidrolizine dayanır. Enzimatik etki (örneğin buluşun bir enziminin) hemiselüloza bağlı lignini açığa çıkarır ve sonraki ağartma işleminde,

örneğin klor ve oksijen kimyasalları kullanılarak ligninin özütlenmesini artırır. Buluşun ksilanazları, hamurun nihai parlaklığını sabit bir ağartma kimyasalları seviyesinde arttırmak için kullanılabilir. Buluşun ksilanazları, hamurun kappa sayısını azaltmak için kullanılabilir.

- 5 Buluşun bir ksilanazı kullanılarak yapılan odun, odun hamuru, kağıt, kağıt hamuru, kağıt atığı veya ahşap veya kağıt geri dönüşüm muamele işlemlerinde (yöntemleri) muamele süresi (ksilanazın kağıt hamuru, kağıt, odun vb. ile temas ettiği sürenin uzunluğu) ve / veya alıkonma süresi yaklaşık 1 dakika ila 12 saat arasında veya yaklaşık 5 dakika ila 1 saat arasında veya yaklaşık 15 ila 30 dakika arasında olabilir
- 10 veya muamele ve / veya alıkonma süresi yaklaşık 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 saat veya daha uzun bir süre olabilir.

Buluşun ksilanazı bir yönüyle kraft hamurunun % 0,5'den daha az hamur verim kaybı ile klorin dioksit gereksiniminde % 25'ten daha fazla bir azalmayı etkileyebilen bir termostabil alkalın endoksilanaz olabilir. Sınır parametreleri ağırlıkça % 0,001'den

15 daha az bir enzim yüklemesinde pH 10, 65- 85 °C ve 60 dakikadan daha az bir muamele süresi olabilir; alternatif yönlerde muamele ve / veya tutulma süresi yaklaşık 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 veya 12 saatten daha azdır.

Bir ksilanaz havuzu, örneğin pH 10 ve 60 °C'de boya etiketli ksilanın hidroli ze edilmesi için test edilebilir. Bu koşullar altında pozitif olan enzimler daha sonra örneğin pH 10

20 ve 70 °C'de de değerlendirilebilir. Alternatif olarak enzimler 70 °C'de pH 8 ve pH 10'da test edilebilir. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde istenen ksilanazların keşfinde yüksek sıcaklık veya yüksek alkali ortamlarda kütüphaneler hedeflenmiştir. Spesifik olarak bu kütüphaneler alkali pH'da ve yaklaşık 45 °C'lik bir sıcaklıkta çalışan enzimler için taranmıştır. Buluşun ksilanazları lignini serbest bırakmak için lignin- hemiselüloz

25 bağının bozulmasıyla kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde yararlıdır.

Buluşun enzimleri USPN 6,767,728 veya 6,426,200; Neo (1986) J. Wood Chem. Tech. 6(2):147'de açıklandığı gibi gazete gibi basılı atık kağıdın mürekkebinin giderilmesi için veya örneğin kserografik ve lazer baskılı kağıt gibi basılı atık kağıdın ve temaslı ve temassız baskılı atık kağıdın mürekkebinin giderilmesi için de kullanılabilir. Buluşun

30 enzimleri hamurun içinde bulunan ksilanın bir sıvı faza ekstrakte edilmesiyle kağıt dereceli kereste hamurundan elde edilen ksilozun üretilmesi için işlemlerde kullanılabilir, elde edilen sıvı fazda bulunan ksilan ksilanın ksiloza hidrolize edilmesi

için yeterli olan koşullara maruz bırakılır ve ksiloz geri kazanılır, burada ekstraksiyon basamağı, örneğin USPN 6,512,110'da açıklandığı gibi bir ksilanaz enziminin sulu bir süspansiyonu veya bir alkali- çözümlü materyalin en az bir işlemini içerir. Buluşun 5 enzimleri örneğin 6,254,722'de açıklandığı gibi sert odun elyafından yapılmış geri dönüştürülmüş kağıt ürünleri, sert ağaç elyafı ve yumuşak ağaç elyafı, atık kağıdı, örneğin baskısız zarflar, mürekkepsiz zarflar, baskısız kağıttan elde edilen geri dönüştürülmüş kağıt ürünleri gibi selülozik elyaflardan hamurun çözülmesi işlemlerinde kullanılabilir.

Buluşun ksilanazları ayrıca herhangi bir odun, ağaç ürünü, kağıt, kağıt ürünü, kağıt 10 veya odun hamuru, Kraft hamuru veya ahşap veya kağıt geri dönüşüm muamelesi veya endüstriyel işlemlerde, örneğin herhangi bir odun, odun hamuru, kağıt atığı, antimikrobiyal veya mikrobik bir kovucu olarak kağıt veya kağıt hamuru veya ahşap veya kağıt kesme işleminde kullanılabilir. Alternatif olarak buluşun ksilanları bir odun, ağaç ürünü, kağıt, kağıt ürünü, kağıt veya odun hamuru, Kraft hamuru veya geri 15 dönüştürülmüş kağıt bileşiminin bir parçası ve / veya bir veya daha fazla odun, ağaç ürünü, kağıt, kağıt ürünü, kağıt veya odun hamuru, Kraft hamuru veya geri dönüştürülmüş kağıt bileşimleri içeren bir bileşimin parçası olabilir, burada buluştaki ksilanazlar bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal bir itici madde olarak işlev görür.

20 **Elyaf ve tekstil ürünleri**

Elyaf ve kumaşları işlemek için yöntemler, buluşun bir veya daha fazla ksilanazını kullanabilir. Ksilanazlar teknikte iyi bilinen herhangi bir elyaf veya kumaş işleme yönteminde kullanılabilir, bkz. , ör. US Patent No. 6,261,828; 6,077,316; 6,024,766; 6,021,536; 6,017,751; 5,980,581; US Patent Yayını No. 20020142438 AI . Örneğin 25 buluşun ksilanazları elyaf ve / veya kumaşta haşıl sökmede kullanılabilir. Bir kumaşın hissi ve görünümü, kumaşın bir ksilanaz ile bir çözelti içinde temas ettirilmesini içeren bir yöntemle geliştirilebilir. Kumaş basınç altında çözelti ile muamele edilebilir. Örneğin buluşun ksilanazları lekelerin çıkarılmasında kullanılabilir.

Buluşun ksilanazları elyaflar (örneğin pamuk, kenevir veya keten elyafları), dikilmiş ve 30 işlenmemiş kumaşlar, ör. pamuk, pamuk karışımları veya doğal ya da sentetik selülozikler (örneğin odun hamuru gibi ksilan içeren selüloz liflerinden kaynaklanan) ya da bunların harmanlarından yapılan örgüler, dokumalar, denimler, iplikler ve havlular

dahil olmak üzere selülozik herhangi bir materyali işlemek için kullanılabilir. Karışımların örnekleri yün veya sentetik elyaflar (örneğin poliamid elyaflar, akrilik elyaflar, polyester elyaflar, polivinil alkol elyafları, polivinil klorür elyafları, poliviniliden klorür elyafları, poliüretan elyaflar, poliüre elyaflar, aramid elyafları) ve selüloz içeren elyaflar (örneğin suni ipek / viskoz, rami, kenevir, keten / keten, jüt, selüloz asetat elyafları, liyosel) gibi bir veya daha fazla yardımcı malzeme ile pamuk veya suni ipek / viskoz karışımlarıdır.

Buluşun ksilanazlarının kullanıldığı tekstil muamelesi işlemleri, örneğin ovma ve ağartma gibi diğer tekstil işlemleriyle birlikte kullanılabilir. Temizleme selülozik olmayan malzemenin pamuk elyafı, örneğin kütikül (çoğunlukla balmumları içerir) ve birincil hücre çeperinden (esas olarak pektin, protein ve ksiloglukandan oluşan) çıkarılmasıdır. Yüksek bir ıslanabilirlik elde etmek için uygun bir balmumu çıkarma gereklidir. Bu boyama için gereklidir. Primer hücre duvarlarının bu gibi işlemlerle çıkarılması, balmumunu giderir ve daha düzgün bir boyama sağlar. Tekstillerin bu gibi işlemlerle işlenmesi, ağartma işlemindeki beyazlığı arttırabilir. Temizleme işleminde kullanılan ana kimyasal, yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek sıcaklıklarda sodyum hidroksittir. Ağartma tekstilin oksitlenmesini içerir. Ağartma tipik olarak tamamen ağartılmış (beyaz) bir kumaş elde etmek veya boyanın temiz bir gölgesini sağlamak için oksitleyici ajan olarak hidrojen peroksidin kullanılmasını içerir.

Buluş ayrıca alkali ksilanazlar (alkali koşullar altında aktif ksilanazlar) sağlar. Bunlar tekstil işlemede geniş çaplı uygulamalara, bitkisel elyafların (ör. bitki bast elyafları) gamlarının giderilmesine, pektik atıksuların arıtılmasına, kağıt yapımına ve kahve ve çay fermentasyonlarına sahiptir. Bakınız örneğin Hoondal (2002) Applied Microbiology and Biotechnology 59:409- 418.

Buluşun ksilanazları ayrıca antimikrobiyal veya mikrobik bir kovucu olarak herhangi bir lif ve / veya kumaş muamelesi işleminde kullanılabilir. Alternatif olarak buluşun ksilanazları buluşun ksilanazları elyaf ve / veya kumaşta bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak hareket eden bir elyaf ve / veya kumaş bileşiminin bir parçası olabilir.

30 **Deterjan, Dezenfektan ve Temizlik Maddeleri**

Deterjan, dezenfektan veya temizleyici (temizleme veya temizleme) bileşimleri, buluşun bir veya daha fazla polipeptidini (ör. ksilanaz) içerebilir. Deterjan, dezenfektan

veya temizleyici bileşimleri yapma ve kullanma yöntemleri, örneğin US Patent No. 6,413,928; 6,399,561; 6,365,561; 6,380,147 belgelerinde görülür. Deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimler bir ve iki kısımlı sulu bileşim, bir sulu olmayan sıvı bileşim, bir dökme katı, bir granüllü form, bir tanecikli form, bir sıkıştırılmış tablet, bir jel ve / veya bir macun ve bir bulamaç formu olabilir. Buluşun ksilanazları ayrıca bir katı veya sıvı halde bir deterjan, dezenfektan veya temizleyici katkı maddesi ürünü olarak kullanılabilir. Bu gibi ilave ürünler, geleneksel deterjan bileşimlerinin performansını desteklemeyi veya arttırmayı amaçlar ve temizleme işleminin herhangi bir aşamasında eklenebilir.

Gerçek aktif enzim içeriği bir deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimin üretim yöntemine bağlıdır ve deterjan çözeltisinin istenen enzimatik aktiviteye sahip olduğu varsayılarak kritik değildir. Nihai çözeltide bulunan ksilanaz miktarı deterjan bileşiminin gramı başına yaklaşık 0,001 mg ila 0,5 mg arasında değişir. Bu buluşun işleminde ve ürünlerinde kullanılmak üzere seçilen belirli enzim fiziksel ürün formu, kullanım pH'ı, kullanım sıcaklığı ve bozunacak veya değiştirilecek kir tipleri dahil olmak üzere nihai kullanım koşullarına bağlıdır. Enzim herhangi bir kullanım koşulu takımı için optimum aktivite ve stabilite sağlamak için seçilebilir. Bu buluşun ksilanazları yaklaşık 4 ila yaklaşık 12 arasında değişen pH'da ve yaklaşık 20 °C ila yaklaşık 95 °C sıcaklık aralığında aktif olabilir. Deterjanlar katyonik, yarı polar noniyonik veya çift kutuplu yüzey aktif maddeler veya bunların karışımları olabilir.

Buluşun ksilanazları ağırlıkça yaklaşık % 4,0 ila yaklaşık % 5 (tercih edilen şekliyle % 0,1 ila % 0,5) seviyelerinde 4,0 ila 12,0 arasında pH'a sahip olan toz ve sıvı deterjanlara, dezenfektanlara veya temizleyicilere formüle edilebilir. Bu deterjan, dezenfektan ya da temizleyici bileşimler ksilanazlar, selülazlar, lipazlar, esterazlar, proteazlar ya da endoglikozidazlar, endo- beta- 1,4- glukanaazlar, beta- glukanaazlar, endo- beta- 1,3(4) - glukanaazlar, kutinaazlar, peroksidazlar, katalazlar, lakkazlar, amilazlar, glukoamilazlar, pektinaazlar, redüktazlar, oksidazlar, fenoloksidazlar, ligninaazlar, pullulanaazlar, arabinanaazlar, hemiselülazlar, mannanazlar, ksiloglukaazlar, ksilanaazlar, pektin asetil esterazlar, ramnogaalakturonan asetil esterazlar, poligalakturonazlar, ramnogaalakturonazlar, galaktanaazlar, pektin liyazlar, pektin metilesterazlar, selobiyohidrolazlar ve / veya transglütaminaazlar gibi diğer enzimleri de içerebilir. Bu deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimleri ayrıca boyalar, renklendiriciler, koku gidericiler, ağartıcılar, tamponlar, yapılandırıcılar, enzim

"güçlendirici maddeler" (bakınız, örneğin U. S. Patent Başvuru No. 20030096394) ve stabilizanları içerebilir.

Buluşun ksilanazlarının geleneksel temizleme bileşimlerine eklenmesi, herhangi bir özel kullanım sınırlaması oluşturmaz. Başka bir deyişle deterjan için uygun olan herhangi bir sıcaklık ve pH, istenen kullanımda enzimin bu pH ve / veya sıcaklıkta aktif olduğu veya buna tolerans gösterdiği sürece uygundur. Ek olarak buluşun ksilanazları, deterjan içermeyen bir temizleme bileşiminde, yine tek başına veya yapılandırıcılar ve stabilizanlar ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

Bu tür deterjan bileşimlerini içeren temizlik bileşimleri, sert yüzeylerin temizlenmesi için, kumaşların temizlenmesi, bulaşık yıkama bileşimleri, ağız temizleme bileşimleri, protez temizleme bileşimleri ve kontakt lens temizleme solüsyonları için deterjan bileşimleri olarak uygundur.

Buluşun bir ksilanazı bir deterjan, dezenfektan veya temizleyici katkı maddesi olarak dahil edilebilir. Buluşun deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimi, örneğin buluşun bir polipeptitini içeren bir el veya makine çamaşır deterjanı, dezenfektan veya temizleyici bileşim olarak formüle edilebilir. Lekeli kumaşların ön- muamelesi için uygun bir çamaşır katkısı, buluşun bir polipeptitini içerebilir. Bir yumuşatıcı bileşim buluşun bir ksilanazını içerebilir. Alternatif olarak buluşun bir ksilanazı, genel ev sert yüzey temizleme işlemlerinde kullanılmak üzere bir deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşim olarak formüle edilebilir. Alternatif yönlerde buluşun deterjan, dezenfektan veya temizleyici katkı maddeleri ve deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimleri bir ksilanaz, bir lipaz, bir proteaz, bir kütinaz, bir esteraz, bir başka ksilanaz, bir karbohidraz, bir selülaz, bir pektinaz, bir mananaz, bir arabinaz, bir galaktanaz, bir ksilanaz, bir oksidaz, örneğin bir laktaz ve / veya bir peroksidaz (ayrıca bakınız, yukarıda) gibi bir veya daha fazla başka enzim içerebilir. Buluşun enzimlerinin özellikleri seçilen deterjanla (yani pH- optimum, diğer enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenler ile uyumluluk vb.) uyumlu olacak şekilde seçilir ve enzim(ler) etkili miktarlarda bulunur. Bir yönde buluşun ksilanaz enzimleri, kumaşlardan kötü kokulu materyalleri çıkarmak için kullanılır. Buluşu uygulamada kullanılabilen çeşitli deterjan bileşimleri ve bunları yapmak için yöntemler, örneğin U. S. Patent No. 6,333,301; 6,329,333; 6,326,341; 6,297,038; 6,309,871; 6,204,232; 6,197,070; 5,856,164 belgelerinde açıklanmaktadır.

Bir çamaşır makinesi yıkama yönteminde kullanım için uygun bileşimler olarak formüle edildiğinde, buluşun ksilanazları hem bir yüzey aktif madde hem de bir yapılandırıcı bileşiği içerebilir. Ek olarak bir veya daha fazla deterjan bileşeni, örneğin organik polimerik bileşikler, ağartma maddeleri, ek enzimler, köpük baskılayıcılar, dağıtıcılar, 5 kireç sabunu dispersanları, kir süspansiyonu ve yeniden birikmeyi önleyici ajanları ve korozyon inhibitörlerini içerebilir. Çamaşır bileşimleri ayrıca ilave deterjan bileşenleri olarak yumuşatıcı maddeler de içerebilir. Karbohidraz içeren bu tür bileşimler çamaşır deterjanı bileşimleri olarak formüle edildiğinde kumaş temizliği, leke çıkarma, beyazlık bakımı, yumuşatma, renk görünümü, boya transferi engelleme ve sanitizasyon 10 sağlayabilir.

Çamaşır deterjanı, dezenfektan veya temizleyici bileşimlerinin yoğunluğu bileşimin yaklaşık 200 ila 1500 g / litresi veya yaklaşık 400 ila 1200 g / litresi veya yaklaşık 500 ila 950 g / litresi veya 600 ila 800 g / litresi arasında değişebilir, bu yaklaşık 20 °C'de ölçülebilir.

15 Bir yönde çamaşır deterjanı, dezenfektan veya temizleyici bileşimlerin "kompakt" formu en iyi şekilde yoğunluğa ve bileşime göre inorganik dolgu tuzu miktarı ile yansıtılır. İnorganik dolgu tuzları toz halindeki deterjan bileşimlerinin geleneksel bileşenleridir. Geleneksel deterjan bileşimlerinde dolgu tuzları toplam bileşimin ağırlığına göre tipik olarak % 17 ila % 35 oranında önemli miktarlarda bulunur. Dolgu tuzu toplam bileşimin 20 % 15'ini aşmayan veya % 10'u aşmayan veya bileşimin ağırlığının % 5'ini geçmeyen miktarlarda mevcut olabilir. İnorganik dolgu tuzları sülfat ve klorürlerin alkali ve alkali toprak metal tuzları, örneğin sodyum sülfattan seçilebilir.

Sıvı deterjan bileşimleri ayrıca "konsantre formda" da olabilir. Sıvı deterjan, 25 dezenfektan veya temizleyici bileşimler geleneksel sıvı deterjanlara, dezenfektanlara veya temizleyicilere kıyasla daha az miktarda su içerebilir. Veya konsantre sıvı deterjanın su içeriği deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimin ağırlığına göre % 40'tan az veya % 30'dan az veya % 20'den azdır. Buluşun deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşikleri WO 97 / 01629'da tarif edilen formülasyonları içerebilir.

30 Buluşun ksilanazları çeşitli deterjan, temizlik, dezenfektan veya temizleyici bileşimlerin formüle edilmesinde yararlı olabilir. Bilinen birçok bileşik noniyonik, anyonik, katyonik veya çift kutuplu deterjanları içeren uygun yüzey aktif maddelerdir, örneğin U. S. Patent Nos. 4,404,128; 4,261,868; 5,204,015'de tarif edildiği gibi kullanılabilirler. Ek olarak

ksilanazlar, örneğin bar veya sıvı sabun uygulamalarında, bulaşık bakım formülasyonlarında, kontakt lens temizleme solüsyonlarında veya ürünlerinde, peptit hidrolizinde, atık arıtımında, tekstil uygulamalarında, protein üretiminde füzyon-bölünme enzimleri olarak ve benzerlerinde kullanılabilir. Ksilanazlar başka bir deterjan

5 ksilanazı ile karşılaştırıldığında bir deterjan bileşiminde artırılmış bir performans sağlayabilir, yani enzim grubu standart bir yıkama döngüsünden sonra olağan değerlendirmeye belirlenen, çim veya kan gibi belirli enzim duyarlı lekelerin temizlenmesini artırabilir. Ksilanazlar ağırlıkça yaklaşık % 0,01 ila yaklaşık % 5 (örneğin yaklaşık % 0,1 ila % 0,5) seviyelerinde, 6,5 ve 12,0 arasında pH'a sahip

10 bilinen toz haline getirilmiş ve sıvı deterjanlara formüle edilebilir. Bu deterjan temizleme bileşimleri bilinen ksilanazlar, ksilanazlar, proteazlar, amilazlar, selülazlar, mannanazlar, lipazlar veya endoglikozidazlar, katalazlar ve lakkazlar gibi redoks enzimleri, ayrıca yapılandırıcılar, stabilizanlar, kokular ve pigmentler gibi başka enzimleri de içerebilir.

15 Ksilanaz aktivitesine sahip deterjan, dezenfektan veya temizleyici bileşimler meyve, sebze ve / veya çamur ve kil bileşikleriyle kullanım için buluşun bir ksilanazını içerebilir (bakınız, örneğin US Pat. No. 5,786,316).

Buluşun bir başka yönünde buluşun ksilanazları herhangi bir deterjan, dezenfektan veya temizleyici (temizleme solüsyonu) imalat işleminde de kullanılabilir ki burada

20 ksilanaz bir antimikrobiyal veya mikrobiyal bir itici olarak kullanılır. Alternatif olarak buluşun ksilanazları, ksilanazın bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak kullanıldığı herhangi bir temizleme veya yıkama işleminde kullanılabilir. Buluşun ksilanazı herhangi bir deterjan veya temizleyici bileşime dahil edilebilir ki burada buluşun ksilanazları bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak işlev görür.

25 **Gıdaların muameleden geçmesi ve gıda işleme**

Buluşun ksilanazları gıda işleme endüstrisinde çok sayıda uygulamaya sahiptir. Örneğin buluşun ksilanazları yağ bakımından zengin bitkisel materyalden, örneğin yağ bakımından zengin tohumlardan yağın örneğin soya fasulyesinden soya fasulyesi yağı, zeytinlerden zeytinyağı, kolza tohumundan kolza tohumu yağı ve / veya ayçiçeği

30 çekirdeğinden ayçiçek yağının ekstraksiyonunun iyileştirilmesi için kullanılır.

Buluşun ksilanazları bitki hücre materyallerinin bileşenlerinin ayrılması için kullanılabilir. Örneğin buluşun ksilanazları ksilan bakımından zengin materyalin

(örneğin bitki hücreleri) bileşenlere ayrılmasında kullanılabilir. Bir yönüyle buluşun ksilanazları ksilan bakımından zengin veya yağ bakımından zengin mahsulleri değerli protein ve yağ ve gövde fraksiyonlarına ayırmak için kullanılabilir. Ayırma işlemi teknikte bilinen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir.

- 5 Buluşun ksilanazları verimi arttırmak için meyve veya sebze suları, şurupları, ekstraları ve benzerlerinin hazırlanmasında kullanılabilir. Buluşun ksilanazları çeşitli bitki hücresi duvar türevli materyallerin veya atık malzemelerin, örneğin mısır gevreği, tahıl, şarap veya meyve suyu üretiminin veya tarımsal kalıntıların, örneğin sebze kabukları, fasulye kabukları, şeker pancarı küspesi, zeytin küspesi, patates küspesi ve benzerleri gibi
- 10 tarımsal kalıntıların enzimatik olarak muamele edilmesinde (örneğin ksilan içeren bitki materyallerinin hidrolizi) kullanılabilir. Buluşun ksilanazları işlenmiş meyve veya sebzelerin kıvamını ve görünümünü değiştirmek için kullanılabilir. Buluşun ksilanazları, bitki materyallerinin işlenmesini kolaylaştırmak için bitki materyallerini işlemek, bitki bileşenlerinin saflaştırılmasını veya ekstraksiyonunu kolaylaştırmak için kullanılabilir.
- 15 Buluşun ksilanazları besleme değerini arttırmak, su bağlama kapasitesini azaltmak, atık su bitkilerinde parçalanabilirliği geliştirmek ve / veya bitki materyalinin ensilaja dönüşümünü geliştirmek ve benzerleri için kullanılabilir.

Buluşun ksilanazları arabinoksilanlar gibi ksilanları hidrolize etmek için örneğin kurabiye ve kraker gibi pişirme uygulamalarında kullanılabilir. Buluşun ksilanazları

20 makinede işlenmesi zor olmayan yapışkan olmayan hamurlar oluşturmak için ve bisküvi boyutunu azaltmak için kullanılabilir. Buluşun ksilanazları fırınlanmış ürünün gevreklik kaybına ve raf ömrünün azalmasına neden olan hızlı yeniden hidrasyonunu engellemek için arabinoksilanları hidrolize etmek için kullanılabilir. Buluşun ksilanazları hamur işlemede katkı maddesi olarak kullanılır. Buluşun ksilanazları hamur

25 koşullandırmada kullanılır ki burada ksilanazlar yaklaşık 25- 35 °C'lik bir sıcaklık aralığında ve nötrale yakın pH'ta (7,0 - 7,5) yüksek aktiviteye sahiptir. Hamur koşullandırma enzimleri aşırı pişirme sıcaklıklarında (> 500 ° F) inaktive edilebilir. Buluşun enzimleri, örneğin U. S. Patent Başvuru No. 20050281916'da olduğu gibi herhangi bir hamur işleme protokolüyle birlikte kullanılabilir.

30 Buluşun ksilanazları hamurun pH'si ve sıcaklık koşulları altında hamur işlemeyi optimal olarak gerçekleştirmek için katkı maddesi olarak kullanılır. Buluşun bir enzimi hamurun yumuşatılması için kullanılabilir. Buluşun bir ksilanazı 25- 35 °C'lik bir sıcaklık

aralığında ve yaklaşık nötr pH'ta (7,0 - 7,5) yüksek aktiviteye sahiptir. Enzim fırının aşırı sıcaklıklarında örneğin 500 °F'da etkisiz hale getirilebilir.

Buluşun ksilanazları, ksilanazın antimikrobiyal veya mikrobiyal bir kovucu olarak kullanıldığı herhangi bir yiyecek veya içecek muamelesinde veya yiyecek veya içecek işleminde de kullanılabilir. Buluşun ksilanazı herhangi bir gıda veya içecek bileşimine dahil edilebilir ki burada buluşun ksilanazları bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak işlev görür.

Hayvan yemleri ve gıda veya yem veya gıda katkı maddeleri (takviyeler)

Hayvan yemlerinin ve gıdaların ve gıda veya yem katkı maddelerinin (takviyelerin) muamele edilmesine yönelik usuller, buluşun ksilanazlarını, memelileri (ör. insanları), kuşları, balıkları ve benzerlerini içeren hayvanları kullanır. Buluşun ksilanazlarının kullanılmasıyla hayvan yemleri, gıdalar ve katkı maddelerinin muamele edilmesi, hayvan yemi veya katkı maddesinde (ek maddeler), örneğin nişasta, protein ve benzeri gibi besin maddelerinin mevcudiyetinde yardımcı olabilir. Sindirilmesi zor proteinlerin parçalanması ya da dolaylı ya da doğrudan nişastanın (ya da diğer besinler) ortaya çıkarılmasıyla (unmasking), ksilanaz besinleri diğer endojen veya eksojen enzimler için daha erişilebilir hale getirir. Ksilanaz ayrıca kolayca sindirilebilir ve kolayca emilen besin ve şekerlerin serbest kalmasına neden olabilir.

Hayvan yemine ilave edildiğinde buluşun ksilanazları, kısmen bağırsak viskozitesinin azalmasından dolayı bitki hücreci duvar malzemesinin in vivo yıkımını geliştirir (bakınız örneğin, Bedford vd. , Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition, 1993, sayfa 73- 77), bu sayede hayvan tarafından bitki besin maddelerinin daha iyi bir şekilde kullanılması sağlanır. Böylelikle buluşun ksilanazlarının beslenmesinde, hayvanın büyüme hızı ve / veya besleme dönüşümü oranı (yani yutulan yemin ağırlık kazancına göre ağırlığı) geliştirilmektedir.

Hayvan yemi katkı maddesi yem bileşenleri ile kolayca karıştırılabilen granül bir enzim ürünü olabilir. Alternatif olarak yem katkı maddeleri bir ön karışımın bir bileşenini oluşturabilir. Granüllü enzim ürünü kaplanabilir veya kaplanmamış olabilir. Enzim granüllerinin parçacık boyutu yem ve ön- karıştırma bileşenlerinininkine uyumlu olabilir. Bu, enzimleri yemlere dahil etmenin güvenli ve uygun bir yolunu sağlar. Alternatif olarak hayvan yemi katkı maddesi stabilize bir sıvı bileşim olabilir. Bu, sulu veya yağ bazlı bir bulamaç olabilir. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 6,245,546.

Mevcut buluşun ksilanazları hayvan yemi veya bir gıda maddesinin modifikasyonunda, gıda veya yemleri in vitro olarak (yem veya gıda bileşenlerini değiştirerek) veya in vivo olarak işleyebilir. Ksilanazlar yüksek miktarda ksilan içeren hayvan yemi veya gıda bileşimlerine eklenebilir, örneğin gevrekler, tahıllar ve benzerlerinden gelen bitki maddesi içeren gıda veya yemler. Yeme veya gıdaya eklendiğinde ksilanaz, ksilan içeren materyalin, örneğin bitki hücre duvarlarının in vivo yıkımını önemli ölçüde geliştirir, böylece bitki besin maddelerinin hayvan tarafından (örneğin insan) daha iyi bir şekilde kullanılması sağlanır. Hayvanın büyüme hızı ve / veya besleme dönüşümü oranı (yani yutulan yemin ağırlık artışına göre ağırlığı) geliştirilebilir. Örneğin kısmen ya da sindirilemeyen ksilan içeren bir protein, buluşun bir ksilanazıyla, örneğin peptitler ve galaktoz ve / veya galaktooligomerlere örneğin beta- galaktosidaz gibi başka bir enzimle kombinasyon halinde tamamen ya da kısmen ayrıştırılır. Bu enzim sindirim ürünleri hayvan tarafından daha sindirilebilir. Böylece buluşun ksilanazları beslemenin veya yiyeceğin mevcut enerjisine katkıda bulunabilir. Aynı zamanda ksilan içeren proteinlerin bozunmasına katkıda bulunarak, buluşun bir ksilanazı, karbonhidrat ve karbonhidrat olmayan besin veya protein, yağ ve mineraller gibi gıda bileşenlerinin sindirilebilirliğini ve alımını arttırabilir.

Buluşun ksilanazı enzimleri doğrudan gevrekler, tahıllar, mısır, soya fasulyesi, kolza tohumu, lupin ve benzerleri gibi transgenik yem mahsullerinde (örneğin transgenik bitkiler, tohumlar ve benzerleri gibi) eksprese etmek suretiyle sağlanabilir. Yukarıda tartışıldığı gibi buluş, buluşun bir polipeptidini kodlayan bir nükleik asit sekansı içeren transgenik bitkiler, bitki kısımları ve bitki hücreleri sağlar. Nükleik asit buluşun ksilanazı geri kazanılabilir miktarlarda üretilecek şekilde eksprese edilebilir. Ksilanaz herhangi bir bitki veya bitki parçasından geri kazanılabilir. Alternatif olarak rekombinant polipeptidi içeren bitki veya bitki kısmı, örneğin besin değeri, lezzetlilik ve reolojik özellikleri iyileştirmek veya antibesinsel bir faktörü yok etmek gibi bir gıda veya yem kalitesini iyileştirmek için kullanılabilir.

Bir hayvan denek tarafından tüketilmeden önce yemden oligosakkaritlerin çıkarılmasına yönelik usuller, buluşun bir ksilanazını kullanabilir. Bu işlemde metabolize edilebilir enerji değerinin arttırıldığı bir yem oluşur. Buluşun ksilanazlarına ek olarak galaktosidazlar, selülozlar ve bunların kombinasyonları da kullanılabilir. Enzim yem malzemesinin ağırlıkça yaklaşık % 0,1 ila % 1'ine eşit bir miktarda

eklenebilir. Yem bir gevrek, bir buğday, bir tahıl, bir soya fasulyesi (örneğin bir yer soya fasülyesi) malzemesi olabilir. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 6,399,123.

5 Ksilanaz, buluşun bir sekansının en az otuz bitişik amino asidini içeren bir rekombinant ksilanaz enzimini içeren bir besin takviyesinin hazırlanmasıyla ve hayvan tarafından yutulan gıdada bulunan ksilanın kullanımını artırmak için bu besin takviyesinin bir hayvana uygulanmasıyla hayvanların diyetlerinde bir besin takviyesi olarak kullanılabilir.

Bir yenilebilir peletlenmiş enzim iletim matrisi, bir besin takviyesi olarak kullanılabilir. Enzim iletim matrisi, örneğin bir hayvanın sindirim sıvısı gibi sulu ortamlarda buluşun
10 bir amino asit dizisine sahip olan bir ksilanaz enzimini veya bunun en az 30 bitişik amino asidini serbest bırakır. Enzim iletim matrisi rekombinant enzimi kolayca dağıtan yağlı çıkarılan tahıl tohumu, saman, alfalfa, timoti, soya gövdesi, ayçiçeği tohumu kuspesi, buğday unu ve benzerleri gibi bileşenlerden seçilen granüllü bir yenilebilir taşıyıcıdan hazırlanır, taşıyıcı burada bulunan rekombinant enzimi kolayca sulu ortam
15 içinde dağıtır. Kullanımda, yenilebilir peletlenmiş enzim iletim matrisi ksilanaz vermek üzere bir hayvana uygulanır. Uygun tahıl bazlı substratlar buğday, mısır, soya, sorgum, alfalfa, arpa ve benzerleri gibi herhangi bir uygun yenilebilir tahıldan oluşabilir veya bunlardan türetilebilir. Örnek bir tahıl bazlı substrat, mısır bazlı bir substrattır. Substrat tahılın herhangi bir uygun kısmından türetilebilir, ancak tercih edilen şekliyle ıslak veya
20 kuru öğütme işleminde elde edilen mısır tohumu gibi hayvan yemi kullanımı için onaylanmış bir tahıl tohumudur. Tahıl tohumu tercih edilen şekliyle, presleme veya heksan veya diğer çözücü ekstraksiyonu yoluyla yağın çıkarıldığı tahıl tohumu olan zayıf tohumu içerir. Alternatif olarak tahıl tohumu ekspeller ekstraksiyona tabi tutulur, yani presleme ile yağlı çıkarılır.

25 Enzim iletim matrisi ayrı çoğul parçacıklar, peletler veya granüller formundadır. "Granüller" terimi ile örneğin peletleme, ekstrüzyon ya da matrisden suyun çıkarılması için benzer kompaktlama işlemi gibi yollarla sıkıştırılmış ya da kompakt hale getirilmiş parçacıklar ifade edilir. Parçacıkların bu şekilde sıkıştırılması veya kompakt hale getirilmesi parçacıkların birbirine yapışmasını da teşvik eder. Örneğin granüller, tahıl
30 bazlı substratı bir pelet değirmeninde pelet haline getirerek hazırlanabilir. Bu şekilde hazırlanan peletler, hayvan beslemesinde bir yardımcı madde olarak kullanılmak üzere uygun bir granül boyutuna öğütülür veya parçalanır. Matrisin kendisi hayvan yeminde

kullanılmak üzere onaylandığından, hayvan yemlerinde enzimlerin iletilmesi için bir seyreltici olarak kullanılabilir.

Enzim iletim matrisi yaklaşık 4 ila yaklaşık 400 mesh (USS) arasında değişen, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık 8 ila yaklaşık 80 mesh ve en çok tercih edilen şekliyle yaklaşık 14 ila yaklaşık 20 mesh arasında değişen bir granül boyutuna sahip granüller formunda olabilir. Tahıl tohumu çözücü ekstraksiyonu yoluyla zayıflatılırsa, peletleyicide mısır yağı gibi bir kayganlaştırıcı maddenin kullanılması gerekli olabilir fakat bu tür bir kayganlaştırıcı madde tohum ekspeller ekstraksiyona tabi tutulursa, normalde gerekli değildir. Matris, örneğin tahıl bazlı substratın bir kalıptan ekstrüzyonu ve ekstrüdatın uygun bir granül büyüklüğüne öğütülmesi gibi diğer sıkıştırma veya kompakt hale getirme işlemiyle hazırlanabilir.

Enzim iletim matrisi ayrıca matris granüllerinin yapışkanlığını arttırmak için bir birleştirici madde olarak bir polisakkarit bileşeni içerebilir. Yapıştırıcı maddenin matris granül içindeki tahıl proteinleri arasındaki bağı güçlendiren ek hidroksil grupları sağladığına inanılmaktadır. Ayrıca ek hidroksil gruplarının proteinlerin nişasta ve diğer proteinlere hidrojen bağlanmasını artırarak işlev gördüklerine inanılmaktadır. Yapıştırıcı ajan enzim iletim matrisinin granüllerinin yapışkanlığını arttırmak için uygun herhangi bir miktarda mevcut olabilir. Uygun yapışkanlık ajanları arasında bir veya daha fazla dekstrin, maltodekstrin, nişasta, örneğin mısır nişastası, unlar, selülozik maddeler, hemiselülozik maddeler ve benzerleri bulunur. Örneğin matriste (enzimi içermeyen) tahıl tohumu ve yapışkan madde yüzdesi, % 78 mısır tohumu unu ve ağırlıkça % 20 mısır nişastasıdır.

Enzim salgılama matrisi biyo- bozunur malzemelerden yapıldığından ve nem içerdiğinden matris örneğin kalıplama ile bozulmaya maruz kalabilir. Bu tür kalıplamayı önlemek ya da engellemek için matris, bir enzim salma matrisinin kalıplanmasını engellemek için yeterli bir miktarda mevcut olabilecek bir propiyonat tuzu gibi bir kalıp inhibitörünü içerebilir, böylece stabil bir formülasyonda soğutma gerektirmeyen bir iletim matrisi sağlar.

Enzim iletim matrisinde bulunan ksilanaz enzimi, tercih edilen şekliyle burada anlatıldığı gibi termostabil bir ksilanazdır, böylece peletleştirilmiş enzim iletim matrisini hazırlamak için yüksek sıcaklık ve / veya buharın kullanılabileceği imalat sırasında ksilanazın inaktivasyonuna direnir. Buluşun enzim iletim matrisini içeren yemlerin

sindirimi sırasında, sulu sindirim sıvıları aktif enzimin salınmasına neden olacaktır. Termostabil olan diğer tipte termostabil enzimler ve besin takviyeleri de herhangi bir sulu koşul altında salım için dağıtım matrisine dahil edilebilir.

Hayvan yemi takviyeleri ve enzimlerin mide rahatsızlıklarında ve benzerlerinde salımını geciktirmek için hayvan yemine bir tat veya besin takviyesi eklemek gibi bir çok farklı amaç için enzim matris partiküllerine bir kaplama uygulanabilir. Veya kaplama, örneğin enzimin matris parçacıklarından yavaş salınmasının veya enzimin serbest bırakılacağı koşulların kontrol altına alınmasının istendiği durumlarda, fonksiyonel bir hedefe ulaşmak için uygulanabilir. Kaplama malzemesinin bileşimi, duyarlı olduğu bir madde (ısı, asit veya baz, enzimler veya diğer kimyasallar gibi) tarafından seçici olarak parçalanacak şekilde olabilir. Alternatif olarak bu tür bozulma ajanlarına duyarlı iki veya daha fazla kaplama, matris parçacıklarına ardışık olarak uygulanabilir.

Bir enzim açığa çıkaran matrisin hazırlanmasına yönelik bir işlem, tahıl bazlı bir substratın ayrı çoğul partiküllerini bir enzim- salımlı matris olarak kullanım için uygun bir partikül boyutunda temin etmeyi içerir, burada parçacıklar buluşun bir amino asit sekansı tarafından kodlanan bir ksilanaz enzimini veya bunların en az 30 ardışık amino asidini içerir. Tercih edilen şekliyle işlem enzim salgılama matrisinin partiküllerinin granül haline getirilmesini veya sıkıştırılmasını içerir, bu da peletleme ile gerçekleştirilebilir. Kullanıldığı zaman kalıp inhibitörü ve yapışkan madde, uygun herhangi bir zamanda eklenebilir ve tahıl bazlı substratın peletlenmesinden önce istenen oranlarda tahıl bazlı substrat ile karıştırılabilir. Pelet değirmeni beslemesindeki nem içeriği, bitmiş ürünlerdeki nem içeriğine göre yukarıda belirtilen aralıklarda olabilir ve yaklaşık % 14- 15 olabilir. Besleme stoğunu bu nem içeriğine getirmek için ham maddeye enzimin sulu bir preparasyonu şeklinde nem ilave edilebilir. Pelet değirmenindeki sıcaklık buharla yaklaşık 82 °C'ye getirilebilir. Pelet değirmeni peletlerin sağlanması için besleme stoğuna yeterli çalışma veren herhangi bir koşul altında çalıştırılabilir. Peletleme prosesi suyu enzim içeren bileşimden uzaklaştırmak için uygun maliyetli bir prosestir.

Pelet değirmeni peletleri vermek üzere 100 lb / dak'da 82 °C basınçta 1/8 inç 2 inç kalıpla çalıştırılabilir ki bunlar daha sonra bir pelet değirmeni öğütücüsü içinde 8 mesh'lik elek içinden geçebilen ancak 20 mesh'lik bir elek üzerinde tutulabilen bir parçacık boyutuna sahip olan ayrı çok sayıda parçacığı temin etmek üzere ufalanır.

Buluşun termostabil ksilanazları, bu tür pelletlerde kullanılabilir. Yüksek optimum sıcaklıklara ve yüksek ısı direncine sahip olabilirler, öyle ki şimdiye kadar yapılmayan bir sıcaklıkta bir enzim reaksiyonu elde edilebilir. Mevcut buluşa göre olan ksilanazı kodlayan gen (ör. buluştaki sekansların herhangi birinde belirtildiği gibi), buluşun 5 ksilanazlarından farklı özelliklere (optimum pH, optimum sıcaklık, ısı direnci, çözücülere karşı stabilite, spesifik aktivite, substrat için afinite, salgılama yeteneği, translasyon oranı, transkripsiyon kontrolü ve benzerleri) sahip olan ksilanazların hazırlanmasında (örneğin burada tarif edilen GSSM kullanılarak) kullanılabilir. Ayrıca buluşun bir polinükleotidi, geliştirilmiş veya modifiye edilmiş termostabilite veya 10 termotolerans gibi istenen bir aktiviteye sahip olanları belirlemek için burada tarif edilen yöntemlerle hazırlanan varyant ksilanazların taranması için kullanılabilir. Örneğin US Patenti No. 5,830,732, bir ksilanazın termotoleransını belirlemek için bir tarama analizini açıklar.

Buluşun ksilanazları ayrıca herhangi bir hayvan yemi, hayvansal gıda veya yem katkı 15 maddesi üretim işleminde kullanılabilir ki burada ksilanaz bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak kullanılır. Buluşun ksilanazı herhangi bir hayvan yemi, hayvansal gıda veya yem katkı maddesi bileşimine dahil edilebilir, burada buluşun ksilanazları bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak hareket eder.

Atık arıtma

20 Buluşun ksilanazları, örneğin atık işlemlerinde, çeşitli başka endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir. Örneğin bir katı atık sindirim prosesi, buluşun ksilanazlarını kullanır. Yöntemler büyük ölçüde işlenmemiş katı atık kütlelerinin ve hacminin azaltılmasını içerebilir. Katı atık kontrollü bir sıcaklıkta enzimatik bir çözelti (buluşa ait ksilanazlar dahil) mevcudiyetinde bir enzimatik sindirim işlemi ile muamele edilebilir. Bu, eklenen 25 mikroorganizmalardan kayda değer bakteri fermantasyonu olmaksızın bir reaksiyona neden olur. Katı atık sıvılaştırılmış bir atık ve herhangi bir kalıntı katı atığa dönüştürülür. Elde edilen sıvılaştırılmış atık bahsedilen herhangi bir artık katılaştırılmış atıktan ayrılabilir. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 5,709,796.

Buluşun ksilanazları aynı zamanda herhangi bir atık muamele işleminde de 30 kullanılabilir ki burada ksilanaz antimikrobiyal veya mikrobiyal bir itici olarak kullanılır. Buluşun ksilanazı herhangi bir atık muamele bileşimine dahil edilebilir ki burada buluşun ksilanazları bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak işlev görür.

Ağız bakım ürünleri

Ağız bakım ürünü buluşun enzim karışımları veya "kokteylleri" dahil olmak üzere buluşun ksilanazlarını içerebilir. Örnek oral bakım ürünleri arasında diş macunları, diş kremleri, jeller veya diş tozları, odontikler, gargaralar, fırçalama öncesi veya 5 sonrasında durulama formülasyonları, çiğneme sakızları, pastiller veya şeker bulunur. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 6,264,925.

Buluşa ait enzim karışımları veya "kokteylleri" de dahil olmak üzere buluşun ksilanazları herhangi bir ağız bakım üretim işleminde de kullanılabilir, buradaki ksilanaz bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak kullanılır. Buluşun enzim karışımları veya 10 "kokteylleri" de dahil olmak üzere buluşun ksilanazı herhangi bir ağız bakım bileşimine dahil edilebilir, burada buluşun ksilanazları bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal bir itici madde olarak hareket eder.

Mayalama ve fermantasyon

Bira mayalama yöntemleri (örneğin fermente etme) buluşun enzim karışımları veya 15 "kokteylleri" dahil olmak üzere buluşun ksilanazlarını içerebilir. Bir işlemde nişasta içeren hammaddeler parçalanır ve bir malt oluşturmak üzere işlenir. Buluşun bir ksilanazı fermantasyon işleminin herhangi bir noktasında kullanılır. Örneğin buluşun ksilanazları arpa maltının işlenmesinde kullanılabilir. Bira mayalama ana hammaddesi arpa malttır. Bu üç aşamalı bir süreç olabilir. Birincisi arpa tahılları su içeriğini arttırmak 20 için örneğin % 40 civarına kadar suda bırakılabilir. İkinci olarak enzim sentezi gibberellinlerin kontrolü altında uyarıldığında tahıl 3 ila 6 gün süreyle 15 ila 25 °C'de inkübasyon ile çimlenebilir. Bir yönde buluşun ksilanazları işlemin bu (veya herhangi bir başka) aşamasında eklenir. Buluşun ksilanazları, örneğin U.S. Patent No. 5,762,991; 5,536,650; 5,405,624; 5,021,246; 4,788,066'da tarif edildiği gibi herhangi 25 bir bira veya alkollü içecek üretme işleminde kullanılabilir.

Buluşun bir enzimi filtrelenebilirliği ve wort viskozitesini geliştirmek ve endosperm bileşenlerinin tam bir hidrolizini elde etmek için kullanılabilir. Buluşa ait bir enzimin kullanılması aynı zamanda ekstrakt verimini de artıracaktır. Mayalama işlemi, arpa tohumu (maltlama) çimlenmesini ve ardından maya tarafından alkolik fermantasyon 30 için kullanılan basit şekerler elde etmek için ekstraksiyon ve depolanmış karbonhidratların parçalanmasını içerir. Arpa endospermde ve mayalama yardımcı

maddelerinde mevcut olan karbonhidrat rezervlerinin verimli bir şekilde parçalanması birkaç farklı enzimin aktivitesini gerektirir.

5 Buluşa ait bir enzim, örneğin 95 °C'de inaktivasyon ile birlikte 40 °C ila 70 °C sıcaklık aralığında hafif asidik pH (ör. 5,5- 6,0) içinde aktiviteye sahip olabilir. Bu koşullar altındaki aktivite optimal olacaktır ancak etkinlik için gerekli bir şart değildir. Buluşa ait bir enzim 40- 75 °C ve pH 5,5- 6,0 arasında aktiviteye sahip olabilir; en az 50 dakika 70 °C'de stabildir ve 96- 100 °C'de inaktive edilir . Buluşun enzimleri diğer enzimlerle, örneğin beta- 1,4- endoglukanazlar ve amilazlar ile kullanılabilir.

10 Buluşun enzim karışımları veya "kokteylleri" de dahil olmak üzere buluşun ksilanazları herhangi bir mayalama veya fermentasyon işleminde de kullanılabilir ki burada ksilanaz bir antimikrobiyal veya mikrobiyal bir itici olarak kullanılır. Buluşun ksilanazı herhangi bir mayalanmış veya fermente olmuş bileşime dahil edilebilir ki burada buluşun ksilanazları bileşimde bir antimikrobiyal veya mikrobiyal itici olarak işlev görür.

Biyokütle dönüşümü ve biyoyakıt üretimi

15 Biyokütle dönüşümü, örneğin biyoetanol, biyometanol, biyopropanol ve / veya biyobutanol ve benzerleri gibi bir biyoyakıt dönüştürmeye yönelik usuller ve işlemler, buluşun enzim karışımları veya "kokteylleri" dahil olmak üzere buluşun enzimlerini kullanır. Bu şekilde üretilen yakıt, isteğe bağlı olarak patates, soya fasulyesi (kolza), arpa, çavdar, mısır, yulaf, buğday, pancar veya şeker kamışı içeren bir bitki 20 materyalinden türetilir ve isteğe bağlı olarak yakıt bir biyoetanol veya bir benzin-etanol karışımı içerir.

25 Yakıt üretme yöntemleri, buluşun bir polipeptiti ile bir ksilan, hemiselüloz, selüloz veya bir mayalanabilir şeker veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptiti veya buluşun karışımlarını veya "kokteyllerini" içeren bir bileşimin temas ettirilmesini içerir. Bir ksilan, hemiselüloz, bir selüloz veya bir mayalanabilir şeker içeren bileşim bir bitki, bitki ürünü veya bitki türevi içerir ve bitki veya bitki ürünü şeker kamışı bitkileri veya bitki ürünleri, pancar veya şeker pancarı, buğday, mısır, soya fasulyesi, patates, pirinç veya arpa içerebilir. Polipeptit iç β- 1,4- ksilosidik bağların veya endo- β- 1,4- 30 glukanaz bağlarının hidrolizini katalize eden ve / veya bir doğrusal polisakkarit beta- 1,4- ksilanı ksiloza ayrıştıran aktiviteye sahip olabilir. Yakıt bir biyoetanol veya bir benzin- etanol karışımı veya bir biyopropanol veya bir benzin- propanol karışımı veya

bir biyobutanol veya bir benzin- butanol karışımı veya bir biyometanol veya bir benzin- metanol karışımı veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerebilir.

5 Biyoetanol, biyo- butanol, biyometanol ve / veya bir biyopropanol üretme yöntemleri, buluşun bir polipeptiti ile bir ksilan, hemi- selüloz, selüloz veya bir mayalanabilir şeker içeren bir bileşimin veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptitin veya buluşun karışımlarından veya "kokteyllerinden" herhangi birinin temas ettirilmesini içerir. Bir selüloz veya bir mayalanabilir şeker içeren bileşim bir bitki, bitki ürünü veya bitki türevi içerebilir ve bitki veya bitki ürünü şeker kamışı bitkileri veya bitki ürünleri, pancar veya şeker pancarı, buğday, mısır, soya fasulyesi, patates, pirinç veya arpa içerebilir.

10 Buluş selülozik ve hemiselülozik polimerlerin buluşun bir polipeptitini içeren metabolize edilebilir karbon gruplarına veya buluşun bir nükleik asidi tarafından kodlanan bir polipeptite depolimerizasyonu için enzim toplulukları veya "kokteyl" sağlar. Alternatif düzenlemelerde polipeptit iç y- 1,4- ksilosidik bağların veya endo- p- 1,4- glukanağ bağlarının hidrolizini katalize eden ve / veya bir doğrusal polisakkarit beta- 1,4- ksilanı ksiloza ayrıştıran aktiviteye sahiptir. Buluşa ait enzim toplulukları veya "kokteylleri", bir bileşim (örneğin bir formülasyon, sıvı veya katı) formunda olabilir.

20 Buluş hemiselüloz ve selüloz- hidrolize edici enzimlerin bir karışımını (veya "kokteyli") içeren bileşimleri (üretim ürünleri, enzim toplulukları veya "kokteyller" dahil) içerir, burada ksilan- hidrolize edici enzimler buluşun ksilanazının en az birini ve en az bir, bir kaç veya bütün selülaz, glukanağ, bir selobiohidrolaz ve / veya bir p- glukosidazı içerir. Alternatif düzenlemelerde buluşun ksilan- hidroliz ve / veya hemiselüloz- hidrolize edici karışımları, buluşun bir ksilanazının en az birini ve bir p- ksilosidaz ve / veya bir arabinofuranosidazın en azından birini veya her ikisini de içerir.

25 Buluş ksilan hidrolize edici, hemiselüloz ve selüloz- hidrolize edici enzimlerin bir karışımını (veya "kokteyli") içeren bileşimleri (üretim ürünleri, enzim toplulukları veya "kokteyller" dahil) içerir, karışım en az bir, bir kaç veya bütün bir selülaz, bir glukanağ, bir selobiohidrolaz ve / veya bir arabinofuranosidaz ve bu buluşun bir ksilanazını içerir.

30 Buluş ksilan hidrolize edici, hemiselüloz ve selüloz- hidrolize edici enzimlerin bir karışımını (veya "kokteyli") içeren bileşimleri (üretim ürünleri, enzim toplulukları veya "kokteyller" dahil) içerir, karışım en az bir, bir kaç veya bütün bir selülaz, bir glukanağ,

bir selobiohidrolaz, bir arabinofuranosidaz, bir ksilanaz, bir β -glukosidaz, bir β -ksilosidaz ve buluşun en az bir enzimini içerir.

Buluş buluşa ait en az bir enzime ilave olarak, enzimlerin karışımını (veya "kokteyli") içeren bileşimleri (üretim ürünleri, enzim toplulukları veya "kokteyller" dahil) içerir: (1) daha kısa glukooligosakkaritlerle sonuçlanan iç β -1,4 bağlantılarını bölen bir glukanaaz, (2) sellobiyoz birimlerini (β -1,4 glikoz - glikoz disakkarit) etkin bir şekilde salarak "ekzo" bir şekilde etkileyen bir selobiohidrolaz; veya (3) glikoz monomeri kısa selooligosakkaritlerden (örneğin sellobiyoz) serbest bırakmak için bir β -glukozidaz.

Biyokütle dönüşümü ve temiz biyo yakıtların üretimi

10 Bileşimler ve işlemler bir biyokütlenin veya herhangi bir organik materyalin, örneğin herhangi bir ksilan içeren veya lignoselülozik malzemenin (örneğin bir ksilan, selüloz, hemiselüloz ve / veya lignin içeren herhangi bileşim) yemler, gıdalar, gıda veya yem takviyeleri (katkı maddeleri), ilaçlar ve kimyasallara ek olarak biyodizeller de dahil olmak üzere bir biyoyakıt (örneğin biyoetanol, biyobutanol, biyometanol ve / veya bir biyopropanol) dönüştürülmesi için mevcut buluşun enzimlerinin karışımları veya 15 buluşun enzimlerinin "kokteyllerini" de içeren buluşun enzimlerini kullanır. Bu gibi bileşimler ve yöntemler petrol bazlı ürünlerin, örneğin biyoyakıt (ör. biyoetanol, biyobütanol, biyometanol ve / veya bir biyopropanol) ve benzin ve / veya dizel yakıtın bir karışımı olarak kullanımında etkili ve sürdürülebilir alternatifler veya ek maddeler 20 sağlar.

Buluş, doğal biyokütle (örneğin bitki) dönüşümünü içeren kimyasal döngülere katılım için buluşa ait enzimleri eksprese eden hücreler ve / veya organizmalar (ör. burada hücreler veya organizmalar bu buluşun bir sekansı olarak heterolog nükleik asitler içerir) sağlar. Enzimler ve dönüşüm için yöntemler ksilan içeren bileşimlerin veya 25 ksilan, selülozik ve hemiselülozik polimerlerin metabolize edilebilir karbon kısımlarına etkin depolimerizasyonu için enzim topluluklarında (veya "kokteyller") kullanılabilir.

Yöntemler ayrıca dönüştürülmüş biyokütle (ör. lignoselülozik) malzemesinin (buluşa ait enzimlerle işlenmiş) alınması ve fermantasyon ile ve / veya kimyasal sentez ile bir yakıt (örneğin biyoetanol, biyobutanol, biyometanol, bir biyopropanol veya bir biyodizel gibi 30 bir biyoyakıt) haline getirilmesini de içerir. Üretilen şekerler fermente edilebilir ve / veya fermente olmayan ürünler gazlaştırılabilir.

Buluşun enzimleri (örneğin buluşun rekombinant enzimlerini yapan ve bazı yönlerde salgılayan mikroorganizmalar, örneğin mantarlar, maya veya bakteriler gibi organizmalar ve bitkiler ve bitki hücreleri ve bitki parçaları, örneğin tohumlar) herhangi bir organik madde / biyokütle dönüştürme işleminin herhangi bir aşamasında, örneğin herhangi bir adımda, birkaç adımda veya adımların tümünde veya biyokütle dönüştürme işlemlerinin aşağıdaki yöntemlerinin hepsinde veya tüm bu biyoyakıt alternatiflerinde yer alabilir veya dahil edilebilir veya entegre edilebilir:

- Doğrudan yanma: malzemenin doğrudan ısıyla yakılması ve en basit biyokütle teknolojisidir; bir biyokütle kaynağı yakınsa çok ekonomik olabilir.

10 1 Piroliz: Biyokütlenin oksijenin yokluğunda ısı ile termal bozunmasıdır. Bir yönde biyokütle yaklaşık 800 ila 1400 Fahrenheit arasında bir sıcaklığa ısıtılır ancak yanmayı desteklemek için gaz, akaryakıt ve odun kömürünün oluşturulmasına yol açacak şekilde oksijen verilmez.

15 2 Gazlaştırma: Biyokütle ısıtma veya anaerobik sindirim yoluyla metan üretmek için kullanılabilir. Sentez gazı, karbon monoksit ve hidrojen karışımı biyokütleden elde edilebilir.

- Çöp Sahası Gazı: Çöplüklerin gömülü çöplerinin çürümesi (anaerobik sindirim) ile oluşur. Organik atık ayrıştığında, doğal gazın ana bileşeni olan yaklaşık % 50 metandan oluşan bir gaz üretir.

20 • Anaerobik sindirim: Organik maddeyi doğal gazın ana bileşeni olan metan ve karbondioksit karışımına dönüştürür. Bir durumda su atığı (kanalizasyon), gübre veya gıda işleme atığı gibi biyokütle suyla karıştırılır ve hava olmadan bir sindirim tankına beslenir.

- Fermantasyon

25 • Alkol Fermantasyonu: Yakıt alkolü nişastanın şekere dönüştürülmesi, şekerin alkole mayalanması ve ardından alkol su karışımının damıtılarak ayrılmasıyla üretilir. Buğday, arpa, patates ve atık kağıt, talaş ve saman içeren şeker, nişasta veya selüloz gibi hammaddeler maya ile fermantasyon yoluyla alkole dönüştürülebilir.

30 • Transesterifikasyon : Yağın biyodizele dönüştürülmesi için örnek bir reaksiyona transesterifikasyon denir. Transesterifikasyon işlemi bitkisel yağlar, hayvansal yağlar veya geri dönüştürülmüş gres yağında bulunan trigliserit yağları ile bir alkolü (metanol

gibi) tepkimeye sokmakta, yağ asidi alkil esterleri (biyodizel) ve gliserin oluşturmaktadır. Reaksiyon ısı ve sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit gibi güçlü bir baz katalizörü gerektirir.

- Biyodizel : Biyodizel bitkisel yağlardan, hayvansal yağlardan veya geri dönüştürülmüş greslerden yapılan yağlı asit alkil esterlerinin bir karışımıdır. Biyodizel saf haliyle araçlar için yakıt olarak kullanılabilir ancak genellikle dizel motorlu araçlarda partikül, karbon monoksit, hidrokarbon ve hava toksikliği düzeylerini azaltmak için bir petrol dizel katkısı olarak kullanılır.
 - Hidroliz: Bir bileşiğin, ör. bu buluşun bir enzimi kullanılarak katalize edilen bir lignoselülozik malzeme gibi bir biyokütle gibi bir bileşiğin hidrolizini içerir.
 - Kojenerasyon: Tek bir yakıt ve tesis kullanarak birden fazla enerji formunun aynı anda üretilmesidir. Bir yönüyle, biyokütle kojenerasyonunun tek başına biyokütle oluşumundan daha fazla potansiyel büyümesi vardır çünkü kojenerasyon hem ısı hem de elektrik üretir.
- 15 Bir yönüyle buluşun polipeptitleri bir biyodizel veya bir yakıt bir organik malzemeden, örneğin herhangi bir tarım ürünü veya başka yenilenebilir besleme stoğu, bir tarımsal artık veya bir hayvan atığı veya belediye ve endüstriyel atıkların organik bileşenleri veya alg veya maya gibi mikroorganizmalar gibi bitki ve hayvanlardan elde edilen bileşimlerden, örneğin bir biyoetanol, biyobutanol, biyometanol, bir biyopropanol gibi bir biyoyakıt üretmek için bir işlemde diğer enzimler için yeterli enzimatik aktiviteye sahiptir veya bunlar ile kullanılabilir.

Buluşta ait polipeptitler bir organik materyalin, örneğin bir lignoselülozik biyokütle gibi bir biyokütlenin, bir biyoetanol, biyobutanol, biyometanol, bir biyopropanol gibi bir biyoyakıt haline dönüştürülmesi proseslerinde kullanılabilir veya biyo- yakıt olarak kullanılabilirleri (biyodizel veya biyoetanol, biyobutanol, biyometanol veya biyopropanol dahil) ya da biyokütlenin bir yakıtı işlenmesini kolaylaştırmak için biyomalzemenin hidroliz işlemlerinde veya sindiriminde kullanılabilirler. Buluşta ait polipeptitler bir bitkisel yağ, hayvansal yağ veya geri dönüştürülmüş gres yağında bulunan bir trigliserit yağı ile (metanol, butanol, propanol, etanol gibi) bir alkolün (metanol, butanol, propanol, etanol gibi) reaksiyona girmesiyle yağ asidi alkil esterlerini (biyodizel) ve gliserini oluşturan bir transesterifikasyon prosesi için işlemlerde bulunabilir. Biyodizel soya fasulyesi yağı veya geri dönüştürülmüş pişirme yağlarından

yapılabilir. Hayvansal yağlar, diğer bitkisel yağlar ve diğer geri dönüştürülmüş yağlar maliyetleri ve kullanılabilirliklerine bağlı olarak biyodizel üretmek için de kullanılabilir. Biyodizel yakıt üretmek için her türlü katı ve sıvı yağın karışımı kullanılabilir.

5 Buluşun enzimleri gliserin rafinasyonunda da kullanılabilir. Gliserin yan ürünü bir asit ile nötrleştirilen reaksiyona girmemiş katalizör ve sabunlar içerir. Su ve alkol % 50 ila % 80 ham gliserin üretmek için uzaklaştırılır. Geri kalan kirletici maddeler arasında reaksiyona girmemiş katı yağlar ve sıvı yağlar bulunur ki bu buluşun polipeptitlerini kullanan işlemlerden gelebilir. Büyük bir biyodizel tesisinde gliserin, farmasötik ve kozmetik endüstrileri için örneğin % 99 veya daha yüksek saflıkta daha fazla
10 saflaştırılabilir.

Buluşun polipeptitleri kullanılarak yapılan biyoetanol ve biyodizel, yanma karakteristiklerini geliştirmek için yakıt oksijenatlarıyla birlikte kullanılabilir. Oksijen eklemek karbon monoksit emisyonlarını azaltan daha komple yanma ile sonuçlanır. Bu, petrol yakıtlarının biyoyakıtlarla değiştirilmesinin bir başka çevresel faydasıdır. Bu
15 tarifnamenin bileşimlerini ve / veya yöntemlerini kullanarak hazırlanan bir biyoetanol, bir E10 karışımı (yaklaşık % 5 ila % 10 etanol ve yaklaşık % 90 ila % 95 benzin) oluşturmak üzere benzinle karıştırılabilir, ancak E85 veya saf form gibi daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilir. Bu tarifnamenin bileşimlerini ve / veya yöntemlerini kullanan bir biyoetanol, B100'e (saf biyodizel) kadar diğer harman seviyeleri
20 kullanılabilmesine rağmen, bir B20 harmanı (% 20 biyodizel ve % 80 petrol dizeli) oluşturmak için petrol dizeli ile harmanlanabilir.

Bu buluşun polipeptitleri, organik materyalin, örneğin bir lignoselülozik biyokütle gibi bir biyokütlenin, metanol, butanol, propanol ve / veya etanole dönüştürülmesi işlemlerinde kullanılabilir. Prosesler etanol ("biyoetanol") metanol, butanol ve / veya
25 propanolü organik materyal, ör. bir lignoselülozik biyokütle gibi bir biyokütle içeren bileşimlerden yapabilir. Organik materyal, ör. bir lignoselüloz biyokütle malzemesi gibi bir biyokütle, tarımsal ürünlerden, gıda veya yem üretiminin bir yan ürünü olarak veya bitki artıkları ve atık kağıdı gibi biyokütle atık ürünleri olarak elde edilebilir. Buluşun polipeptitleri ile muamele edilmek üzere uygun bitki kalıntılarının örnekleri arasında
30 taneler, tohumlar, gövdeler, yapraklar, kabuklar, kavuzlar, mısır koçanı, mısır atıkları, saman, çimenler (ör. Sorghastrum nutans gibi Hint otu; örneğin, Panicum virgatum gibi Panicum türleri) ve benzerleri, ayrıca odun, tahta parçaları, odun hamuru ve talaş bulunur. Buluşun polipeptitleri ile muamele edilmeye uygun kağıt atık örnekleri

arasında fotokopi kağıdı, bilgisayar yazıcı kağıdı, defter kağıdı, not defteri kağıdı, daktilo kağıdı ve benzerlerinin yanı sıra gazeteler, dergiler, karton ve kağıt bazlı ambalaj malzemeleri bulunmaktadır.

5 Bir yönüyle buluşun enzimleri biyokütleden metanol, butanol, propanol ve / veya etanol yapmak için daha "geleneksel" vasıtalarla, ör. kuru biyokütle malzemesinin bir reaktörde bir kuvvetli asit ve bir metal tuzunun seyreltik bir çözeltisinden oluşan bir katalizöre tabi tutulması ile biyokütlenin (örneğin lignoselülozik malzemeler) hidrolize edilmesini içeren yöntemlerle bir arada kullanılabilir, bu daha yüksek şeker verimleri elde etmek için aktivasyon enerjisini veya selüloz hidrolizinin sıcaklığını azaltabilir, 10 bakınız örneğin US Patent No. 6,660,506; 6,423,145.

Buluşun enzimlerinin kullanılmasını içeren bir başka örnek yöntem, selülozun glikoza büyük depolimerizasyonu olmaksızın hemiselülozun esas olarak depolimerizasyonunu gerçekleştirmek için seçilen bir sıcaklık ve basınçta malzemeyi sulu bir ortamda birinci 15 aşama hidroliz aşamasına tabi tutarak ksilan, hemiselüloz, selüloz ve / veya lignin içeren biyokütlenin (ör. lignoselülozik malzemeler) hidrolize edilmesini içerir. Bu aşama sıvı sulu fazın hemiselülozun depolimerizasyonundan kaynaklanan çözünmüş monosakkaritleri ve selüloz ve lignin içeren bir katı fazı içeren bir bulamaçla sonuçlanır. İkinci aşama hidroliz adımı selülozun en azından büyük bir kısmının depolimerleştirildiği koşulları içerir, bu tür bir aşama selülozun çözünmüş / çözünebilir 20 depolimerizasyon ürünlerini içeren bir sıvı sulu faz ile sonuçlanır. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 5,536,325. Buluşun enzimleri bu örnek işlemin herhangi bir aşamasında eklenebilir.

Buluşun ait enzimlerin kullanılmasını içeren bir başka örnek yöntem bir biyokütle materyalinin bir veya daha fazla seyreltik asit hidrolizi ile yaklaşık % 0,4 ila % 2 25 arasında güçlü asit ile işlenmesini ve asitle hidrolize biyokütle materyalinin reaksiyona girmemiş katı bir lignoselülozik bileşenin biyolojik olarak parçalanabilen termoplastikler ve türevler için öncülerin üretilmesi için alkali delignifikasyonu ile işlem görmesini kapsar. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 6,409,841. Buluşun enzimleri bu işlemin herhangi bir aşamasında eklenebilir.

30 Buluşun ait enzimlerin kullanılmasını içeren bir başka yöntem bir ön- hidroliz reaktöründe biyokütlenin (örneğin lignoselülozik malzemeler) önceden hidrolize edilmesini; bir karışım yapmak için katı lignoselülozik malzemeye bir asidik sıvı

eklenmesini; karışımın reaksiyon sıcaklığına ısıtılmasını; lignoselülozik malzemeyi lignoselülozik malzemeden en az yaklaşık % 20'sini ve selüloz içeren bir katı fraksiyonu içeren bir çözündürülmüş kısım halinde parçalara ayırmak için yeterli bir süre boyunca reaksiyon sıcaklığının muhafaza edilmesini; katı fraksiyondaki selülozun enzimatik sindirime daha uygun hale getirildiği reaksiyon sıcaklığında veya buna yakın bir sıcaklıkta katı fraksiyondan çözünmüş bir kısmın çıkarılmasını ve çözündürülmüş bir kısmın geri kazanılmasını içerir. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 5,705,369. Buluşun enzimleri herhangi bir aşamada eklenebilir.

Yakıt sınıfı alkol ile karıştırılmış sıvı hidrokarbonlara dayanan motor yakıt bileşimleri (örneğin kıvılcım ateşleme motorları için) buluşun bir enzimi kullanılarak yapılabilir. Buluşun bir enziminin kullanılmasıyla yapılan yakıtlar, örneğin kömür gazı sıvı- veya doğal gaz sıvı- etanol karışımları içerebilir. Bir yardımcı çözücü biyokütle türevli 2-metiltetrahidrofuran (MTHF) olabilir. Bakınız, örneğin U. S. Patent No. 6,712,866.

Biyokütlenin (örneğin lignoselülozik malzemeler), bir biyokütleden veya herhangi bir organik malzemeden, örneğin biyoyakıtın, örneğin bir etanolün üretimi için enzimatik bozunması için yöntemler de bir biyokütle malzemesinin ultrasonik işleminin kullanımını içerebilir; bkz. , ör. US Patenti No. 6,333,181.

Bir biyoyakıtın, örneğin etanolün (bir biyoetanol) bir biyokütle (örneğin bir selülozik) substrattan üretilmesi için buluşun yöntemleri biyokütle (örneğin selülozik) substratı, mevcut buluşun bir enzimi ve bir fermantasyon ajanı (örneğin yarı sürekli katı beslemeli biyoreaktör gibi bir reaksiyon kabında) içeren bir bulamaç formundaki bir reaksiyon karışımının sağlanmasını içerebilir ve reaksiyon karışımı bir fermentasyon reaksiyonunu başlatmak ve sürdürmek için yeterli koşullar altında reaksiyona sokulur (örneğin U. S. Pat. App. No. 20060014260'Da açıklanmış gibi). Deneme veya teorik hesaplamalar optimum besleme sıklığını belirleyebilir. Biyokütle (örneğin bir selülozik) substratının ve enzimin ilave miktarları optimize edilmiş besleme frekansına göre bir aralıkta reaksiyon kabına beslenir.

Biyoyakıtlar ve biyodizeller yapmak için bir işlem US Pat. Başvuru Yayın No 20050069998; 20020164730'da tarif edilir ve biyokütlenin (ör. lignoselülozik malzeme) öğütülmesi (örneğin 15- 30 mm'lik bir boyuta), elde edilen ürünün bir reaktörde 1 ila 10 dakika arasında buhar patlaması ön- işlemine (örneğin 190- 230 °C'lik bir sıcaklıkta) tabi tutulması; ön- işlemden geçirilmiş malzemenin bir siklon ya da ilgili ürün içinde

toplanması ve sıvı ve katı fraksiyonların bir filtre presinde filtrasyon yoluyla ayrılması, katı fraksiyonun bir fermentasyon kalıntısı içine sokulması ve buluşa ait bir veya daha fazla enzimin eklenmesi aşamalarını içerir ve ayrıca bir selüloz ve / veya beta-glukosidaz enzimi (ör. sitrat tamponu pH 4,8 içinde çözülmüş) benzeri bir başka enzim eklenmesi de mümkündür.

Buluşun enzimleri kullanılarak metanol, butanol, propanol ve / veya etanol içeren bir biyo- yakıt ve biyodizellerin yapılması için bir başka işlem, en az bir ksilan, bir hemiselüloz ve / veya bir selüloz ihtiva eden bir biyokütle (ör. bir lignoselülozik) besleme stoğu içeren bir başlangıç malzemesinin ön- işlemden geçirilmesini içerir.

Başlangıç malzemesi patates, soya fasülyesi (kolza), arpa, çavdar, mısır, yulaf, buğday, pancar veya şeker kamışı veya bir bileşen veya atık veya yiyecek veya yem üretimi yan ürünü içerebilir. Başlangıç malzemesi ("besleme stoğu") biyokütlenin (örneğin hemiselüloz ve / veya selüloz) en azından bir kısmi hidrolizini gerçekleştirmek için bitkinin lif yapısını bozan koşullar altında reaksiyona sokulur. Yıkıcı koşullar, örneğin başlangıç malzemesinin yaklaşık 5 saniye ile 60 dakika arasındaki bir süre boyunca, pH 0,5 ile 2,5'de, 180 °C ile 270 °C'lik bir ortalama sıcaklığa ya da 5 saniye ile 120 saniye arasında bir süre boyunca pH 0,5 ile 2,5'de 220 °C ile 270 °C arasındaki bir sıcaklığa ya da bunların eşdeğerine tabi tutulmasını içerebilir. Bu, bir enzim tarafından, örneğin buluşun bir selüloz enzimi tarafından sindirilmeye daha fazla erişilebilirlik sağlayan bir besleme stoku üretir. US Patent No. 6,090,595 .

Bu buluşun bir enzimi tarafından biyokütlenin (ör. bir lignoselülozik malzeme) hidrolizi için örnek koşullar, yaklaşık 30 °C ve 48 °C arasındaki sıcaklıklarda ve / veya yaklaşık 4,0 ile 6,0 arasında bir pH değerinde reaksiyonları içerir. Diğer örnek koşullar arasında yaklaşık 30 °C ile 60 °C arasındaki bir sıcaklık ve yaklaşık 4,0 ile 8,0 arasında bir pH bulunur.

Biyoyakıtlar ve biyolojik olarak üretilen alkoller

Sıvılar ve gazlar (örneğin sentez gazı) ve biyolojik olarak üretilen alkoller dahil olmak üzere biyo- yakıtlar ve sentetik yakıtlar, buluşun bileşimlerini (ör. enzim ve nükleik asitler ve transjenik bitkiler, hayvan, tohumlar ve mikroorganizmalar) kullanarak yapılabilir. Bu biyoyakıtlar ve biyolojik olarak üretilen alkoller bir biyokütleden üretilir.

Etanol, metanol, propanol ve butanol gibi biyolojik olarak üretilen alkoller, bir alkol yakıtı ile sonuçlanmak üzere fermantasyon (hidroliz) yoluyla buluşa ait mikropların ve enzimlerin etkisini de içeren yöntemlerle üretilebilir.

Bir sıvı veya bir gaz benzin olarak biyoyakıtlar

- 5 Biyoyakıtlar ve bir gaz veya benzin formundaki sentetik yakıtlar, örneğin bir sentez gazı biyoyakıt, örneğin bir sıvı ya da bir "sentez gazı" gibi gaz halinde bir biyoetanol, biyopropanol, biyo- butanol veya bir biyometanol veya bir sentetik yakıt yapmak üzere bir biyokütlenin hidrolizi için doğal biyokütle dönüşümü için kimyasal döngüler için buluşun enzimlerinin kullanımını içeren usullerle yapılır.
- 10 Biyoyakıt gazları ve sentetik gaz yakıtları ("sentez gazı") yapma yöntemleri, buluşun bir polipeptiti kullanılarak yapılan bir biyoetanol, biyopropanol, biyo- butanol ve / veya bir biyometanol içerebilir veya buluşun bir yöntemi kullanılarak yapılabilir ve bu buluşun biyoyakıt gazı bir hidrojen veya bir hidrokarbon bazlı gaz yakıtı gibi bir doğal gazla (biyokütleden de üretilebilir) karıştırılabilir.
- 15 Böyle bir yakıt veya gaz, motor yakıtı, örneğin bir otomotiv, kamyon, uçak, bot, küçük motor vb. yakıtı olarak kullanılabilir. Etanol, propanol, butanol ve / veya metanol bir bitkiden, örneğin mısır veya bir bitki ürününden, örneğin sap veya samandan (ör. bir pirinç samanı veya bir buğday samanı veya herhangi bir tahıl bitkisinin kuru sapı) veya bir tarımsal atık ürününden yapılabilir. Selülozik etanol, propanol, butanol ve / veya
- 20 metanol bir bitki, örneğin mısır veya bitki ürünü, örneğin sap veya saman veya bir tarımsal atık ürününden (örneğin Iogen Corporation of Ontario, Kanada tarafından işlendiği gibi) üretilebilir.

Buluşun bir bileşimi kullanılarak yapılan etanol, propanol, butanol ve / veya metanol bir yakıt (örneğin bir benzin) katkı maddesi olarak (örneğin bir oksijenatör) veya doğrudan

25 bir yakıt olarak kullanılabilir. Örneğin bir yakıt dahil bir etanol, propanol, butanol ve / veya metanol, etil tersiyer butil eter (ETBE) veya bir biyoyakıt olarak % 47 etanol içeren ETBE gibi bir ETBE karışımı veya MTBE (metil tersiyer- butil eter) ile karıştırılabilir. Veya bir yakıt dahil olmak üzere bir etanol, propanol, butanol ve / veya metanol, aşağıdakilerle karıştırılabilir:

30

| IUPAC ADI | Genel Adı |
|-----------|-----------|
|-----------|-----------|

| | |
|-------------------|--------------------------|
| But- 1- en | α - butilen |
| Cis- but- 2- en | Cis- β - butilen |
| Trans- but- 2- en | Trans- β - butilen |
| 2- metilpropen | İzobutilen |

Buluşun bir enzimi kullanılarak yapılan bir butanol ve / veya etanol "ABE" kullanılarak daha fazla işlenebilir. (Aseton, Butanol, Etanol) fermantasyonu; örneğin butanolün tek sıvı ürün olduğu fermantasyon. Bu butanol ve / veya etanol mevcut benzinli motorlarda (motor veya arabada değişiklik yapılmadan) "doğrudan" yanar, daha fazla enerji üretir ve daha az aşındırıcıdır ve etanolden daha az suda çözünür ve mevcut alt yapılar yoluyla dağıtılabilir.

Karışık alkoller, alkollerin birkaçının ya da tamamının, buluşun bir enzimi kullanılarak en az bir yöntemi içeren işlemlerle yapıldığı, örneğin bir etanol, propanol, bütanol, pentanol, heksanol ve heptanol gibi bir karışımı içerenlerdir, örneğin ECALENE™ (Güç Enerji Yakıtları Inc. , Lakewood, CO), örn . :

| Buluşun Örnek Niteliğindeki Yakıtı | |
|------------------------------------|---------------|
| Bileşen | % 'ce ağırlık |
| Metanol | % 0 |
| Etanol | % 75 |
| Propanol | % 9 |
| Bütanol | % 7 |
| Pentanol | % 5 |
| Heksanol & Daha üstü | % 4 |

Bu alkollerin biri bir kaçı veya tamamı buluşun bir enzimini kullanan bir işlemle yapılabilir ve süreç ayrıca biyokütle- sıvı teknolojisini, örneğin katalitik sentezi takiben sentez gazı üretmek için bir gazlaştırma işlemi içerir veya biyokütlenin bir karışık alkol yakıtına biyo- dönüştürülmesi ile yapılabilir.

- 5 Buluşa ait bir enzimin kullanımını içeren işlemler "sıvıya gaz"ın dahil edilmesini (veya eklenmesi) veya GTL veya "sıvıya kömür"ü dahil edilmesi veya CTL; veya "sıvıya biyokütle"nin dahil edilmesi veya BTL veya "sıvılara sıvı yağlar"ın dahil edilmesi veya OTL süreçlerini içerir ve bu işlemler sentetik yakıtlar yapmak için kullanılır. Bu işlemlerden biri, örneğin "Fischer Tropsch" (karbon monoksit ve hidrojenin çeşitli
- 10 şekillerde sıvı hidrokarbonlara dönüştürüldüğü katalizli bir kimyasal reaksiyon, kullanılan tipik katalizörler demir ve kobalt esaslıdır, bu işlemin asıl amacı sentetik kaydırıcı yağ veya sentetik yakıt olarak kullanılmak üzere sentetik bir petrol ikamesi üretmektir) olarak adlandırılan bir proses kullanılarak biyokütleden bir biyoyakıtın (örneğin sentez yakıtı) üretilmesini içerir. Bu sentetik biyoyakıt oksijen içerebilir ve
- 15 yüksek kaliteli dizel ve benzine katkı maddesi olarak kullanılabilir.

Süreçler fiziksel, kimyasal ve çoklu (fiziksel + kimyasal) olarak üç kategoride gruplandırılabilen çeşitli ön muameleleri kullanabilir. Herhangi bir kimyasal, örneğin asitler, alkaliler, gazlar, selüloz çözücüler, alkoller, oksitleyici maddeler ve indirgeyici maddeler gibi bir ön- muamele ajanı olarak kullanılabilir. Bu kimyasallar arasında alkali

20 en popüler ön arıtma muamele maddesidir çünkü nispeten ucuzdur ve daha az selüloz bozunması ile sonuçlanır. Yaygın olarak kullanılan alkali sodyum hidroksit ve kireç de ön muamele maddeleri olarak kullanılabilir. Sodyum hidroksit biyokütle sindirimini önemli ölçüde artırmaya rağmen geri dönüşümü zor, nispeten pahalı ve kullanımı tehlikelidir. Tersine kirecin birçok avantajı vardır: güvenli ve çok ucuzdur ve karbon

25 dioksit ile yıkama suyunun karbonatlanmasıyla geri kazanılabilir.

Bir çok- enzimli sistem bu buluşun en az bir enzimini bir biyoküttele, örneğin şeker kamışı, örneğin şeker fabrikalarında işlenen bir şeker kamışı bileşeni olan küspe gibi polisakkaritleri hidrolize etmek için içerir. Biyokütle buluşun bir enzimini eksprese eden bir organizma (ör. transgenik hayvan, bitkiler, dönüştürülmüş mikroorganizma) ve /

30 veya yan ürün (örneğin hasat edilmiş bitki, meyve, tohum) tarafından yapılan buluşun bir enzimi tarafından işlenir. Enzim bir yakıt olarak işlenecek olan bitki veya biyokütle tarafından yapılan rekombinant bir enzim olabilir, örneğin bir transgenik şeker kamışı küspe, buluşun bir enzimini içerir. Bu bileşimler ve ürünler doğal biyokütle dönüşümü için

örneğin bir biyoyakıtı, örneğin bir sıvı veya bir "sentez gazı" gibi bir gaz formda biyoetanol, biyopropanol, biyo- butanol, biyometanol, bir sentetik yakıtı yapmak için bir biyokütlenin hidrolizi için kimyasal döngüleri içeren yöntemlerde kullanılır.

5 Bir biyoyakıt, örneğin bir biyogaz, anaeroblar tarafından organik materyalin anaerobik sindirimi işlemiyle üretilebilir, burada işlem buluşun bir enziminin kullanımını içerir. Bu biyoyakıt, örneğin bir biyogaz ya biyo- bozunabilir atık malzemelerden ya da gaz verimlerini desteklemek için anaerobik çürütücülere beslenen enerji mahsullerinin kullanılmasıyla üretilebilir. Katı çıktı, digestat biyoyakıt olarak da kullanılabilir.

10 Buluşa ait bir enzimin kullanımını içeren bir işlemle hazırlanan bir metan içeren bir biyogaz, örneğin endüstriyel anaerobik çürütücüler ve mekanik biyolojik arıtma sistemlerinde geri kazanılabilir. Çöp sahası gazı bu buluşun bir enzimi kullanılarak daha fazla işlenebilir; işlenmeden önce çöp sahası gazı doğal olarak oluşan anaerobik sindirim yoluyla toprak dolgularında üretilen biyogazın daha az temiz bir biçimi olabilir. Paradoksal olarak çöp sahası gazının atmosfere kaçmasına izin verilirse, güçlü bir sera gazıdır.

20 Çeşitli atıklardan biyolojik olarak üretilen yağların ve gazların üretilmesi için yöntemler sağlanmakta olup, burada işlem, buluşun bir enziminin kullanımını içermektedir. Bu yöntemler metan ve petrol benzeri diğer yağları çıkarmak için atıkların termal depolimerizasyonunu içerebilir ya da, örneğin baca gazlarında baca gazı almak ve biyo- dizel, biyogaz ve kömür ile karşılaştırılabilir bir kuru yakıt gibi biyo- yakıtlar üretmek için toksik olmayan fotosentetik alglerden yararlanan, örneğin GreenFuel Technologies Corporation, Cambridge, MA tarafından tasarlanan bir biyoreaktör sistemi içerirler.

25 Ham petroler ve dizel motorlarda kullanılabilen gazlar dahil olmak üzere biyolojik olarak üretilen yağların yapılması için yöntemler sağlanmakta olup, burada işlem buluşun bir enziminin kullanımını içermektedir. Bu yöntemler petrolü, örneğin ham yağları kerosen, petrol, dizel ve diğer fraksiyonlara dönüştürebilir.

Buluşun bir enzimini kullanan yöntemler biyolojik olarak üretilen yağları aşağıdakilerden yapabilir:

- 30
- Düz bitkisel yağ (SVO).
 - Atık bitkisel yağ (WVO) - çoğunlukla ticari mutfaklar tarafından üretilen atık pişirme yağları ve gresleri.

- Biyodizel hayvansal yağların ve bitkisel yağın transesterifikasyonundan elde edilir, doğrudan petrol dizel motorlarında kullanılabilir.
- Biyolojik olarak türetilmemiş ham petrol biyogaz ve karbon katılar ile birlikte petrol bazlı olmayan malzemeler, örneğin eski lastikler, sakatat, ahşap ve plastik gibi atık ürünler de dahil olmak üzere karmaşık organik malzemelerin termal depolimerizasyonu yoluyla üretilebilir.
- Piroliz yağı, sadece flaş piroliz işleminde ısı kullanarak biyokütle, odun atığı vb. malzemelerden üretilebilir (petrol, klasik yakıt sistemlerinde veya içten yanmalı motorlarda kullanılmadan önce işlenmelidir).
- Odun, odun kömürü ve kurutulmuş gübre.

Tıbbi uygulamalar ve araştırma uygulamaları

Buluşa ait enzim karışımları veya "kokteylleri" de dahil olmak üzere buluşun ksilanazları, bakteriyolitik özelliklerinden dolayı antimikrobiyal maddeler olarak kullanılabilir. Buluşun ksilanazları, ör. PCT Başvuru No. WO0049890 ve WO9903497'de tarif edildiği gibi hayvanları salmonelladan elimine etmek veya korumak için kullanılabilir. Buluşun ksilanazları aynı zamanda bir antimikrobiyal yüzey temizleyici veya mikrobiyal itici olarak da kullanılabilir.

Diğer endüstriyel ve tıbbi uygulamalar

Yukarıda tartışıldığı gibi, buluşun enzim karışımları veya "kokteylleri" dahil olmak üzere buluşun ksilanazları, örneğin çok çeşitli endüstriyel işlemlerde, tıbbi uygulamalarda ve araştırma (laboratuvar) uygulamalarında ve gıda, hayvan yemi ve içecek uygulamalarında kullanılabilir. Yeni ksilanazlar, çeşitli mezofilik ve orta dereceli termofilik konumlardan ve aynı zamanda sindirim florası, hayvan atıklarında mikroorganizmalar, toprak bakterileri ve yüksek ölçüde alkali habitatlar gibi hedeflenen kaynaklardan yapılmış mevcut kütüphaneleri ve DNA kütüphanelerini taramak suretiyle keşfedilmektedir. Arabinoksilan substratlarını ve / veya hayvansal yem maddesinin çözünmeyen polisakkarit fraksiyonlarını kullanan biyotip ve birincil zenginleştirme stratejileri de yararlıdır.

Yeni ksilanazların keşfinde iki tarama formatı (aktivite bazlı ve sekans bazlı) kullanılır. Aktiviteye dayalı yaklaşım, azo- ksilan (Megazyme) gibi bir substrat kullanılarak agar plakalarında ksilan aktivitesi için doğrudan taramadır. Alternatif olarak hibridizasyon ve

biopanning için problemleri tasarlamak üzere biyoinformatik ve moleküler biyolojiye dayanan bir sekans bazlı yaklaşım kullanılabilir. Bakınız, örneğin, 6,054,267 , 6,030,779 , 6,368,798 , 6,344,328 sayılı US Patentleri . Taramadan elde edilen sonuçlar saflaştırılmış, sekanslanmış, karakterize edilmiş (örneğin spesifite, sıcaklık ve optimum pH'nın belirlenmesi), biyoinformatik kullanılarak analiz edilmiş, alt-klonlanmış ve temel biyokimyasal karakterizasyon için eksprese edilmiştir. Bu yöntemler, hamur hazırlama ve hayvan yemi katkı maddesi enzimleri gibi sayısız uygulamada faydalı ksilanazların taranmasında kullanılabilir.

Taramadan elde edilen enzimlerin karakterizasyonunda, hamur işleme ve fırınlama uygulamalarındaki örnek fayda değerlendirilebilir. Karakterizasyon, örneğin substrat spesifitesinin (ksilan, arabinoksilan, CMC, BBG), sıcaklık ve pH stabilitesinin ve spesifik aktivitenin ölçümünü içerebilir. Bir ticari enzim bir referans noktası olarak kullanılabilir. Buluşun enzimleri pH ≥ 7 ve 25- 35 °C'de önemli aktiviteye sahip olabilir , çözünmeyen ksilan üzerinde etkisiz olabilir, % 50- 67 sükröz içinde kararlı ve aktif olabilir.

Yem katkı maddeleri olarak fayda, aday enzimlerin karakterizasyonundan değerlendirilebilir. Karakterizasyon, örneğin substrat spesifitesi (ksilan, arabinoksilan, CMC, B β G), sıcaklık ve pH stabilitesi, spesifik aktivite ve gastrik stabilitenin ölçümünü içerebilir. Yem, monogastrik bir hayvan veya bir geviş getiren hayvan için tasarlanabilir. Buluşun enzimleri pH 2- 4 ve 35- 40 °C'de önemli bir aktiviteye, mide sıvısında 30 dakikadan daha büyük bir yarı ömre, 85 °C'de 5 dakikadan daha büyük formülasyon (tampon veya hücrelerde) yarı ömrüne sahip olabilir ve monogastrik bir hayvan yem katkı maddesi olarak kullanılır. Buluşun enzimleri aşağıdaki özelliklerden bir veya daha fazlasına sahip olabilir: pH 6,5- 7,0 ve 35- 40 °C' de önemli bir aktivite, rumen sıvısında 30 dakikadan daha uzun bir yarı ömür, kuru toz kadar kararlı bir formülasyon stabilitesi ve ir ruminant hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılır.

Enzimler çok çeşitli doğal ve doğal olmayan substratlara karşı reaktiftir, böylece hemen hemen her organik bileşiğin modifikasyonunu mümkün kılar. Ayrıca geleneksel kimyasal katalizörlerin aksine enzimler yüksek oranda enantio- ve regio- selektiftir. Enzimler tarafından sergilenen fonksiyonel grup spesifitesinin yüksek derecesi, her bir reaksiyonun yeni bir aktif bileşiğe yol açan sentetik bir sekansta takip edilmesini mümkün kılmaktadır. Enzimler ayrıca doğada fizyolojik işlevleriyle ilgisiz birçok farklı reaksiyonu katalize edebilirler. Örneğin peroksidazlar, fenollerin oksitlenmesini

hidrojen peroksit ile katalize eder. Peroksidazlar ayrıca enzimin doğal işleviyle ilişkili olmayan hidroksilasyon reaksiyonlarını da katalize edebilir. Diğer örnekler polipeptitlerin parçalanmasını katalize eden ksilanazlardır. Organik çözelti içinde bazı ksilanazlar, bu enzimlerin doğal işleviyle ilgisi olmayan bir fonksiyon olarak bir şekeri de açılabilirler.

Mevcut buluş enzimlerin eşsiz katalitik özelliklerini kullanır. Kimyasal dönüşümlerde biyokatalizörlerin (yani saflaştırılmış veya ham enzimler, yaşamayan veya yaşayan hücreler) kullanımı, normal olarak spesifik bir başlangıç bileşiği ile reaksiyona giren belirli bir biyokatalizörün tanımlanmasını gerektirirken, mevcut buluş birçok başlangıç bileşiğinde bulunan fonksiyonel gruplar için spesifik olan, seçilmiş biyokatalizörleri ve reaksiyon koşullarını kullanır. Her bir biyokatalizör bir fonksiyonel gruba veya birkaç ilgili fonksiyonel gruba özgüdür ve bu fonksiyonel grubu içeren birçok başlangıç bileşiği ile reaksiyona girebilir. Biyokatalitik reaksiyonlar tek bir başlangıç bileşiğinden bir türevler popülasyonu üretir. Bu türevler ikinci bir türev bileşikleri popülasyonu üretmek için başka bir tür biyokatalitik reaksiyona tabi tutulabilir. Orijinal bileşiğin binlerce varyasyonu, her bir biyokatalitik türevlendirme yinelemesi ile üretilebilir.

Enzimler molekülün geri kalanını etkilemeden bir başlangıç bileşiğinin belirli bölgelerinde reaksiyona girer, bu da geleneksel kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilmesi çok zor olan bir işlemdir. Bu yüksek derecede biyokatalitik özgüllük, kütüphane içindeki tek bir aktif bileşiğin tanımlanması için araçlar sağlar. Kütüphane onu üretmek için kullanılan biyokatalitik reaksiyonlar serisi olan "biyosentez tarihi" ile karakterizedir. Biyolojik aktiviteler için kütüphanenin taranması ve biyosentetik öykünün izlenmesi aktif bileşiği üreten spesifik reaksiyon dizisini tanımlar. Reaksiyon dizisi tekrarlanır ve sentezlenen bileşiğin yapısı belirlenir. Bu tanımlama biçimi, diğer sentez ve tarama yaklaşımlarından farklı olarak immobilizasyon teknolojilerini gerektirmez ve bileşikler hemen hemen her tür tarama analizi kullanılarak çözelti içinde serbestçe sentezlenebilir ve test edilebilir. Fonksiyonel gruplar üzerindeki enzim reaksiyonlarının yüksek derecedeki özgüllüğünün, biyokatalitik olarak üretilen kütüphaneyi oluşturan spesifik enzimatik reaksiyonların "izlenmesini" mümkün kıldığını belirtmek önemlidir.

Prosedürel adımların birçoğu binlerce biyokatalitik reaksiyonun ve tarama analizlerinin günde bir kez gerçekleştirilmesini sağlamanın yanı sıra yüksek bir doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlayarak robotik otomasyon kullanılarak gerçekleştirilir. Sonuç

olarak mevcut kimyasal yöntemler kullanılarak üretilmesi yıllar sürececek bir türev bileşikler kütüphanesi bir hafta içinde üretilebilir. (Küçük moleküller dahil olmak üzere moleküllerin modifikasyonu hakkında daha fazla bilgi için, bkz. PCT / US94 / 09174).

Bir bileşim bir hidrojel ve en az bir suda çözünür polimer ve buluşa ait bir veya daha fazla enzim oluşturabilen en az bir muko yapışkan polimeri içerir. Bu formülasyon herhangi bir endüstriyel, gıda veya yem işleme veya tıbbi veya araştırma uygulamasında, yani buluşun bir enzimini veya nükleik asidini kullanan herhangi bir uygulamada kullanılabilir. Formülasyon mukozasız özelliklere sahip olan sulu çözelti içinde bir hidrojel oluşturabilir, bu enzimleri, buluşun enzimlerini üretebilen mikroorganizmaları veya antikorları, uzun bir süre boyunca serbest bırakabilir. Alternatif olarak hidrojel enzimleri, buluşa ait enzimleri üretebilen mikroorganizmaları veya antikorları yakalayabilir ve bunları tanımlanmış (örneğin uzatılmış) bir süre boyunca serbest bırakabilir.

Buluş, aşağıdaki örneklere ilişkin olarak daha ayrıntılı açıklanacaktır; bununla birlikte, mevcut buluşun bu gibi örneklerle sınırlı olmadığı bilinmelidir.

ORNEKLER

ORNEK 1: PLAKA TABANLI ENDOGLİKOSİDAZ ENZİM KEŞFİ: EKSPRESYON TARAMASI

Lambda Kütüphanesinin Titer Tayini : 600 µL E. coli MRF' hücrelerine 1.0 µL Lambda Zap Express amplifiye kütüphane stoku ekleyin (OD₆₀₀ = 1.0). MRF' stoğunu 10mM MgSO₄ ile seyreltin. Karışımı 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edin, daha sonra 50 °C'de 5- 6 mL NZY üst agar'a aktarın ve nazikçe karıştırın. Hemen (150mm) NZY ortam plakasına agar solüsyonu dökün ve üst agarın tamamen katılaşmasını bekleyin (yaklaşık 30 dakika). Plakayı ters çevirin. Plakayı 8- 12 saat 39 °C'de inkübe edin. (Plakaların sayısı yaklaşıktır. Faj titresinin 50.000 pfu / plaka verdiği tespit edilmiştir. Gerekirse, SM buffer ile Kütüphane fajının bir kısmını seyreltin.)

Substrat taraması : Güçlendirilmiş kütüphaneden Lambda Zap Express'i (50,000 pfu), 600µL E. coli MRF' hücrelerine (OD₆₀₀ 1.0) ekleyin ve 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edin. Faj / hücre süspansiyonu inkübe edilirken, 1.0mL istenen polisakarid boya etiketli substratı (genellikle % 1- 2 w / v) 5.0 mL NZY üst agar'a 50 °C'de ekleyin ve iyice karıştırın. (Çözelti, ihtiyaç duyulana kadar 50 °C'de tutulur.) Hücre süspansiyonunu substrat / üst agar çözeltisine aktarın ve yavaşça karıştırın. Hemen

(150mm) NZY ortam plakasının üzerine çözeltiyi dökün. Üst agarın tamamen katılaşmasını bekleyin (yaklaşık 30 dakika), ardından plakayı ters çevirin. Plakayı 8-12 saat boyunca 39 °C'de inkübe edin. Plakaların etrafındaki temizleme bölgeleri (halos) için plakayı gözlemleyin. Agardan halos içeren plakaların alın ve steril bir mikro tüpe aktarın. (Geniş delikli bir 200 µL pipet ucu, istenen plağı içeren agar tıkaçını çıkarmak (çekirdek) için iyi çalışır.) Fajı, 500 µL SM tamponu içinde tekrar askıya alın. Hücrenin daha fazla büyümesini önlemek için 20 µL kloroform ekleyin.

Saf klonların izolasyonu : 500 µL E. coli MRF' hücrelerine 5 yeniden süspansiyon edilmiş faj süspansiyonu ilave edin ($OD_{600} = 1.0$). Plakayı 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edin. Faj / hücre süspansiyonu inkübe edilirken, 600µL istenen polisakarid boya etiketli substratı (genellikle % 1- 2 w / v) 3.0mL NZY üst agar'a 50 °C'de ekleyin ve iyice karıştırın. (Çözelti, ihtiyaç duyulana kadar 50 °C'de tutulur.) Hücre süspansiyonunu substrat / üst agar çözeltisine aktarın ve yavaşça karıştırın. Hemen (90mm) NZY ortam plakasına agar solüsyonu dökün ve üst agarın tamamen katılaşmasını bekleyin (yaklaşık 30 dakika), ardından plakayı ters çevirin. Plakayı 8- 12 saat boyunca 39 °C'de inkübe edin. Plaka, bir tek plak (saf klon) etrafında bir temizleme bölgesi (halo) için gözlemlendi. (Tek bir plak izole edilemezse, titreyi ayarlayın ve faj süspansiyonunu tekrar plakalayın.) Fajı, 500 µL SM tamponu içinde yeniden süspansiyon edin ve hücrenin daha fazla büyümesini önlemek için 20 µL Kloroform ekleyin.

Saf klonların eksizyonu : Saf faj süspansiyonunun oda sıcaklığında 2 ila 3 saat veya 4 °C'de gece boyunca inkübe edilmesine izin verin. 200 µL E.coli MRF' hücrelerine ($OD_{600} = 1.0$), 100 µL saf faj süspansiyonu ekleyin. 1.0µL ExAssist yardımcı faj ($> 1 \times 10^6$ pfu / mL; Stratagene) ekleyin. Plakayı 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edin. Hücre süspansiyonuna 3.0 mL 2 x YT ortamı ekleyin. Çalkalarken 2- 2,5 saat boyunca 37 °C'de inkübe edin. Tüpü 20 dakika 70 °C'ye aktarın. 200 µL E.coli Exp 505 hücreleri ($OD_{600}=1.0$) ihtiva eden bir mikro tüpe 50- 100 µL fajemid süspansiyonu aktarın. Plakayı 45 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edin. LB_{kan 50} ortamı (Kanamisin 50ug / mL ile LB ortamı) üzerini 100 µL hücre süspansiyonu ile kaplayın. Plakayı 8- 12 saat boyunca 37 °C'de inkübe edin. Koloniler için plakayı gözlemleyin. Büyüyen herhangi bir koloni saf fajemidi içerir. Bir koloni seçin ve 8- 12 saat boyunca küçük bir (3- 10 mL) sıvı kültürünü büyütün. Kültür ortamı sıvı LB_{kan 50}'dir .

Etkinlik doğrulaması : Steril bir mikro tüpe 1.0 mL sıvı kültür aktarın. 1 dakika boyunca 13200 rpm'de (16000 g) santrifüjleyin. Süpernatantı atın ve pH 6.2 olan 200 µL fosfat

- tamponu ekleyin. Bir mikro uç kullanarak buz üzerinde 5 ila 10 saniye sonikasyon yapın. 200 µL uygun substrat ekleyin, hafifçe karıştırın ve 1.5- 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edin. Yalnızca tampon ve substrat içeren bir negatif kontrol de çalıştırılmalıdır. Süspansiyona 1.0 mL mutlak etanol (200 alkol derecesi) ekleyin ve karıştırın. 10 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüjleyin. Renk için süpernatantı gözlemleyin. Renklenme miktarı değişebilir, ancak kontrolden daha fazla renkte olan tüpler etkinlik açısından pozitif olarak kabul edilir. Bir spektrofotometre, arzu edildiğinde veya ihtiyaç duyulduğunda bu adım için kullanılabilir. (Azo- ksilan için Megazimi, 590nm'de okuyun).
- 10 Aynı Kütüphanelerden gelen saf klonların RFLP'si : Steril bir mikro tüpe 1.0 mL sıvı kültür aktarın. 1 dakika boyunca 13200 rpm'de (16000 g) santrifüjleyin. Plazmid izolasyonu için QIAprep spin mini kit (Qiagen) protokolünü takip edin ve elüsyon tamponu olarak 40 µL kutsal suyu kullanın. Steril bir mikro tüpe 10 µL plazmid DNA aktarın. 1.5 µL Tampon 3 (New England Biolabs), 1.5 µL 100X BSA çözeltisi (New England Biolabs) ve 2.0 µL kutsal su ekleyin. Buna, 1.0 µL Not 1 ve 1.0 µL Pst 1 kısıtlama endonükleazları (New England Biolabs) ekleyin. 37 °C'de 1.5 saat inkübe edin. 3.0 µL 6X Yükleme tamponu (Invitrogen) ekleyin. 120 voltta 1- 1.5 saat boyunca % 1.0 agaroz jeli üzerinde 15 µL sindirilmiş numuneyi çalıştırın. Jeli, bir jel görüntüleyici ile görüntüleyin. Farklı bir sindirim modeliyle tüm klonlarda dizi analizi yapın.
- 20 Tablo 6, buluştaki enzimlerinin çeşitli özelliklerini tarif eder.

Tablo 6

| SEK ID NO. | Topt* | Tsta** | pHopt* | Önemli aktiviteler | pI | M _w | Notlar |
|------------|-------|--------------------|---------|--------------------|-----|----------------|--------|
| 151, 152 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5-9.0 | AZO- ksilan | 5.7 | 40.2 | |
| 155, 156 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5-8.0 | AZO- ksilan | 8.8 | 62.7 | |

| | | | | | | | |
|-------------|---------------|---|--------------|-------------|-----|------|--|
| 169, 170 | 50 °C | 65 °C'de > 1 dakika; 85 °C'de < 1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 8.7 | 36.7 | |
| 195, 196 | 50 °C | 65 °C'de >1 dakika, < 10 dakika, 85 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.5 | 36.7 | |
| 215, 216 | 85 °C | 85 °C'de < 3 dakika | 5.5- 8.0 | AZO- ksilan | 8.6 | 34.8 | |
| 47, 48 | 50 °C | < 0.5 dakika at 65 °C; 85 °C'de < 1 dakika | 7.0- 8.0 | AZO- ksilan | 6.2 | 40.3 | |
| 191, 192 | 85 °C | 85 °C'de > 30 saniye | 5.5 | AZO- ksilan | 7.8 | 34.6 | |
| 247, 248 | 50 °C | 65 °C'de < 1 dakika | 8.0 | AZO- ksilan | 9.4 | 43.5 | |
| 7, 8 | 50 °C | 85 °C'de > 1 dakika, < 5 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 4.5 | 55.3 | |
| 221, 222 | 50- 65 °C | 75 °C'de <1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.3 | 34.6 | |
| 163, 164 | 65 °C | 65 °C'de <1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 6.3 | 36.0 | |
| 19, 20 | 37 °C | 50 °C'de <5 dakika | 7.0 - 8.0 | AZO- ksilan | 9.2 | 41.5 | |
| 87, 88 | 37 - 50 °C | 85 °C'de < 1 dakika | 8.0 | AZO- ksilan | 5.2 | 36.7 | |

| | | | | | | | |
|----------|------------|--|-----------|-----------------------|-----|------|-----|
| 81, 82 | 50 °C | 65 °C'de < 1 dakika | 7.0 - 9.0 | AZO- ksilan | 5.3 | 38.8 | |
| 91, 92 | 50 °C | 65 °C'de < 1 dakika | 7- 8 | AZO- ksilan, AZO- CMC | 5.4 | 39.0 | |
| 61, 62 | 37 °C | 50 °C'de <5 dakika | 7.0 - 9.0 | AZO- ksilan, AZO- CMC | 5.4 | 40 | |
| 159, 160 | 85 °C | 85 °C'de < 30 saniye | 5.5 | AZO- ksilan | 8.3 | 34.5 | |
| 233, 234 | 50 °C | 65 °C'de > 30 saniye ila < 1 dakika; 85 °C'de < 1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 8.5 | 35.1 | |
| 203, 204 | 50 - 65 °C | 65 °C'de > 1 dakika ila < 5 dakika, 85 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 9.5 | 21.7 | |
| 181, 182 | 85 °C | 85 °C'de > 1 dakika | 5.5- 8.0 | AZO- ksilan | 8.8 | 35.5 | |
| 227, 228 | 65 °C | 85 °C'de >1 dakika ila < 5 dakika | 5.5 - 7.0 | AZO- ksilan | 7.8 | 25.8 | |
| 45, 46 | 45 °C | 45 °C'de 35 dakika, 55 °C'de <0.5 dakika | > 5.5 | AZO- ksilan | 6.7 | 40.4 | *** |
| 231, 232 | 65 °C | 50 °C'de >10 dakika | 5.5 - 7.0 | AZO- ksilan | 8.4 | 31.4 | |
| 129, 130 | 65 °C | 75 °C'de <1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 5.1 | 116 | |

| | | | | | | | |
|----------|-----------|------------------------------------|-----------|-------------|------|------|-------|
| 93, 94 | 50 °C | 60 °C'de < 1 dakika | 8.0 - 9.0 | AZO- ksilan | 5.3 | 39.1 | |
| 189, 190 | 65 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 9.2 | 20.3 | **** |
| 49, 50 | 70 °C | 70 °C'de <20 dakika | >5 | AZO- ksilan | 5.7 | 38.9 | |
| 85, 86 | 50 °C | 85 °C'de >5 dakika | 5.5 - 7.0 | AZO- ksilan | 6.1 | 48.4 | |
| 99, 100 | 50 °C | 75 °C'de <1 dakika | 5.5 - 8.0 | AZO- ksilan | 10.8 | 36.6 | |
| 123, 124 | 85 °C | 100 °C'de <30 saniye | 5.5-7.0 | AZO- ksilan | 6.1 | 44.1 | |
| 249, 250 | 45 °C | 75 °C'de >1 dakika ila < 10 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 5.3 | 93 | |
| 167, 168 | 85 °C | 85 °C'de < 5 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 9.5 | 21.7 | |
| 207, 208 | 75 °C | 65 °C'de < 5 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 9.1 | 20.4 | |
| 251, 252 | 65- 75 °C | 85 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.8 | 20.4 | ***** |
| 11, 12 | <90 °C | 70 °C'de <40 dakika | >6 | AZO- ksilan | 6.8 | 43.9 | |
| 177, 178 | 65 °C | 75 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.7 | 44.6 | |

| | | | | | | | |
|----------|------------|----------------------|-----------|-------------|-----|------|--|
| 9, 10 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5 - 7.0 | AZO- ksilan | 4.9 | 46.1 | |
| 43, 44 | 37 °C | kararsız | 5.5- 7.0 | AZO- ksilan | 4.9 | 39.1 | |
| 113, 114 | 65 - 75 °C | 75 °C'de < 1 dakika | 5.5- 8.0 | AZO- ksilan | 5 | 41.2 | |
| 75, 76 | 50 °C | 85 °C'de < 1 dakika | 7.0 - 9.0 | AZO- ksilan | 4.7 | 39.4 | |
| 111, 112 | 37 °C | 50 °C'de >10 dakika | 7 - 8 | AZO- ksilan | 5.6 | 41.0 | |
| 117, 118 | 37 °C | kararsız | 7- 8 | AZO- ksilan | 9.1 | 53.3 | |
| 115, 116 | - | - | - | AZO- ksilan | 8.9 | 50.8 | |
| 125, 126 | 37 °C | - | 8.0 | AZO- ksilan | 5.3 | 41.1 | |
| 137, 138 | 50 °C | 65 °C'de < 30 saniye | 5.5 | AZO- ksilan | 5.7 | 38.5 | |
| 69, 70 | 385 °C | 85 °C'de < 5 dakika | 5.5- 9.0 | AZO- ksilan | 6.4 | 58.0 | |
| 205, 206 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5- 8 | AZO- ksilan | 4.3 | 35.1 | |
| 211, 212 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 4.4 | 35.4 | |

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|--|-----|---|-----|-------|-------|
| 197, 198 | 65 °C | 65 °C'de <1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.8 | 20.1 | |
| 31, 32 | 37 °C | kararsız | 7.0 | AZO- ksilan | 5.1 | 54.4 | |
| 13, 14 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 7 | AZO- ksilan | 5.5 | 40.0 | |
| 65, 66 | 50 °C | 65 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan, AZO- CMC | 4.8 | 55.5 | |
| 257, 258 | 37 °C | kararsız | 5.5 | AZO- ksilan, AZO- barley β - glucan, AZO- CMC | 5.3 | 100.8 | |
| 57, 58 | 50 °C | 65 °C'de <1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 4.8 | 56.7 | |
| 185, 186 | 50- 75°C | 80 °C'de <1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.8 | 23.2 | |
| 243, 244 | 75°C | 85 °C'de >0.5 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.8 | 44.4 | |
| 77, 78 | 50 °C | 65 °C'de < 5 dakika, 85 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 5.3 | 44.5 | |
| 229, 230 | 37 °C | 55 °C'de ³ 30 dakika, 75 °C'de < 5 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 8.7 | 20.6 | ***** |
| 109, 110 | 65°C | >0.5 dakika @ 75°C | 5.5 | AZO- ksilan | 4.9 | 45.2 | |
| 193, 194 | 65 °C | 75 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 5.4 | 29.1 | |

| | | | | | | | |
|-------------|--------------|--|-------------|-------------|-----|------|--|
| 173, 174 | 65°C | < 1 dakika 80 °C'de < 1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 7.6 | 51.6 | |
| 59, 60 | 37 °C | 65 °C'de <1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 6.6 | 42.5 | |
| 101, 102 | 50°C | 65 °C'de >0.5 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 8.7 | 41.1 | |
| 55, 56 | 37 °C | 50 °C'de > 5 dakika; 85 °C'de < 1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 6.5 | 41.8 | |
| 15, 16 | 50 °C | 65 °C'de < 1 dakika | 7.0 | AZO- ksilan | 6.4 | 40.2 | |
| 131, 132 | - | - | - | AZO- ksilan | 5.6 | 42.1 | |
| 145, 146 | 65- 85 °C | 85 °C'de < 1 dakika | 5.5 | AZO- ksilan | 5.2 | 43.7 | |
| 219, 220 | - | - | 5.5 | AZO- ksilan | 6.6 | 34.5 | |
| 253, 254 | 65 °C | 85 °C'de >0.5 dakika | 5.5 - 7 | AZO- ksilan | 7.8 | 34.6 | |
| 255, 256 | 65°C | 65 °C'de > 1 dakika ila <3 dakika | 5.5- 7.0 | AZO- ksilan | 8.3 | 35.0 | |

- * Bir substrat olarak AZO- AZO- ksilan kullanarak başlangıç oranları ile belirlenen optimum pH veya sıcaklık
- ** Termal stabilite, enzimin önemli aktiviteyi muhafaza ettiği süre (yaklaşık >% 50)
- *** Hamurun forma sokulması
- **** Hayvan yemi uygulamaları yönelik termal tolerans evrimi için GSSM ebeveyni
- ***** Düşük pH aktivitesini arttırmak için yapılan N35D mutasyonu, kamusal bilgi- mutant enzimin nispi aktivitesine göre pH 4'te anlamlı olarak artmıştır.
- ***** Hamurun forma sokulması

ORNEK 2: TERMAL TOLERANSLI MUTANTLAR İÇİN GSSM TARAMASI

Aşağıdaki örnek, termal olarak toleranslı enzimlerin taranmasına yönelik yöntemi açıklamaktadır.

- 5 **Ana Plakalar** : 96 oyuklu plakaları etiketleyerek ve her bir oyuğa 200 µL LB Amp 100 alikuatlayarak bir koloni seçici için plakalar hazırlayın. (96 oyuklu plaka başına ~ 20 ml gereklidir). Plakalar seçiciden döndükten sonra, A tabakasından 6. sıradaki ortamı çıkarın. SEK ID NO: 189 inokülasyonu ile değiştirin. Nemlendirilmiş 37 °C inkübatöre gece boyunca yerleştirin.
- 10 **Tahlil plakaları** : Araç kültürlerini taze 96 oyuklu bir plakaya (200 µL / çukur LB Amp 100) yerleştirin. Plastik kapağı çıkarın ve Gaz Geçirgen Conta ile değiştirin. Nemlendirilmiş inkübatöre gece boyunca yerleştirin. Contayı sökün ve plastik kapağı değiştirin. 10 dakika boyunca 3000 rpm'de masa santrifüjünde kültürleri döndürün. Bir kağıt havlu üzerine ters çevirerek süpernatantı çıkarın. Her oyuğa pH 6 olan 45 µL Cit-Phos- KCl tamponu alikotlayın. Plastik kapağı alüminyum plaka contasıyla değiştirin. İyi bir sızdırmazlık sağlamak için bir silindir kullanın. - 30 saniye boyunca 6- 7 düzeyinde bir plaka çalkalayıcıda hücreleri tekrar süspansiyon haline getirin.
- 20 96 oyuklu plakayı 80 °C inkübatöre 20 dakika boyunca yerleştirin. Yığmayın. Daha sonra, birkaç dakika soğumasını sağlamak için plakaları hemen buzlu suya çıkarın. Alüminyum contayı sökün ve plastik kapak ile değiştirin. 30 µL % 2 Azo- ksilan ekleyin. Daha önceki gibi plaka çalkalayıcısında karıştırın. Nemlendirilmiş inkübatörde gece boyunca 37 °C'de inkübe edin.

Her oyuğa 200 µL etanol ekleyin ve karıştırmak için birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyin. Her seferinde değişen uçlara bir alternatif olarak, bir etanol yıkamasında durulayın ve bir kağıt havluya dökerek kurutun. Plakları 10 dakika boyunca 3000 rpm'de döndürün. 100 µL süpernatantı yeni bir 96 oyuklu bir plakaya çıkarın. OD₅₉₀ 'ı okuyun.

ÖRNEK 3: TERMAL TOLERANSLI MUTANTLARIN BAŞARI DOĞRULAMASI İÇİN GSSM TESTİ

Aşağıdaki örnek, termal olarak toleranslı enzimlerin analiz edilmesine yönelik yöntemi açıklamaktadır.

10 Aleti iştirin veya klonları çift kopyalı 96 kuyucuklu plaklara toplayın (200ul / oyuk LB Amp 100). Plastik kapağı çıkarın ve Gaz Geçirgen Conta ile değiştirin. Nemlendirilmiş inkübatöre gece boyunca yerleştirin. Contayı sökün ve plastik kapak ile değiştirin. Klonları katı agarı pintoollayın. 10 dakika boyunca 3000 rpm'de masa santrifüjünde kültürleri döndürün. Bir kağıt havlu üzerine ters çevirerek süpernatantı çıkarın. Her

15 oyuğa 25 µl BPER / Lizozim / DNaz çözeltisini (aşağı bakınız) alikotlayın.. - 30 saniye boyunca 6- 7 düzeyinde bir plaka çalkalayıcıda hücreleri tekrar süspansiyon haline getirin.

Plakayı 15 dakika buz üzerinde inkübe edin. Her oyuğa pH 6 olan 20 µL Cit- Phos- KCl tamponu ekleyin. Plastik kapağı alüminyum plaka contasıyla değiştirin. İyi bir

20 sızdırmazlık sağlamak için bir silindir kullanın. - 30 saniye boyunca 6- 7 düzeyinde bir plaka çalkalayıcıda karıştırın.

Bir 96 kuyucuklu plakayı 80 °C'deki inkübatöre 20 dakika boyunca ve diğerini 37 °C'dekine yerleştirin. Yığmayın. Plakaları derhal birkaç dakika buzlu suya soğumaya bırakınız (gerektiğinde büyük bir plastik tepsi kullanınız). Alüminyum contayı sökün. 30

25 µL % 2 Azo- ksilan ekleyin. Plastik gaz geçirgen bir conta ile kapatın. Daha önceki gibi plaka çalkalayıcısında karıştırın. 37 °C ve 80 °C'lik bir seti, 37 °C sıcaklıkta nemli inkübatör içinde 2 saat boyunca ve bir başka grubu 4 saat boyunca inkübe edin.

İnkübasyondan sonra plakayı oda sıcaklığında ~ 5 dakika bekletin. Her oyuğa 200 µL etanol ekleyin ve karıştırmak için birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyin. Her seferinde

30 uçları değiştirmek yerine, bir etanol yıkamasında durulayın ve bir kağıt havluya dökerek kurutun. Ancak, her bir klon için yeni bir grup uç kullanın. Plakaları 10 dakika

boyunca 3000 rpm'de döndürün. 100 µL süpernatantı yeni bir 96 oyuklu bir plakaya çıkarın. OD₅₉₀'ı okuyun.

BPER / Lizozim / DNaz çözeltisi (toplam 4.74 mL):

4,5 mL BRP

- 5 200 µL 10 mg / mL Lizozim (pH 6 olan Cit- fos- tamponda taze yapılmış)
40 µL 5 mg / mL DNaz I (pH 6 olan Cit- fos tamponunda taze yapılmış)

ORNEK 4: Substrat olarak buğday arabinoksilan ile ksilanaz testi

Aşağıdaki örnek, örneğin bir enzimin buluşun kapsamı içinde olduğunu belirlemek için kullanılabilecek bir ksilanaz analizini tarif etmektedir.

- 10 SEK ID NO'lar: 11, 12, 69, 70, 77, 78, 113, 114, 149, 150, 159, 160, 163, 164, 167, 168, 181, 182, 197 ve 198 pH 8'de (Na- fosfat tamponu) bir analize tabi tutuldu ve 70 °C'de bir substrat olarak buğday arabinoksilan kullanıldı. Enzimler, Tablo 7'de belirtildiği gibi karakterize edildi.

Tablo 7

| SEK ID NO'lar: | Protein Konsantrasyonu (mg/ml) | her viyale eklenen lizatın hacmi | #of viyalleri | Birimler/ml* | protein (mg/mL) | U/mg |
|----------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------|-----------------|------|
| 11, 12 | 42 | 0.5 | 10 | 163 | 22.0 | 7.4 |
| 113, 114 | 37 | 0.6 | 10 | 66 | 22.0 | 3.0 |
| 163, 164 | 35 | 0.6 | 10 | 25 | 22.0 | 1.1 |
| 197, 198 | 23 | 1.0 | 10 | 31 | 22.0 | 1.4 |
| 167, 168 | 10 | 2.2 | 10 | 228 | 22.0 | 10.4 |

| | | | | | | |
|---|----|-----|----|----|------|-----|
| 77, 78 | 47 | 0.5 | 10 | 29 | 22.0 | 1.3 |
| 69, 70 | 18 | 1.3 | 10 | 36 | 22.0 | 1.7 |
| 181, 182 | 28 | 0.8 | 10 | 24 | 22.0 | 1.1 |
| 159, 160 | 25 | 0.9 | 10 | 43 | 22.0 | 2.0 |
| 149, 150 | 42 | 0.5 | 10 | 24 | 22.0 | 1.1 |
| <p>* Her numuneye 1 mL su eklenmesine dayanır.</p> <p>Birimler, bir indirgeyici şeker analizine bağlı olarak dakika başına salınan umol ksilozudur.</p> | | | | | | |

ÖRNEK 5: Buluşa ait örnek bir ksilanazın üretilmesi

Aşağıdaki örnek, "9x" varyantı veya mutanıtı (SEK ID NO: 377'de belirtilen nükleik asit, SEK ID NO: 378'de belirtilen polipeptid dizisi gibi) olarak adlandırılan gen bölgesi doygunluk mutagenezi (GSSM) teknolojisi kullanılarak buluşun bir örnek ksilanazının üretilmesini tarif etmektedir.

GSSM, örnek SEK ID NO: 190, "vahşi tip" ksilanazda (SEK ID NO: 189 ile kodlanmış) kapsamlı bir nokta mutasyon kütüphanesi oluşturmak için kullanılmıştır. Yukarıda tarif edilen ksilanaz termotolerans taraması, vahşi tip enzime göre daha iyi termal toleransa (20 dakika boyunca 80 °C'de bir ısı yüklemesini takiben ölçüldüğü üzere) sahip olan dokuz tek alanlı amino asit mutanıtını (Şekil 6A) (D8F, Q11H, N12L, G17I, G60H, P64V, S65V, G68A & S79P) tanımlamıştır. Vahşi tip enzim ve tüm dokuz tek alanlı amino asit mutanıtı E. coli içinde üretildi ve bir N- terminalli heksahistidin etiketi kullanılarak saflaştırıldı. Etiketten dolayı etkinlikte fark edilebilir bir fark yoktu.

Şekil 6, "varyant 9x" in dokuz tek alanlı amino asit mutanıtını ya da örnek niteliğindeki DİZ İD NO: 190 "vahşi tip" enziminin (SEK ID NO: 189 ile kodlanmıştır) gen bölgesi doygunluk mutagenezi (GSSM) tarafından üretildiği gibi SEK ID NO: 378'de (SEQ İD NO: 377 ile kodlanmış) ortaya koyulduğu gibi göstermektedir. Şekil 6A, "vahşi tip"

genin (SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 189 ile kodlanan) termal tolerans noktası mutantları için pozisyonu, numaralandırmayı ve amino asit değişimini gösteren şematik bir diyagramdır. 64 kodonun tamamından oluşan bir kütüphane, gendeki her amino asit pozisyonu için üretildi (~ 13,000 mutant) ve termal toleransı arttıran mutasyonlar için tarandı. "9X" varyantı, tüm 9 tek alanlı mutantların bir enzime birleştirilmesiyle üretilmiştir. Her bir mutant enzim ve "9X" (SEK ID NO: 378) varyantı için Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile belirlenen ilgili erime sıcaklığı geçiş orta noktası (T_m) sağda gösterilmiştir. Şekil 6B, "vahşi tip" (SEK ID NO: 190) ve "9X" (SEK ID NO: 378) "varyantı / mutan" enzimlerinin açılmasının DSC tarafından 1 °C/dk'lık bir tarama hızında izlendiğini göstermektedir. Temel DSC verileri, protein konsantrasyonu için normalize edildi.

DSC ölçümleri, kopya halinde bir VP- DSC mikrokalerimetresi (Micro- Cal) kullanılarak yapıldı. Gerekli numune hacmi 540 µL idi . Protein konsantrasyonları pH 7.2 olan 50mM HEPES içinde 0.1 ila 0.5 mg / mL arasındaydı ve baz hattı kontrolleri için diyaliz tamponu muhafaza edildi. Her örnek 40 °C ila 110 °C arasında ısıtılmıştır. Numuneler ve / veya tampon ısıtılmış ve 90 °C / s'lik bir tarama hızında soğutulmuştur. Sistem kararlı bir duruma ulaşana kadar tampon tabanları birçok kez kaydedildi. T_m değeri, maksimum ısının yayımlandığı sıcaklık oldu.

Ksilanaz aktivite analizleri

Enzim etkinlikleri belirtilen sıcaklıklarda% 2 CP 550 αL substrat olarak azo- ksilan (sitrat- fosfat) tampon maddesi, pH 6.0, 400 αL kullanılarak belirlenmiştir. PH'ın bir fonksiyonu olarak aktivite ölçümleri, 0.1 M fosforik asit çözeltisi, 0.1 M borik asit ve 0.1 M asetik asidin karıştırılması ve ardından 1 M sodyum hidroksi ile pH'ın ayarlanması ile hazırlanan 50 mM Britton ve Robinson tampon çözeltileri (pH 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyonlar 50 α L 0.1 mg / ml saflaştırılmış enzimin eklenmesiyle başlatılmıştır. Zaman noktaları reaksiyon karışımının 50 αL reaksiyon karışımının 200αL çökeltme çözeltisine (% 100 etanol) ilave edildiği 0 ila 15 dakikalar arasında alınmıştır. Tüm zaman noktaları alındığında, numuneler karıştırılmış, 10 dakika süreyle inkübe edilmiş ve 3000 g'de 10 dakika süreyle 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant (150 αL) yeni bir 96 oyuklu plaka içine bölünmüş ve absorban 590 nm olarak ölçülmüştür. A_{590} değerleri zamana karşı çizilmiş ve başlangıç hızı çizginin eğiminden belirlenmiştir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC).

Kalorimetri, veri toplamak için DSCRun yazılım paketi, analiz için CpCalc, mikro wattan molar ısı kapasitesine dönüştürmek için CpConvert ve dekonvolüsyon için CpDeconvolute kullanılarak bir Model 6100 Nano II DSC aygıtı (Calorimetry Sciences Corporation, American Fork, UT) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz, 1 °C/dakikalık bir tarama hızında 20 mM potasyum fosfat (pH 7.0) ve 100 mM KCl'de 1 mg / ml rekombinant protein ile gerçekleştirilmiştir. Tüm DSC deneyleri sırasında, çözelti ısınırken olası gazın giderilmesini önlemek için sabit bir 5 atm basınç sağlanmıştır. Enstrümental temel, tampon ile doldurulmuş her iki hücre ile yapılan deneylerden önce rutin olarak kaydedildi. Termal olarak indüklenen geçişlerin tersinirliği, birinci çalışmanın soğutulmasından hemen sonra kalorimetre hücresindeki çözeltinin yeniden ısıtılmasıyla test edildi.

Termal toleransın belirlenmesi.

Bütün enzimler, 80 °C'de 20 mM potasyum fosfat (pH 7.0) ve 100 mM KCl'de termal tolerans açısından analiz edildi. Enzimler 80 °C'de 0, 5, 10 veya 30 dakika boyunca ince duvarlı tüplerde ısıtıldı ve buz üzerinde soğutuldu. Kalıntı aktiviteleri, aktivite ölçümü için yukarıda tarif edilen deney kullanılarak substrat olarak Azo- ksilan ile belirlenmiştir.

Polisakkarit Parmak İzi.

Polisakkarit parmak izleri, karbonhidrat jel elektroforezi (PACE) kullanılarak polisakkarit analizi ile belirlenmiştir. Beechwood ksilan (0.1 mg/mL, 100 µL, Sigma, Poole, Dorset, İngiltere) ya da ksilooligosakkaritlere (1 mM, 20 µL, Megazyme, Wicklow, İrlanda), toplam 250 µL'lik bir hacim içinde 16 saat boyunca enzim (1 - 3 µg) ile muamele edilmiştir. Reaksiyon, pH 5.5 olan 0.1 M amonyum asetat içinde tamponlandı. Enzimler, polisakkaritler / oligosakkaritler veya etiketleme reaktifleri içindeki herhangi bir spesifik olmayan bileşiği tanımlamak için substratlar veya enzimler içermeyen kontroller aynı koşullar altında gerçekleştirildi. Reaksiyonlar 20 dakika kaynatılarak durduruldu. Testler, her bir durum için bağımsız olarak en az 2 kez gerçekleştirildi. ANTS (8- aminonaftalin- 1,3,6- trisülfonik asit, Moleküler Problar, Leiden, Hollanda) kullanılarak türevlendirme, elektroforez ve görüntüleme anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir (Goubet, F., Jackson, P., Deery, M. ve Dupree, P. (2002) Anal. Biochem. 300:53- 68).

Uygunluğun Hesaplanması.

Verilen bir enzim varyantı (n) için uygunluk (F_n), denatürasyon sıcaklığı geçişi orta noktasındaki (T_m) eşit derecede ağırlık artışı ve enzimatik aktivitedeki her parametrede en büyük farklılığa göre artış (veya azalma) ile hesaplanmıştır: $F_n = F_{T_n} + F_{V_n}$, burada varyantın $F_{T_n} = T_m$ uygunluk faktörü ve F_{V_n} varyantın aktivitesinin uygunluğunun faktörüdür. Her biri için (T_m ve aktivite) uygunluk faktörleri, T_m 'deki en büyük fark veya tüm varyantlarda orana göredir. $F_{T_n} = (T_m - T_{mL}) / (T_{mH} - T_{mL})$ olup, burada T_{mL} belirli bir varyant (n) için T_m 'dir ve T_{mL} tüm varyantlar arasında en düşük T_m ve T_{mH} tüm varyantlar arasında en yüksek T_m 'dir, burada V_n belirli varyant (n) için görece oran ve V_L tüm varyantlar arasında en düşük hız ve V_H tüm varyantlar arasında en yüksek hızdır.

GSSM yöntemiyle evrim.

GSSM teknolojisi, buluşun SEK ID NO: 378 (SEK ID NO: 377 tarafından kodlanmış) örnek ksilanazı da dahil olacak şekilde **buluşun SEK ID NO: 190 (SEK ID NO: 189 tarafından kodlanmış) örnek ksilanazı**, kapsamlı bir nokta mutasyon kütüphanesi oluşturmak için kullanılmıştır. Yukarıda tarif edilen ksilanaz termotolerans taraması, örnek niteliğindeki "vahşi tip" enzim SEK ID NO: 190'a (SEK ID NO: 189 tarafından kodlanmış) göre daha iyi termal toleransa (20 dakika boyunca 80 °C'de bir ısı yüklemesini takiben ölçüldüğü üzere) sahip olan dokuz tek alanlı amino asit mutantları (Şekil 6A) D8F, Q11H, N12L, G17I, G60H, P64V, S65V, G68A & S79P tanımlamıştır. Vahşi tip enzim ve tüm dokuz tek alanlı amino asit mutantları E. coli içinde üretildi ve bir N- terminalli heksahistidin etiketi kullanılarak saflaştırıldı. Etiketten dolayı etkinlikte fark edilebilir bir fark yoktu.

Tekli amino asit mutasyonlarının enzimatik aktivite üzerindeki etkisini belirlemek için, dokuz mutantın tamamı saflaştırıldı ve bunların ksilanaz aktivitesi (vahşi tip sıcaklık optimumundaki 70 °C, başlangıç oranları) örnek SEK ID NO: 190 "vahşi tip" enzimininki ile karşılaştırıldı. Enzim aktiviteleri, D8F, N12L, G17I, G60H, P64V, S65V G68A ve S79P mutantları için vahşi tip (başlangıç oranı 1.0'a normalize edilmiştir) ile karşılaştırılabilir (sırasıyla ilgili başlangıç oranları 0.65, 0.68, 0.76, 1.1, 1.0, 1.2, 0.98 ve 0.84), bu mutasyonların enzimatik aktiviteyi önemli ölçüde değiştirmediklerini doğrulamaktadır. Başlangıç oranları 3 veya daha fazla kez ölçüldü ve varyans tipik olarak % 10'dan daha azdı. Bu sekiz mutanttan farklı olarak, en iyi termal tolerans, tek

bölge mutanı, Q11H (nispi başlangıç oranı 0.35) için enzimatik aktivitede dikkate değer bir azalma gözlemlenmiştir.

“Vahşi tip” ve termal toleranslı tek alanlı amino asit mutant enzimlerinin erime sıcaklığı (T_m).

5 Saflaştırılmış DİZ İD NO: 190 "doğal tip" ksilanaz ve dokuz termal toleranslı tek alanlı amino asit mutantları, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) kullanılarak analiz edildi. Bunun termal denatürasyonuna yönelik DSC izinde bir yamaç ile kanıtlandığı gibi vahşi tip enzim için toplanma açıkça görülmüştür, bakınız Şekil 6B. Gelişen mutant enzimler, toplanma belirtisi göstermedi. Tüm enzimler için, termal olarak indüklenen denatürasyon geri dönüşümsüzdü ve numunenin ikinci bir taramasında fark edilebilir bir geçiş gözlenmedi. Denatürasyonun tersinmezliği nedeniyle, sadece görünen T_m (erime sıcaklığı) hesaplanabilir (örneğin, Sanchez- Ruiz (1992) Biophys. J. 61: 921-935; Beldarrain (2000) Biotechnol. Appl. Biochem. 31:77- 84’Te’te açıklandığı gibi). Vahşi tip enzime ait T_m 61 °C iken, tüm nokta mutantlara ait T_m ’ler artırılmış ve 64 °C 10 ila 70 °C arasında de ğişmiştir (Şekil 6A). Q11H mutasyonu, vahşi tipte en büyük artışı (T_m = 70 °C), ardından P64V (69 °C), G17I (67 °C) v e D8F’yi (67 °C) ortaya çıkarmıştır.

“9X’ kombine GSSM örnek enzim SEK ID NO: 378

“9X” enzimi (SEK ID NO: 378), dokuz adet termal toleranslı yukarı- mutantın tek- alan de ğişikliklerini birleştirme yoluyla alan hedefli mutagenез (Şekil 6A) ile yapılandırılmıştır. “9X” (SEK ID NO: 378) enzimi E. coli içinde eksprese edilmiş ve 20 homojenlik için saflaştırıldı. DSC, erime sıcaklığını belirlemek için gerçekleştirildi. “9X” enziminin T_m’si, SEK ID NO: 190’dan 34 derece daha yüksekti, bu da "vahşi tip" enzimin, termal stabilitesinde dramatik bir de ğişim olduğunu gösterir (Şekil 6B).

Kombine mutasyonların ve yüksek erime sıcaklığının enzimin biyokimyasal özellikleri 25 üzerindeki etkisini de ğerlendirmek için pH ve sıcaklık profilleri oluşturuldu ve "vahşi tip" enzim olan SEQ İD NO: 190 ile karşılaştırıldı. Şekil 7, "vahşi tip" ve "evrimleşmiş" 9X mutant enzimlerinin biyokimyasal karakterizasyonunu göstermektedir. Şekil 7A, vahşi tip ve evrimleşmiş 9X mutant enzimleri için aktivitenin pH ba ğımlılığını göstermektedir. Ksilanaz aktivitesi, her pH’da 37 °C’de ölçüldü ve başlangıç hızlarını belirlemek için 30 başlangıç hızı 590 nm’de absorbansa karşı çizildi. Şekil 7B, vahşi tip ve evrimleşmiş 9X mutant enzimleri için aktivitenin sıcaklığa ba ğımlılığını göstermektedir. Vahşi tip ve 9X mutant enzimlerin optimum sıcaklıkları, pH 6.0’da 25- 100 °C’lik bir sıcaklık

aralığında ölçüldü ve 5 dakika boyunca ölçülen başlangıç hızlarına dayanıyordu. Şekil 7, "vahşi tip" ve "evrimleşmiş" 9X mutant enzimlerinin termal stabilitesini göstermektedir. Vahşi tip ve evrimleşmiş 9X mutant enzimlerinin aktivitesinin termal bağımlılığı, ilk önce enzimlerin belirtilen sıcaklıkların her birinde 5 dakika süreyle ısıtılarak, ardından oda sıcaklığına soğutulmuş ve kalıntı aktivitesinin ölçülmesiyle ölçüldü (başlangıç oranı 37 °C'de, pH 6.0). Her deney için dene y başlangıç hızları 2 veya daha fazla kez ölçüldü ve varyasyon % 10'dan daha az oldu.

SEK ID NO: 190 ve SEK ID NO: 378 ("9X" mutanı) enzimi, pH 5 ve 6 arasında en yüksek aktiviteli karşılaştırılabilir pH / aktivite profillerine sahipti (Şekil 7A) . Her iki enzim de 70 °C'de benzer başlangıç hızı / sıcaklık optimum değerlerine sahiptir, ancak SEK ID NO: 190, "vahşi tip" enzim daha düşük sıcaklıklarda (25- 50 °C) daha yüksek aktiviteye sahipken, SEK ID NO: 378 ("9X" mutanı), substratın varlığında 100 °C'ye kadar (başlangıç oranı ile belirlenen) aktivitesinin% 60'ından fazlasını korudu (Şekil 7B). SEK ID NO: 190'ın, "vahşi tip" enzimin aktivitesi, 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda saptanamadı.

9 kombine mutasyonun enzim termal toleransı üzerindeki etkisini belirlemek için kalıntı aktivitesi ölçüldü ve SEK ID NO: 190, "vahşi tip" enzim ile karşılaştırıldı. Kalıntı aktivitesi, her sıcaklıkta (37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C) 5 dakika boyunca bir ısı yüklemesi ile ve ardından 37 °C'de aktivite ölçümleriyle belirlendi. SEK ID NO: 190, 70 °C'nin üzerinde tamamen etkisiz hale getirilmiş iken, evrim geçirmiş 9X mutanı, 70, 80 ve hatta 90 °C'de ısıtıldıktan sonra önemli bir aktivite sergilemiştir (Şekil 7C). Ayrıca, vahşi tip enzimin aktivitesi, artan sıcaklıkla azalmasına rağmen, 9X varyantı, 60 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda ısıtılarak biraz aktive edildi.

GeneReassembly teknolojisi kullanılarak kombinasyonel GSSM varyantlarının üretilmesi.

Ek olarak yapılandırılmış SEK ID NO: 378 ("9X" mutanı) ile karşılaştırıldığında en yüksek termal tolerans ve aktiviteye sahip olan 9 tek alanlı amino sit mutantlarının kombinasyonel varyantlarını tanımlamak için bir GeneReassembly kütüphanesi (ABD Patenti No. 6,537,776) oluşturulmuş ve taranmıştır. Tarama kriteri olarak termal tolerans kullanılarak, orijinal 9X varyantı olarak dokuz mutasyonun 33 benzersiz kombinasyonu tanımlandı. Evrimleşen 9X'ten daha yüksek aktiviteye / ekspresyona sahip varyantları seçmek için ikincil bir tarama yapıldı. Bu tarama, Şekil 8A'da

gösterildiği gibi, çeşitli kombinasyonlardaki orijinal tekli mutasyonların 6 ve 8'i arasındakilere sahip sekanslar içeren 10 varyant verdi. Şekil 8, GeneReassembly teknolojisi kullanılarak tanımlanan kombinasyonel varyantları göstermektedir. Şekil 8A, gelişmiş termal tolerans ve aktiviteye sahip varyantlar için yapılan ve taranan 9 GSSM nokta mutasyonunun tüm olası kombinasyonlarının GeneReassembly kütüphanesini göstermektedir. 9X varyantını içeren on bir varyant elde edildi. Şekilde gösterildiği gibi, varyantlar çeşitli kombinasyonlarda 6, 7, 8 veya 9 nokta mutasyonlarına sahipti. Her bir varyantın DSC'si tarafından belirlenen ilgili erime sıcaklığı geçiş orta noktası (T_m) sağda gösterilmiştir. Şekil 8B, sıcaklık optimum (70 °C) ve pH 6.0'da vahşi tiple karşılaştırıldığında 6X- 2 ve 9X varyantlarının ilgili aktivitesini (5 dakikalık bir zaman periyodu boyunca ölçülen başlangıç hızını) göstermektedir. Hata çubukları, 3 ölçüm için başlangıç hızındaki aralığı gösterir.

Kombinasyonel varyantların her birinin erime sıcaklığı (T_m), vahşi tipinkinden (Şekil 8A) en az 28 °C daha yüksekti ve yeniden birleştirme varyantlarının tümü, 9X enziminden daha yüksek ilgili aktiviteye sahipti. Özellikle bir varyantın, 6X- 2'nin aktivitesi, vahşi tip enzimden daha büyüktü ve 9X enziminden belirgin olarak daha iyi (1.7 kat) idi (Şekil 8B). Yeniden birleşme varyantlarının sekans karşılaştırması, en az 6 mutasyonda belirlendi, bunlara artırılmış termostabilite (>20 derece) için ihtiyaç duyuldu. İlk termostabilite taramasında bulunan 33 benzersiz varyantın ikisi de termal tolerans için bunların önemini gösteren Q11H ve G17I mutasyonlarını içeriyordu.

Vahşi tip ve varyant polisakkarit ürün parmak izlerinin analizi.

"Vahşi tip", 6X- 2 ve 9X varyantları tarafından üretilen ürünler, karbonhidrat jel elektroforezi (PACE) kullanılarak polisakkarit analizi ile karşılaştırılmıştır. Farklı substratlar (oligosakkaritler ve polisakkaritler), ksilanazlar tarafından hidroliz için test edilmiştir. Test edilen 3 ksilanazın sindirim ürünleri, Şekil 9'da gösterildiği gibi çok benzerdi. Hidrolize edilmiş üç enzim (Ksil)₆ ve (Ksil)₅, esas olarak her ikisi de (Ksil)₃ ve (Ksil)₂, ve (Ksil)₄, (Ksil)₂'ye hidrolize edildi (Şekil 9A). (Ksil)₃'ün (Ksil)₂'ye ve Ksil'e sadece az miktarda hidrolizi gözlenmiştir, bu da (Ksil)₃'ün enzim için nispeten zayıf bir substrat olduğunu göstermektedir. (Ksil)₂'de aktivite tespit edilmedi. Glukuronosil kalıntılarını ihtiva eden beechwood ksilan, üç enzimin tamamı tarafından esas olarak (Ksil)₂ ve (Ksil)₃'e hidrolize edildi, ancak oligoksilan bantları arasında göç eden başka bantlar tespit edildi (Şekil 9B). PACE analizinde, her oligosakkarid, şeker kompozisyonuna ve polimerizasyon derecesine bağlı olarak spesifik bir göçe sahiptir

(Goubet, F., Jackson, P., Deery, M. ve Dupree, P. (2002) Anal. Biochem. 300, 53- 68), bu nedenle, bu bantlar muhtemelen oligoglukuronoksilazlara tekabül eder. Bu nedenle, evrimleşmiş enzimler "vahşi tip" enzimin substrat özgüllüğünü korumuştur.

Yukarıda belirtildiği gibi, Şekil 9, "vahşi tip" SEK ID NO: 190 (SEK ID NO: 189 ile kodlanmış), 6X- 2 (SEK ID NO: 380, SEK ID NO: 379 ile kodlanmış) ürün parmak izlerini ve SEK ID NO: 378 ("9X" mutant) enzim varyantı, PACE tarafından belirlendiği gib olduğunu gösterir. Şekil 9A, oligoksilanların (Ksil)₃, (Ksil)₄, (Ksil)₅ ve (Ksil)₆'nın "vahşi tip" ve varyant enzimlerle hidrolizinden sonra elde edilen parmak izlerini gösterir. Kontrol şeritleri, enzim yokluğunda analiz koşulları altında inkübe edilen oligosakkarit içerir. Şekil 9B, vahşi tip ve varyant enzimlerle Beechwood ksilanın hidrolizinden sonra elde edilen parmak izlerini gösterir. Standartlar (Ksil)₂, (Ksil)₃, (Ksil)₄ içerir. Bütün analizler 37 °C'de ve pH 5.5'te gerçekleştirildi.

Bir kaç endüstriyel pazar uygulamasında proses uyumluluğu için optimize edilmiş yüksek derecede aktif, termostabil bir ksilanazı hızlı bir şekilde üretmek için laboratuvar geni evrim stratejilerinin bir kombinasyonu kullanılmıştır. GSSM metodolojisi, örnek "vahşi tip" ksilanaz SEK ID NO: 190'nın (SEK ID NO: 189 tarafından kodlanmış) tüm dizisini taramak ve bunun termal toleransını arttıran 9 nokta mutasyonunu tanımlamak için kullanılmıştır. Şekil 9'da gösterildiği gibi enzimin hidroliz ürün profili üzerinde ayırt edilebilir bir etkisi olmamasına rağmen, protein dizisine 9 mutasyonun eklenmesi, SEK ID NO: 190'nın ("vahşi tip") optimum sıcaklığındaki enzimatik spesifik aktivitede orta şiddette bir azalma ile sonuçlanmıştır. 70 °C, bakınız Şekil 9B. 9 tek alanlı amino asit mutantlarının bir kombinasyonel kütüphanesini oluşturmak için GeneReassembly yöntemini kullanarak, bu aktivitedeki azalma aşıldı. "9X" varyantından daha iyi aktiviteye sahip on adet termostabil varyant (T_m'ler 89 °C ve 94 °C arasında), GeneReassembly kütüphanesinin taranmasından elde edildi. 90 °C'lik bir T_m ile, vahşi tipin üstündeki enzimatik spesifik aktivite ve bir ürün parmakizi değiştirilmemiştir ve SEK ID NO: 190 ("vahşi tip") ile karşılaştırıldığında, 6X- 2 varyantı (SEK ID NO: 380, SEK ID NO: 379 tarafından kodlanmış) özellikle dikkate değerdir. Bildiğimiz kadarıyla bu varyantlar için elde edilen T_m değişimi, yönelimli evrim teknolojilerinin uygulanmasından bildirilen en yüksek artıştır.

SEK ID NO: 380 (6X- 2 varyantı) SEK ID NO: 190 ("vahşi tip") ile karşılaştırıldığında aşağıdaki değişiklikleri içerir: D8F, Q11H, G17I, G60H, S65V ve G68A. SEK ID NO: 379 "vahşi tip" SEK ID NO: 189 ile karşılaştırıldığında aşağıdaki nükleotid

değişikliklerini içerir: 22 ila 24 pozisyonlarındaki nükleotitler TTC'dir, 31 ila 33 pozisyonlarındaki nükleotitler CAC'dir, 49 ila 51 pozisyonlarındaki nükleotitler ATA'dır, 178 ila 180 pozisyonlarındaki nükleotitler CAC'dir, 193 ila 195 pozisyonlarındaki nükleotitler GTG'dir, 202 ila 204 pozisyonlarındaki nükleotitler GCT'dir.

- 5 Nokta mutantlarının arzu edilen fenotipe eklenmesine karşı kombinasyonel karıştırmanın etkinliğini ölçmek için, her bir mutanta yönelik hem enzim aktivitesindeki değişiklikler hem de termostabilite katkılarını birleştiren bir uygunluk parametresi hesaplanmıştır. Burada belirtildiği üzere uygunluk terimi, diğer enzimlerle karşılaştırılabilecek objektif bir ölçüm değildir, ancak bu özel ksilanazın yönlendirilmiş
- 10 evriminin başarısının ölçülmesini sağlayan bir terimdir. Enzim uygunluğu (F) bu varyant grubu için T_m ve enzim aktivitesindeki eşit ağırlık değişimleri ile hesaplandığından, izin verilen maksimum uygunluk değeri 2'dir ($F_T \leq 1$ ve $F_V \leq 1$, yukarıya bakınız). Diğer bir deyişle, en iyi aktiviteye sahip varyantın da en yüksek T_m 'ye sahip olması durumunda, uygunluk değeri 2 olacaktır. 2'ye yakın bir uygunluk değeri ile (Şekil 10B'ye bakınız),
- 15 6X- 2 varyantı (SEK ID NO: 380, SEK ID NO: 379 tarafından kodlanmış), en iyi termal stabilite ve enzim aktivitesi kombinasyonuna sahip olmaya en yakındır. En yüksek uygunluk değerini veren tek alanlı mutasyon S65V'dir. Her ne kadar S65V mutantının T_m 'si Q11H mutantınıninkinden daha düşük olsa da (sırasıyla 66 °C ve 70 °C), spesifik aktivitesi vahşi tipe göre azaltılmadığı için daha yüksek bir uygunluk değerine sahiptir.
- 20 Şekil 10A, GSSM evrimi ile elde edilen "vahşi tip" üzerindeki termal stabilite seviyesini (T_m ile temsil edilen) gelişimini gösteren bir şematik diyagramdır. Tek alanlı amino asit mutanlığı ve en yüksek termal kararlılığa sahip olan kombinasyonel varyant (sırasıyla Q11H ve "9X" (SEK ID NO: 378)) vahşi tipe karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Şekil 10B, GSSM ve GeneReassembly teknolojilerini birleştirerek elde edilen enzim
- 25 geliştirmesinin bir "uygunluk diyagramını" göstermektedir. Uygunluk, $F = F_T + F_V$ formülü kullanılarak belirlendi; burada, uygunluk (F), yukarıda tarif edildiği gibi, termal tolerans uygunluğu (F_T) ve nispi aktivite uygunluğu (F_V) ile eşit olarak ağırlıklandırılarak hesaplandı. En yüksek uygunluğu (S65V) veren nokta mutasyonu gösterilmektedir. 9 nokta mutasyonun tamamını birleştirmek de uygunluğu arttırmıştır
- 30 (SEK ID NO: 378, "9X" varyantı). Bununla birlikte, en iyi varyant olan 6X- 2'yi (SEK ID NO: 380) elde etmek için GSSM ve GeneReassembly yöntemlerinin bir araya getirilmesiyle uygunluk açısından en büyük iyileştirme elde edilmiştir.

GeneReassembly yöntemi aynı zamanda geliştirilmiş termal stabilite için gerekli olan önemli kalıntıların tanımlanmasını sağlamıştır. Termal tolerans temelinde tanımlanan her bir GeneReassembly varyantındaki iki anahtar kalıntı, Q11H ve G17I mevcuttu (Şekil 6A'ya bakınız). Proteinlerin termal stabilitesi için yapısal belirleyiciler üzerinde çalışılmıştır ve örneğin Kinjo (2001) Eur tarafından çeşitli teoriler belgelenmiştir. Biophys. J. 30: 378- 384; Britton (1999) J. Mol. Biol. 293: 1121- 1132; Ladenstein (1998) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 61: 37- 85; Britton (1995) Eur. Biochem. 229: 688- 695; Tanner (1996) Biochemistry 35: 2597- 2609; Vetriani (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2300- 2305. Hidrojen bağlanma şekilleri, iyonik etkileşimler, hidrofobik ambalajlama ve yüzey döngülerinin azalması, her birinin protein stabilitesine katkısı tam olarak anlaşılmasa bile, temel faktörler arasındadır. Tüm olası tek amino asit ikamelerinin test edilmesinden belirlenen faydalı nokta ikamelerinin çoğunun, daha büyük hidrofobik artıklar için nispeten polar, yüklü veya küçük (glisin) tortuların yer almasını içerdiği göz önüne alındığında, hidrofobik etkileşimlerin bu proteinin termostabilitesinin artırılmasında en önemli rolü oynadığı sonucuna varılabilir. Termal toleransı arttırmak için optimal etkileşimlerin iyi anlaşılmasıyla bile, bu etkileşimleri meydana getiren mutasyonların nerede yapılacağı tahmin edilmesi kolay değildir. Bununla birlikte, GSSM yöntemini kullanan bir akıl dışı yaklaşım, tüm yan zincirlerin bir protein yapısı içindeki tüm pozisyonlarda hızlı örneklenmesine izin verir. Böyle bir yaklaşım, öngörülemeyen işlevsel etkileşimleri ortaya çıkaran amino asit ikamelerinin keşfine yol açmaktadır.

ORNEK 6: Buluşun ksilanazları ile kağıt küspesinin ön işleme tabi tutulması

Buluşun ksilanazları, kağıt küspesini ya da geri dönüştürülmüş kağıdı veya kağıt küspesini ve benzerlerini işlemek / ön işleme tabi tutmak için kullanılır. Buluşun enzimi (leri), kağıt küspesinin ya da dönüştürülmüş kağıdın veya kağıt küspesinin ve benzerlerinin işlenmesinde / ön işleme tabi tutulmasında kullanımları yoluyla kağıdın "parlaklığını" arttırmak için kullanılır.

Buluşun ksilanazları, Kappa sayısını azaltmak üzere kağıt küspesini ya da geri dönüştürülmüş kağıdı veya kağıt küspesini ve benzerlerini işlemek / ön işleme tabi tutmak için kullanılır.. Kappa sayısı, kağıdın ilgili lignin içeriğini gösteren sayısal bir değer olarak tanımlanır - Kappa sayısı ne kadar yüksekse, lignin içeriği o kadar yüksektir. Öğütme denemelerimizde, bu buluşa ait ksilanazlara ait Kappa #deki örneğin, SEK ID NO: 381/382 (yani, örn., SEK ID NO: 381 ile kodlanmış SEK ID NO:

382 sekansına sahip enzim kullanılarak) ve SEK ID NO: 481/482 muamelesi ile 1- 2 puanlık bir içerik azalması gözlemledik. Bazı yaklaşımlarda, Kappa # 'daki bu azalma, ağartılmamış kağıt hamuru (kappa # 70 - 90) işlendiğinde, daha sonra örneğin mukavva imalatındaki gibi işleme için kullanıldığında yarar sağlar. Bazı yaklaşımlarda, Kappa'da X kademesi boyunca bir azalma, pişirmede ya da daha yüksek bir Kappa #'ye pişirmede daha düşük bir alkali kullanımına olanak sağlar. Bazı yaklaşımlarda bu, daha yüksek küspe dayanımı, daha az makine inceltme ve daha yüksek makine hızları ile sonuçlanır. Bazı yaklaşımlarda, bu tür sonuçlar, layner karton öğütücülerinde parçalayıcı katkı maddeleri (sümfaktanlar) kullanılarak görülür; bu, çözeltinin daha iyi penetrasyonuna olanak sağlayabilir ve daha yüksek küspe dayanımına, daha düşük arıtmaya (hamuru öğüterek kağıt yapımına uygun hale getirme) ve makine hızında 200 fpm (dakika başına düşen feet) artışa neden olan daha düşük etkili alkali yükü sağlayabilir.

Bu örnek, bir ksilanazın kağıt küspesinin ön işleminde, örneğin, Kraft kağıt küspesinin ön- işlemden geçirilmesinde kullanıldığında ağartma kimyasallarının (örneğin, klorin dioksit, ClO_2) kullanımını azaltmada yararlı olup olmadığını belirlemek için örnek bir rutin tarama protokolünü tarif etmektedir.

Tarama protokolü iki alternatif test parametresine sahiptir: Oksijen delignifikasyon adımından sonra (O_2 küspesi sonrası) ksilanaz muamelesinin etkisi; ve ksilanazın oksijen delignifikasyonu (O_2 öncesi kahverengi yığın) içermeyen bir işlemdeki etkisi.

Kağıt hamuru veya kağıt işleme koşulları, endüstriyel durumlarda, örneğin fabrikalarda, örneğin pH 8.0 civarında, 70 °C; 60 dk. proses koşullarını simüle eder. Örneğin, böyle bir işlem Şekil 11'deki Akış Şemasında şematik olarak gösterilmiştir; ayrıca Şekil 14'e bakınız. Bununla birlikte, böyle bir yöntemle ait bir işlemin koşulları, kullanılan buluşun örnek enzimine (enzimlerine) ve işlemin amacına bağlı olarak herhangi bir sıcaklığa, zaman süresine ve / veya pH'a ayarlanabilir; örneğin, buluşa ait çeşitli kağıt ve kağıt küspesi işlemlerinde pH'ı ayarlamak için çeşitli yollar vardır:

- asit ve / veya baz ekleme:
- Hidroklorik asit (HCl)
- Sodyum hidroksit (NaOH)
- H_2SO_4 (sülfürik asit)

- NaHSO₄ (sodyum hidrojen sülfat)
- H₂SO₃ (sülfüröz asit)
- H₃PO₄ (fosforik asit)
- HF (hidroflorik asit)
- 5 ▪ CH₃CO₂H (asetik asit)
- H₂CO₃ (karbonik asit)
- H₂S (hidrojen sülfat)
- NaH₂PO₄ (sodyum dihidrojen fosfat)
- NH₄Cl (amonyum klorit)
- 10 ▪ HCN (hidrosiyamik asit)
- Na₂SO₄ (sodyum sülfat)
- NaCl (sodyum klorür)
- NaCH₃CO₂ (sodyum asetat)
- NaHCO₃ (sodyum bikarbonat)
- 15 ▪ Na₂HPO₄ (sodyum hidrojen fosfat)
- Na₂SO₃ (sodyum sülfite)
- NaCN (sodyum siyanür)
- NH₃ (sulu amonyak)
- Na₂CO₃ (sodyum karbonat)
- 20 ▪ Na₃PO₄ (sodyum fosfat)
- Gazda kabarcıklanma, örn. CO₂ (suda çözüldüğünde bir asit oluşturur)

Bu koşullar altında aktif olan biyokimyasal testlerle 20 ksilanaz tespit edildi. 20 ksilanazdan 6'sı, kimyasal olarak ağartılmadan önce Kraft küspesini önceden işlemek için kullanıldığında ClO₂ talebini önemli ölçüde azaltabilmiştir. Altı tanesi: SEK ID NO: 182 (SEK ID NO: 181 tarafından kodlanmış); SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış); SEK ID NO: 198 (SEK ID NO: 197 tarafından kodlanmış); SEK ID NO: 168 (SEK ID NO: 167 tarafından kodlanmış); SEK ID NO: 216 (SEK ID NO: 215 tarafından kodlanmış); SEK ID NO: 260 (SEK ID NO: 259 tarafından kodlanmış).

Diğerleri biraz aktivite gösterdi ama yeterince iyi değildi. Ksilanazlar SEK ID NO: 182 (SEK ID NO: 181 tarafından kodlanmış) ve SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış) modülerdir ve ksilanaz katalitik etki alanına ek olarak bir karbonhidrat bağlama modülü içerir. Sadece katalitik etki alanı içeren bu 2 ksilanazın ucu kesik türevlerinin bu uygulamada daha etkili olduğu gösterilmiştir. En iyi ksilanaz, SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış) daha kapsamlı olarak incelenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 2 birim/g SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış) içeren O₂ sonrası ladin / çam / köknar (SPF) küspesinin ön muamelesi, % 65 GE parlaklığa ulaşmak için sonrasındaki ClO₂ kullanımını % 22 kadar azaltır;
- 0.5 birim/g SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış) içeren O₂ öncesi kahverengi yığın SPF'nin ön muamelesi, % 65 GE parlaklığa ulaşmak için sonrasındaki ClO₂ kullanımını % 13 kadar azaltır;
- 0.5 birim/g SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış) içeren O₂ öncesi Aspen küspesinin ön muamelesi ClO₂ kullanımını en az % 22 kadar azaltır;
- 0.5 birim/g SEK ID NO: 160 (SEK ID NO: 159 tarafından kodlanmış) içeren O₂ öncesi Douglas Fir / Hemlock küspesinin ön muamelesi, ClO₂ kullanımını en az % 22 kadar azaltır;
- kullanılan tedavi koşulları altında, ksilanaz tedavisinden elde edilen verimdeki azalma, aynı kappa faktöründe ağartılmış ancak ksilanaz ile muamele edilmemiş küspe ile karşılaştırıldığında % 0.5'i geçmemiştir;
- O₂ sonrası SPF küspesine SEK ID NO'lar:159, 160 ile muamele etmek için en uygun koşullar: pH 6- 7, enzim dozu 0.3 birim/g, muamele süresi 20- 25 dakikadır. Bu şartlar altında, % 69 GE parlaklığına ulaşmak için ClO₂ kullanımında % 28'lik bir azalma mümkün olmuştur.

Diğer deneylerde:

SEK ID NO: 160 (XYLA), SEK ID NO: 159 tam uzunlukta vahşi tip ksilanazı ile kodlanmıştır.

- XYLA (E.c) = E.coli'de eksprese edilen sadece ksilanaz katalitik etki alanı içeren SEK ID NO'lar: 159, 160'ın kesilmiş varyantı
- XYLA (P.f) = ditto fakat P. Fluorescens'de'de eksprese edilir.

SEK ID NO: 182, (SEK ID NO: 181 ile kodlanmıştır) = ikinci tam uzunlukta vahşi tip ksilanazı:

- XYL B (E.c) = tepesi kesilmiş etc, E.coli'de eksprese edilen etc
- XYL B (P.f) = ditto fakat P. Fluorescens'de'de eksprese edilir.

5 **On O₂ Kahverengi Yığın üzerinde Öncü Ksilanazlar için Doza Yanıt Verileri**

Ksilanaz aşaması (X - aşaması) için koşullar aşağıdaki gibidir:

pH 8

Sıcaklık 70 °C

Süre 60 dk

10 Kappa faktörü 0.24

Enzim kontrolü olmaması için kappa faktörü 0.30 idi.

Sonuçlar ksilanazla muamele edilmiş numuneler için daha düşük bir klor dioksit (ClO₂) yükünde, parlaklıkta doza bağlı bir artış gösterdi (Kf 0.24 karşı Kf 0.30).

Her durumda, kesilmiş türevin tam uzunlukta ksilanazdan daha etkili olduğu görülmüştür. Optimal ksilanaz dozu yaklaşık 0,6 ila 0,7 U / g küspesi olarak görüldü.

En iyi 4 Ksilanaz ile Kıtalar arası On - O₂ Kahverengi Yığının Ön Muamelesi

D₀ içindeki ClO₂ Doz Yanıtının Belirlenmesi

Deneysel anahat

- On O₂ Kahverengi Yığın
- 20 • İlk kappa 31.5
- X aşaması koşulları
- Ksilanaz yükü 0.7 U/gm
- Sıcaklık 70 °C
- pH 8
- 25 • muamele süresi 1 saat
- küspe kıvamı % 10
- Ağartma sekansı XDE_p

◦ Kappa faktörü 0.22, 0.26 ve 0.30 (küspe üzerinde % D): 2.63, 3.12 ve 3.60)

Kappa faktörüne (ClO₂ yükü) karşı 3 aşamalı ağartıcı sekansından sonra nihai parlaklık:

- 5 • XYLB - 61,5 nihai parlaklıkta, X- aşaması, kağıt hamurunda ClO₂ kullanımının 3,89 kg / ton azaltılmasını sağlar.
- XYLB (E.c.) - 61,5 nihai parlaklıkta, X- aşaması, kağıt hamurunda ClO₂ kullanımının 4.07 kg / ton azaltılmasını sağlar.
- XYLA - 61,5 parlaklıkta X- aşaması, kağıt hamurunda ClO₂ kullanımında 4.07 kg / tonluk bir azalma sağlar.
- 10 • XYLA (E.c.) - 61,5 nihai parlaklıkta, X- aşaması, kağıt hamurunda ClO₂ kullanımının 4,90 kg / ton azaltılmasını sağlar.

| Enzim | D ₀ 'daki ClO ₂ Kazanımları (kg/ton OD) | D ₀ 'da indirgenmesi | Kf'nin |
|------------|---|---------------------------------|--------|
| XYLB | 3.89 | % 11.7 | |
| XYLB (E.c) | 5.08 | % 15.8 | |
| XYLA | 4.07 | % 12.2 | |
| XYLA (E.c) | 4.90 | % 14.7 | |

D₀ içindeki ClO₂ Doz Yanıtının Belirlenmesi:

15 Ksilanaz 0.7 U / g, pH 8.0, 70 °C, 1 saat

Hamur: O₂ Öncesi Brownstock, ilk kappa 31.5

ClO₂'nin yüzdeler tasarrufu sektör için oldukça önemsizdir. Başlıca endişeleri, ton OD hamuru başına gerekli olan ClO₂'nin lbs'dir. Bir yüksek bir başlangıç kappa Brownstock ile görülen düşük bir yüzde tasarrufunun, hedef parlaklığa ulaşmak için ClO₂'nin daha düşük bir toplam yükünü gerektirecek olan düşük bir başlangıç kappalı küspe için daha

20

yüksek bir yüzdece azalmadan ClO_2 'nin lbs'si bakımından daha değerli olabildiğini dikkate aldığında, anlamlı hale gelir.

Ağartılmış Kontrol Küşpesi için Parlaklık, Verim ve Kappa Faktörü Arasındaki İlişki:

- 5 Sonuçlar, daha yüksek hedef parlaklığa ulaşmak için ClO_2 'nin artan dozları ile ağartmanın, hamur veriminde artan bir kayıpla sonuçlandığını göstermiştir. Bu bir sorundur, çünkü sürecin bu aşamasında hamur ton başına 400 \$ 'lık bir değere sahiptir ve selüloz kaybı paraya mal olmaktadır.

- 10 Ksilanazın bir yararı (örneğin, buluşun bir ksilanazı), daha düşük bir ClO_2 dozunun kullanılmasının, ksilanazın etkisinin kazanımı iptal etmediği sürece, verim kayıplarını azaltabilmesidir.

Ksilanaz XYLB (P.f.) ile On- O₂ Brownstock'un On İşlemi için Doza Yanıt Verileri:

Deneysel Anahat

- Northwood On- O₂ Brownstock
- 15 o İlk kappa 28.0
- o İlk kıvam % 32.46
- o İlk parlaklık 28.37
- X aşaması koşulları
- o Ksilanaz yükü 0 ila 2.70 U / gm
- 20 o Sıcaklık 58 °C ila 61 °C arasında
- o pH 8.2 ila 8.5 arasında
- o Muamele süresi 1 saat
- Ağartma sekansı XDEp
- o Kapa faktörü 0.24
- 25 • 0.25 ve 0.30 arasındaki Kappa faktörleri için hesaplanan ClO_2 tasarrufu

Bu deneyin amacı, yıkanmamış SPF brownstock'u üzerindeki 4 ksilanın en iyisini değerlendirmektir. Sonuçlar, XYLB (E.c.) ile muamele edilen küspe için nihai parlaklıkta doza bağlı artışlar gösterdi, 0.24'lük daha düşük Kf değerinde ksilanaz

mevcudiyetinde elde edilen parlaklık, daha yüksek Kf 0.30 asimptotik olarak elde edilen parlaklığa yaklaştı.

Ksilanaz XYLB (E.c.) ve Klor Dioksit Tasarrufu (On- O₂ Brownstock) Dozları Arasındaki İlişki:

- 5 Optimum Ksilanaz Dozu, 0,5 ile 0,9 U / gm arasındadır. Optimum doz, 0,5 ila 0,9 U / g aralığındadır. Bu dozun üstünde, ksilanazın birim artışı başına azalan bir geri dönüş var. Bu büyüklükte işlenen küspe tonu başına klorin dioksit dozundaki azalmalar ticari olarak önemlidir.

| % OD Küspesi içindeki ClO ₂ Kazanımları | Küspe içindeki ClO ₂ Kazanımı (kg/ton) | U/gm cinsinden Ksilanaz Dozu |
|--|---|------------------------------|
| % 0.299 | 2.99 | 0.31 |
| % 0.363 | 3.63 | 0.51 |
| % 0.406 | 4.06 | 0.71 |
| % 0.439 | 4.39 | 0.91 |
| % 0.483 | 4.83 | 1.26 |
| % 0.523 | 5.32 | 1.80 |
| % 0.587 | 5.87 | 2.70 |

10

Üç aşamalı biyo- ağartma prosedürü

- Üç aşamalı bir biyo- ağartma prosedürü, bu buluşun en az bir enzimini içerir. Bu örnek niteliğindeki üç aşamalı biyo- ağartma prosedürü, bir kağıt hamuru değirmeni ağartma tesisindeki fiili ağartma işlemlerini yakından taklit etmek üzere geliştirilmiştir (bakınız Şekil 11). Bu ağartma sekansı, (X)DoEp ile adlandırılmakta olup, X ksilanaz işleme aşamasını, D klorin dioksit ağartma aşamasını ve Ep, alkalin peroksit ekstrasyon aşamasını temsil eder. Uygulama testlerimizde kullanılan ana hammadde Southern Softwood Kraft Brownstock'du (oksijen delignifikasyonu olmadan).

Biyo- ağartma deneylerinde yüksek ağartıcı kimyasal indirgeme potansiyeli gösteren en etkili ksilanaz adayları (buluşa göre olan enzimler) ayrıca iki sert ağaç kraftı (akçaağaç ve kavak) türü üzerinde de test edilmiştir. Her bir biyo- ağartma turunun tamamlanmasının ardından, elde edilen kağıt hamuru, TAPPI (Kağıt Hamuru ve Kağıt

5 Endüstrileri Teknik Birliği, dünya çapında kağıt hamuru, kağıt ve dönüştürme endüstrisi için teknik birlik) - standart test amaçlı elle yapılan tek bir kağıt sayfası üretmek için kullanıldı. Her bir test amaçlı elle yapılan tek bir kağıt sayfasının % GE parlaklığı ölçüldü ve parlaklık değerleri enzimatik ön- muamele aşaması (X) sırasında her bir enzimin ne kadar iyi hamuru yaptıklarının göstergesi olarak kullanıldı.

10 **Sonuçlar:**

Yaklaşık olarak, (X)DoEp biyo- ağartma sekansı kullanılarak taranmış 110 ksilandan 4 enzim, yani XYLA (P.f); XYLB (P.f); SEK ID NO: 216 (SEK ID NO: 215 tarafından kodlanmış); SEK ID NO: 176 (SEK ID NO: 175 tarafından kodlanmış) ağartma kimyasallarının kullanımını azaltmak için en büyük potansiyeli göstermiştir. XYLA (P.f.)

15 ve XYLB (P.f.) eşit derecede yüksek performans sergilerken (dört iyi performans gösterenler arasında en iyisi), XYLA (P.f.) XYLB'den (P.f.) daha iyi bir pH toleransı gösterdi. Sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

• Southern Softwood Kraft Brownstock'un aşağıda listelenen yükleme seviyelerinde aşağıdaki dört enzim ile ön işlemden geçirilmesini içeren üç aşamalı bir

20 ağartma dizisi [(X) DoEp] kullanılarak 60'lık (% GE) bir test amaçlı elle yapılan tek bir kağıt sayfası parlaklığının elde edilmesi mümkündür (pH = 8, 65 °C ve 1 s):

- 0.55 U / g kağıt hamurunda XYLA (P.f)
- 0.75 U / g kağıt hamurunda XYLB (P.f)
- 1.80 U/g kağıt hamurunda SEK ID NO'lar: 215, 216
- 25 ◦ 1.98 U/g kağıt hamurunda SEK ID NO'lar: 175, 176

• Southern Softwood Kraft Brownstock'un 2 U / g XYLA (P.f.) hamuru ile ön işlemi, % 61'lik bir nihai GE parlaklığına ulaşmak için ClO₂ kullanımını % 18.7 kadar azaltır.

• XYLA (P.f.), daha yüksek pH'ta iyi tolerans gösterir ve enzimatik ön- muamele aşaması pH = 10'da yürütüldüğünde % 14'ten daha fazla kimyasal tasarrufu sağlar.

30 • Southern Softwood Kraft Brownstock'un 2 U / g XYLB (P.f.) hamuru ile ön işlemi, % 60.5'lik bir nihai GE parlaklığına ulaşmak için ClO₂ kullanımını % 16.2 kadar azaltır.

- Kavak Kraft hamurunun 2 U / g XYLA (P.f.) ve XYLB (P.f.) hamuru ile ön işleme, % 77'lik bir nihai GE parlaklığına ulaşmak için ClO₂ kullanımını yaklaşık % 35 kadar azaltır.
- Akçaağaç Kraft hamurunun 2 U / g XYLA (P.f.) ve XYLB (P.f.) hamuru ile ön işleme, % 79'lük bir nihai GE parlaklığına ulaşmak için ClO₂ kullanımını yaklaşık % 38 kadar azaltır.
- XYLA (P.f.) ve XYLB (P.f.) gibi iki en iyi performans gösteren ksilanaz, sadece katalitik etki alanı içeren kesilmiş enzimlerdir ve *Pseudomonas fluorescens*'te üretilmiştir.

10 **Örnek 7: Küşpe ve Kağıt Prosesleri için Örnek Ksilanazlar**

Evrimleşmiş ksilanazı için teknik hedef, uygulamadaki termotoleransı arttırmak (örneğin, 90 °C'ye kadar ve dahil) ve bunun yanı sıra daha geniş pH profili (pH 8- 10'da performans) oluşturmaktır. Örneğin, SEK ID NO: 383 ("SEK ID NO: 383/384") tarafından kodlanan SEK ID NO: 384'te ifade edilen gibi bir sekansa sahip polipeptit, GSSM kütüphaneleri oluşturulması ve bunların taranması, bunu takiben üstteki tekli mutant hitlerin gen yeniden birleştirilmesi ile hedef spesifikasyonları eşleştirecek şekilde evrimleşmiştir. GSSM için başlangıç noktası, SEK ID NO: 383/384, SEK ID NO: 381/382'nin üç amino asit (3- aa) C- terminalinin kesikliği idi. Tarama bir *E. coli* konakçıda gerçekleştirildi ve ana genin sekansları (SEK ID NO: 383/384) aşağıda verilmektedir.

```
ATGGCTCAGACCTGCCTCACGTCGAGTCAAACCGGCACCTAACAAAGGCTTCTATTATCCTTCGG
AAGGACAGTCCGGGCACGGTGAATTTTGGCTGCAGTCCGGCGGCCGTACACATCGAACTGGAG
CGGCATCAACAACCTGGGTGGGCGGCAAGGGATGGCAGACCGGTTCACGCCGGAACATCACGACT
CGGGCAGCTTCAATTCACCGGCAACGGCTACCTGGCGCTTACGGATGGACCACCAATCCACTCG
TCGAGTACTACGTCGTCGATAGCTGGGGGAGCTGGCGTCCGCCGGTTCGGACGGAACGTTCTTG
```

```
GGGACGGTCAACAGCGATGGCGGAACGTAAGACATCTATCGCGCGCAGCGGGTCAACCGCGCTC
CATCATCGCAACGCCACGTTCTATCAATACTGGAGCGTTCGGCAGTCCGAAGCGGGTAGGTGGGA
CGATCACCACCGAAACCACTTCGACCGGTGGGCCAGCGTGGGCTGAACCTGGGCACCTACAAC
TACCAGATCATGGCAGCGAGGGCTACCAGAAAGCAGCGGCAGCTCCGACATCACGGTGGAGTAA
(SEK ID NO: 383)
```

```
MAQICTTSSQIGTNGEYYSEFWKDSPIVNICTQSGGRYISNWSGINNWVGGKRWQIGSR
RNITL YSGSEFNSPNGYLAL YGWTEINPIVLYYVDSWGSWRPPGSDGHELGIVNSIXGITYD
IYRAQRVNSAPSIGNATEFYQYWSVRQSKRVGGHEEIGNIIEAWASVGENI GTHINYQIMAI
EGYQSSGSSDITVS (SEK ID NO: 384)
```

GSSM kütüphanesi 74 °C'lik termal zorlamaya tabi tutuldu ve daha sonra azo- ksilan çözümlü substrat üzerinde en yüksek aktiviteyi sergileyen klonlar için tarandı. Üst düzey adaylar ikincil ve üçüncül tarama sırasında azo- ksilan üzerinde tekrar doğrulandı. Gen yeniden birleştirme için en iyi 15 tek mutant klon seçildi. Oluşturulan

5 tek mutant listesi :

| AA pozisyonu | Mutasyon |
|---------------------|-----------------|
| 4 | T4L |
| 9 | S9P |
| 10 | Q10S |
| 13 | T13F |
| 13 | T13Y |
| 14 | N14H |
| 18 | Y18F |
| 25 | S25E |
| 30 | N30V |
| 34 | Q34C |
| 34 | Q34H |
| 34 | Q34L |
| 35 | S35E |
| 71 | S71T |
| 194 | S194H |

Seçilmiş tek mutantların termotolerans özellikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir:
Tek bir GSSM mutantını maksimum tolere edilen sıcaklıktan seçin

| Klon | Performansı şu seviyeye kadar korur: (azo-ksilan aktivite testine dayanarak) |
|------|--|
|------|--|

| | |
|-----------|-------|
| Vahşi tip | 72 °C |
|-----------|-------|

| | |
|-----|-------|
| S9P | 80 °C |
|-----|-------|

| | |
|------|-------|
| T13F | 80 °C |
|------|-------|

| | |
|------|---------|
| N14H | 82.5 °C |
|------|---------|

| | |
|------|-------|
| Y18F | 80 °C |
|------|-------|

| | |
|------|-------|
| Q34C | 80 °C |
|------|-------|

Yeniden birleştirme taraması, GSSM kütüphanesinin taranması ile aynı şekilde azo-ksilan substrat üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tarama şiddeti, 90 °C'ye ve ısı mücadelesi 5 aşaması için 1 saate yükseltildi. Üst rekombine edilmiş klonlar, torba biyo-ağartma protokollerinde uygulama substratları üzerindeki performanslarıyla karakterize edildi. Aşağıda, uygulama testi için seçilen klonların listesi ana SEK ID NO: 384'e göre amino değişimleri ile verilmektedir.

| Klon Ana (Nitelik tipi) | Amino Asit Pozitiflikleri | | | | | | | | | | | | NOTLAR 1) Bu testin amacı sadece proteinin, şekerin ve diğer kaynaklı asitlerin analizini değildir. |
|----------------------------|---------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| | 4 | 9 | 10 | 13 | 14 | 15 | 16 | 20 | 24 | 26 | 27 | 28 | |
| | T | E | Q | I | N | Y | C | H | Q | S | D | E | |
| Xyl1 | | P | | Y | H | F | C | | S | E | Y | H | |
| Xyl2 | | P | | Y | H | F | C | | S | E | Y | H | |
| Xyl3 | | | S | F | N | | | | S | E | T | H | |
| Xyl4 | | P | | F | C | | | | S | E | T | H | |
| Xyl5 | | P | S | | F | F | | | H | E | T | H | |
| Xyl6 | | P | S | Y | N | F | E | | L | E | Y | H | |
| Xyl7 | | P | | F | C | F | E | | S | E | T | H | |
| Xyl8 | | P | | F | C | F | E | | S | E | T | H | |
| Xyl9 | | P | S | F | N | | L | Y | S | E | T | H | |
| Xyl10 | | P | S | Y | N | | C | F | L | E | T | H | |
| Xyl11 | | P | | Y | N | | C | F | L | E | T | H | |
| Xyl12 | | P | | Y | N | | C | F | L | E | T | H | |
| Xyl13 | | P | S | | N | F | F | | S | E | T | H | |
| Xyl14 | | P | S | | H | F | E | F | R | E | T | H | |
| Xyl15 | | P | S | F | N | F | R | | S | E | T | H | |
| Xyl16 | | P | S | F | N | F | R | | S | E | T | H | |
| Xyl17 | | P | | Y | N | | E | | L | E | Y | H | |
| Xyl18 | | P | S | C | H | F | E | | K | R | T | H | |
| Xyl19 | | P | S | | F | F | E | | L | E | Y | H | |
| Xyl20 | | P | | F | C | | | | S | E | Y | H | |
| Xyl21 | | P | | F | C | | E | | H | T | T | | |
| Xyl22 | | | | Y | | F | | | | | Y | | 0.5 |
| Xyl23 | | P | | | F | F | | | S | E | | | 0.5 |
| Xyl24 | | L | | | H | | F | | S | E | | | 0.5 |

Uygulamaların test sonuçlarına dayanarak, iki klon seçildi. Bunlar Xyl2 ve Xyl4'tür. Bunların U / mg cinsinden spesifik aktiviteleri, arabinoksilan indirgeyici şeker testi ("Nelson- Somogyi analizi" olarak adlandırılan, yukarıda ele alındığı gibi) kullanılarak belirlenmiştir. Bu veriler aşağıda listelenmiştir.

| Klon | Kalibre Edilmiş U/mL | Protein konsantrasyonu | Kalibre Edilmiş U/mg |
|------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | | | |

| | | | |
|-------------------|--------|-------|-------|
| SEK ID NO: 382 | 172.6 | 1.62 | 106.4 |
| SEK ID NO: 384 | 1032.4 | 9.85 | 104.9 |
| Xyl2 | 723.8 | 5.94 | 121.9 |
| Xyl4 | 2217.8 | 17.73 | 125.1 |

Seçilmiş tek nokta mutantlar için diferansiyel tarama kalorimetrisinin sonuçları ve yeniden birleştirilmiş en yüksek vuruşlar:

Ana ksilanazlara karşı ksilanaz üst adaylar DSC ölçümleri

- 5 Enzimin geri dönüşümsüz olarak etkisiz hale getirildiği geçiş sıcaklığı (açılmamış)

| | Erime Sıcaklığı |
|----------------|-----------------|
| SEK ID NO: 382 | 80.9 °C |
| SEK ID NO: 384 | 86.6 °C |
| Xyl2 | 103.5 °C |
| Xyl4 | 102.2 °C |

10 Bir yaklaşımda, yukarıda belirtilen tek mutasyonlar, en az ikisinde, birkaçında veya hepsinde yukarıda belirtilen nokta mutasyonlara sahip olan bir enzimi üretmek üzere birleştirildi; bakınız, örneğin, Tablo 10, aşağıda. Dolayısıyla, buluş, yukarıda belirtilen nokta mutasyonlarının biri, en az iki, birkaçını veya tümünü ve bunları kodlayan nükleik asitleri olan ksilanaz aktivitesine sahip polipeptidleri sağlar.

Örnek 8: Küspenin parlaklığının arttırılmasında ksilanaz performansını değerlendirmeye yönelik yeni Bio- ağartma Analizi

15 Bu örnek, bir polipeptidin ksilanaz aktivitesine sahip olup olmadığını ve buluşun kapsamı içinde olup olmadığını belirlemek için kullanılabilen bir "biyo- ağartma deneyi"

olan örnek bir protokolü tarif etmektedir. Bu analiz, bir Kraft Küspesinin parlaklığının artırılmasında SEK ID NO: 384 (örn., SEK ID NO: 383 tarafından kodlanmış) belirtilen bir sekansa sahip buluşun örnek niteliğindeki bir enziminin performansını değerlendirmek için kullanıldı. Bu ve bu buluşun diğer bir ksilanaz enzimi, örneğin bir Kraft Küspesi gibi bir hamurun parlaklığını arttırmak için kullanılabilir.

Biyo- ağartma prosedürleri, örneğin üç aşamalı bir biyo- ağartma prosedürü, Şekil 14'te gösterildiği gibi bir işlem dahil olacak biçimde Şekil 11'de gösterildiği gibi bir fiili hamur öğütücü ağartma tesisinin koşullarını yakından taklit eder. Bu ağartma sekansı, (X)DoEp ile gösterilir, burada X, ksilanaz muamele aşamasını (örneğin, buluşa ait bir enzim kullanarak), D, klorin dioksit ağartma aşamasını ve Ep ise alkalın peroksit çıkartma aşamasını temsil eder. Uygulama testlerimizde kullanılan hammaddeler Southern Softwood Kraft Brownstock'du (oksijen delifikasyonu olmadan). Her bir biyo-ağartma turunun tamamlanmasının ardından, birbirini takip eden küspe, TAPPI (Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrileri Teknik Birliği) - standart test amaçlı elle yapılan tek kağıt sayfaları üretmek için kullanıldı. Her bir el test amaçlı elle yapılan tek kağıt sayfasının % GE parlaklığı ölçülmüş ve enzimatik ön- muamele aşaması sırasında (X) enzimin hamur üzerinde ne kadar iyi performans gösterdiğinin göstergesi olarak parlaklık değerleri kullanılmıştır.

Küspenin biyo- ağartması : Küspe, Şekil 11'de gösterildiği gibi, 3 aşamalı bir (X) DoEp dizisi kullanılarak sızdırmaz plastik torbalarda 10 g'lık gruplar halinde ağartılmıştır. Üç aşamadaki muamele koşulları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- ❖ X aşaması : 65 °C'de ve 60 dk boyunca pH = 8'de % 10 (w / v) kıvam
- ❖ Do aşaması: 30 dakika boyunca 60 °C'de % 4 (w / v) kıvam ı; Kappa Faktörü = enzim ile muamele edilen numuneler için 0.18 ve enzim içermeyen kontroller için 0.18 ve 0.21.
- ❖ Ep aşaması: 90 dakika boyunca 75 °C'de % 10 (w / v) kıvam ı; kostik yük: % 1,7 (w NaOH / w OD küspesi) ve H₂O₂ yükü: % 0,5 (a / a)

Şekil 11'de belirtildiği gibi, ham küspe pH'yi 8.5'e düşürmek için yıkanmıştır; küspe filtre preslenmiş ve torbalara bölünmüştür. Her aşamada, torbalar arzu edilen sıcaklıkta bir su banyosunda inkübe edildi ve her bir torba, 10 dakikada bir toplandı ve küspe kütlesi içinde muntazam kütle ve ısı transferini sağlamak için iyice yoğruldu. Her muameleden

sonra, küspe filtrelendi, 2 L DI su ile yıkandı ve bir sonraki muameleyi almadan önce tekrar süzüldü. Küспенin nem içeriği bir Mettler- Toledo nem analiz cihazı (Fisher Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

Şekil 11'de belirtildiği gibi, küspe filtre preslendikten ve torbalara ayrıldıktan sonra, X aşamasında, küspe yeniden süspansiyona alınmış, filtre preslenmiş, pH ayarlanmış; ve daha sonra enzim ile % 10 katı, 65 °C, 1 saat in kübe edildi; daha sonra 10 dakika yoğruldu. Do aşamasında, küspe yeniden süspansiyona edildi, yıkandı, pH 4.0'a ayarlandı ve filtre preslendi; daha sonra, 30 dakika boyunca 60 °C 'de % 4 katı halde (yani, % 4 (ağırlık / hacim) kıvam) ClO₂ ile emprenye edildi; daha sonra 10 dakika yoğruldu. Do aşamasında, enzim ile muamele edilen numuneler için Kappa Faktörü = 0.18 ve enzimsiz kontroller için 0.18 ve 0.21. EP aşamasında, küspe yeniden süspansiyona edildi, yıkandı ve filtre preslendi; daha sonra, 90 dakika boyunca 75 °C'de % 10 katılıkta (yani, % 10 (ağırlık / hacim) tutarlılık) NaOH ve H₂O₂ ile inkübe edildi; ardından 10 dakika yoğruldu. Kostik yük: % 1,7 (w NaOH / w OD küspesi) ve H₂O₂ yükü: % 0.5 (w / w). Yoğrulduktan sonra, test amaçlı elle yapılan kağıt sayfaları oluşturuldu.

El sayfaları : Şekil 11'de belirtildiği gibi, el sayfaları oluşturuldu (4 m küspe, yaklaşık pH 6.5); TAPPI yöntemi T- 272 sp- 97'ye göre TAPPI standart ekipmanı (Kalamazoo Paper Chemicals, Richland, MI) kullanılarak ağartılmamış ve ağartılmış küspelerden yapılmıştır. Her bir el sayfasının % GE parlaklığı, TAPPI yöntemi T- 452 om- 98'e (457 nm'de referans) göre bir BRIGHTMETER MICRO S- 5 / BC™ (Technidyne Corp., New Albany, IN) kullanılarak ölçüldü.

Ornek 9: Yeni Biyo- Ağartma İşlemi

Yeni bir biyo- ağartma işlemi Şekil 14'te gösterilmektedir. Bu işlem, buluşun herhangi bir örnek enzimini içerecek şekilde buluşun bir polipeptidi dahil olmak üzere herhangi bir ksilanaz enzimi kullanılarak uygulanabilir.

Bu işlem, "brownstock" içeren bir başlangıç malzemesine sahip olabilmekte olup, 1) besleme stoğu hazırlığı - kağıt değirmeni içine giren kütüklerin soyulmuş yongaları, ince tanecikleri, düğümleri ve yabancı maddeleri gidermek için soyulması, yontulması ve taranması, 2) odun yongaları, selüloz liflerini ayırmak ve selüloz muhtevasını, istenmeyen ligninin çoğunluğunu çıkararak arttırmak için konsantre bir sodyum hidroksit ve sodyum sülfür sıvısı içinde birkaç saat boyunca basınç altında 160 °C ila

190 °C'de pişirilmesi ile tanımlanabilir. Bu adımın çıktısı "brownstock" olarak adlandırılır.

Buluşun bu prosesi, kağıt veya diğer ürünlerin hazırlanması için preparatta parlaklığı hedeflemek üzere küspeyi beyazlatmak için kalıntı lignin ve diğer kromoforların çıkarıldığı çok aşamalı bir işlem olan bir "Ağartma Adımı" içerir. Küspe, tercih edilen şekliyle lignine saldıran klor ve klor dioksit gibi oksitleyici kimyasallarla işlenir. Bir yaklaşımda, proses, küспенin klor dioksit ile reaksiyona sokulduğu bir ağartma sekansı içerir, "Do" aşaması (bakınız, ayrıca Şekil 13 ve Örnek 8, "Do" aşaması); hidrojen peroksit varlığında alkali ile ekstrakte edilir; "Ep" aşaması (bakınız, ayrıca Şekil 13 ve Örnek 8, "Ep" aşaması); ikinci kez klor dioksit ile reaksiyona sokulur; bir "D1" aşaması; alkali ve hidrojen peroksit ile ekstrakte edilir, bir Ep aşaması ve üçüncü kez klor dioksit ile reaksiyona sokulur, bir D2 aşaması. Bu işlemin uygulanmasında, ağartma, kullanılan oksitleyici kimyasalların türü ve miktarına ve işlem adımlarının sayısına göre birçok varyasyona tabi olabilir (ancak, klor dioksit şu anda en yaygın kullanılan kimyasal oksidandır). Bir yönüyle, bu işlem pişmiş küспенin basınç altında oksijen ile ön işlemden geçirilmesini içerir; oksijen reaktörü yüksek basınçta olabilir - yaklaşık 200 ila 230 ° F ve pH 12 ila 14 (bu, ağartmada "oksijen delignifikasyonu" olarak bilinen yaygın bir ilk adımdır).

Bu işlem rafinasyon içerebilir. Örneğin, kağıt yapımından önce ağartılmış kağıt hamuru, selüloz liflerini düz şeritler halinde parçalamak, yüzeylerini fibre etmek ve kağıt yapımı için fiziksel özelliklerini geliştirmek için mekanik olarak inceltilir. Küspe haline getirmeyi takiben işlemin herhangi bir aşamasında, küspe suyundan arındırılabilir, yıkanabilir ve temiz su veya dönüştürülmüş akışların eklenmesiyle önceden belirlenmiş bir kıvama ayarlanabilir.

Buluşun ksilanazı, küspe haline getirildikten sonra, oksijen reaktöründe ya da oksijen reaktöründen hemen önce depolama kabında eklenebilir. Buluşun ksilanazı, ağartma işleminde birçok noktada (bir veya daha fazla veya tüm noktalarda) eklenebilir. Ligninin parçalanmasını katalize etmek için bir lakkaz eklenebilir. Lakkaz, oksijen reaktörü dahil olmak üzere işlemin herhangi bir aşamasında eklenebilir. Küspe, lakkaza kendi kendine aracılık eden çeşitli bileşenleri serbest bırakabilir. Alternatif olarak, organik veya inorganik araçlar eklenebilir (bakınız, örneğin, bir organik aracı ya da bir lakkaz içeren bir oksidasyon sistemini açıklayan DE 19723890; alternatif örnek niteliğindeki araçlar bir örnek organik aracı olarak 2,2'- azinobis (3- etilbenzt- iazolin- 5- sülfonat)

(ABTS) ve bir örnek inorganik aracı olarak potasyum oktasiyanomolibdat ($K_4Mo(CN)_8$) içerir). U.S. patent başvurusu no. 20030096394'Da'da açıklananlar gibi araçlar da işlemlerde kullanılabilir, bunlara lakkaz ve lakkazla ilişkili enzimlerin aktivitesini arttırabilen herhangi bir bileşik de dahildir.

- 5 Bir esteraz, örneğin lipaz veya oksidoredüktaz, örneğin peroksidaz eklenebilir. Ek olarak, reaktörde pH ve / veya sıcaklık değiştirilebilir. İzleme reaksiyonlarında, herhangi bir linyin içerik ölçüm tekniği kullanılabilir, örn., bakınız U.S. Patent Başvuru No. 20020144795, lignin ve redoks araçlarını içeren katalitik reaksiyonların voltametrik ölçümüne dayanarak kraft küspelerinin kappa sayısının veya lignin içeriğinin
- 10 ölçülmesine dair bir yöntemi tarif eder.

Buluşa ait enzimler örneğin U.S. Patent No. 6,824,646'De'de tarif edilenler gibi alkali - oksijen ağartma (oksijen delignifikasyonu) işlemlerinde kullanılabilir, bu işlem, sulu alkali çözelti içinde lignoselüloz küspesinin oksijen ile ağartılmasını ve küspeye bir hemiselülaz ile muamele edilmesini içerirken, enzimle muamele adımından gelen bir

15 sıvı fraksiyonu hemiselülaz ile muamele edilen reaksiyon karışımından ayrılır ve nüfuz etmeyen bir fraksiyondan nüfuz eden bir fraksiyonu ayırmak için örneğin ters ozmoz membranı gibi bir ayırma membranı yoluyla bir penetrasyon muamelesine tabi tutulur ve daha sonra nüfuz eden fraksiyon, buluşun bir enziminin kullanımını içeren alkali-oksijen ağartma (oksijen delignifikasyonu) adımına beslenir.

20 Buluşun ksilanazları, ağartma kimyasallarını, örneğin klor, klor dioksit, kostik, peroksit veya bunların herhangi bir kombinasyonunu azaltmak için kullanılır; kimyasallarda yaklaşık % 1, % 5, % 10, % 20, % 25, % 30, % 35, % 40, % 45, % 50, % 55, % 60, % 65, % 70, % 75, % 80, % 85, % 90, % 95'e varan veya daha fazla ya da % 100 bir azalma buluşun enzimlerini kullanan yöntemlerin uygulanmasında görülebilir. Ksilanaz bir

25 lakkaz veya başka bir enzimle kombinasyon halinde kullanıldığında, örneğin enzim kokteyllerinin kullanılmasıyla kimyasallarda % 100'lük bir azalma sağlanabilir; buluşun, buluşa ait en az bir enzim ve bir ya da başka bir ksilanaz olabilen daha fazla başka enzim (ler) veya herhangi bir başka enzimi içeren enzim karışımları ya da "kokteylleri" sağladığına dikkat çekilmelidir.

30 Buluşun ksilanazları, işlemde suyun geri dönüşümüne izin vermek için klor dioksitin azaltılması için kullanılır; böylece, daha az su kullanılmış ve kanalizasyona daha az su dökülmüştür. Buluşun ksilanazları, lignin açısından daha fazla zengin posanın ağartma

tesisine girmesine izin vermek için kullanılır, böylece daha iyi küspe verimi ve daha iyi kalitede küspe (yani, pişirme işlemi sırasında daha az tahribat) sağlanır. Buluşun ksilanazları, kağıdın genel parlaklığını arttırmak için kullanılır. Buluşun ksilanazları, küspenin kappa sayısını azaltmak için kullanılır.

- 5 Buluşun ksilanazları, örneğin, mesela oksijen delignifikasyonu ile sert kereste, oksijen delignifikasyonu olmaksızın sert kereste, oksijen delignifikasyonu ile yumuşak kereste, oksijen delignifikasyonu olmaksızın yumuşak kereste üzerinde, ve benzerleri de dahil olacak şekilde tüm tahta tipleri üzerinde kullanılabilir. Buluşun ksilanazları, geri dönüştürülmüş kağıt ve / veya küspenin işlenmesi için kullanılabilir.
- 10 Oksijen delignifikasyonu tipik olarak bir brownstock yıkayıcı ve bir ağartma tesisi arasında bir reaksiyon kulesi eklenmesini gerektirir. Tipik olarak, brownstock'a oksijen ve sodyum hidroksit eklenir. Ağartma kimyasının % 50 oranında azaltılması, eğer oksijen ayrıştırması ile önlenirse, ağartma işleminde elde edilebilir. Yıkama oksijenin delignifikasyonunu takip eder; atık sular geri kazanılabilir veya boşaltılabilir. Ozon delignifikasyonu, oksijen delignifikasyonu yerine kullanılabilir.
- 15

Örnek 10: Yeni Biyo- Ağartma Analizi

Bu örnek, buluşun örnek polipeptitlerinde ksilanaz aktivitesini gösteren verileri açıklar. Bu ksilanaz aktivitesi çalışmaları, Nelson (1944) J. Biol. Chem. 153: 375- 380, "Reducing Sugar Assay for Xylanase"; ve, Somogyi (1952) J. Biol. Chem. 195: 19- 23 dokümanlarında açıklananlara dayanmaktadır. Bu "Nelson- Somogyi" analizi, aktivite birimlerini belirlemek için kullanılır; "Nelson- Somogyi" analizlerinden elde edilen veriler, buluşun örnek polipeptitlerinde ksilanaz aktivitesini, aşağıda belirtilen aktivite birimlerinin belirlenmesi ile gösterir.

20

Enzim birimi belirlemeleri de Nelson- Somogyi analizi kullanılarak belirlenmiştir. Biyo- ağartma deneyleri TAPPI'den ((Kağıt hamuru ve Kağıt Endüstrileri Teknik Birliği) yukarıda belirtilen yöntemlere dayanmaktadır. Aşağıda, TAPPI protokollerine yapılan referanslarla birlikte bir açıklama bulunmaktadır.

25

Küspe: North Carolina State Üniversitesi'nde (Raleigh, NC) Ağaç ve Elyaf Bilimi Bölümü'nden iki parti güney yumuşak ağaç kraft kütlesi elde edildi. Küspenin Kappa Sayıları, TAPPI yöntemi T- 236 om- 99 {TAPPI Test Yöntemleri (2000- 2001), 2003 30 173 / id} kullanılarak sırasıyla 21.4 veya 29.7 olacak şekilde belirlenmiştir.

Küspenin biyo- ağartması: Küspe, ksilanaz ile ön işleminden geçirildi ve 3 aşamalı bir ksilanaz / klor dioksit / alkalın peroksit dizisi kullanılarak sızdırmaz plastik torbalarda 10 g'lık gruplar halinde ağartıldı:

(X) DoEp (yukarıdaki açıklamaya bakınız). Uç aşamadaki muamele koşulları şöyledir:

5 X aşaması : 65 °C ve 60 dk süresince pH 8'de % 10 (w / v) kıvam

Do aşaması: 30 dakika boyunca 60 °C'de % 4 (w / v) kıvamı ; enzim ile muamele edilmiş numuneler için 0.18'lik bir Kappa Faktörü ve enzimsiz kontrol numuneleri için 0.18 ve 0.21 kullanılmıştır. Do aşamasında kullanılan klor dioksit konsantrasyonu denklem (1) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$10 \quad ClO_2 \% = \frac{KF \times K\#}{2.63} \quad (1)$$

100 g fırında kurutulmuş (OD) küspesi başına ClO₂ yüzdesinin saf klor dioksit gramına eşit olduğu yerlerde, KF Kappa Faktörü ve K#, TAPPI yöntemi T- 236 om- 99{TAPPI Test Yöntemleri (2000- 2001)), 2003 173 /id} ile belirlendiği gibi küspenin Kappa Sayısıdır. Ep aşaması: 90 dakika boyunca 75 °C'de % 10 (w / v) kıvam; kostik yük, 15 küspe üzerinde % 1.7 (w / w) ve H₂O₂ yükü, küspe üzerinde % 0.5 (w/w) oldu.

Her aşamada, torbalar, istenen sıcaklıkta bir su banyosunda inkübe edildi ve küspe kütlesi içinde düzgün bir kütle ve ısı transferi sağlamak için her 10 dakikada bir iyice karıştırıldı ve yoğruldu. Her aşamadan sonra, küspe bir sert polipropilen filtre ile kaplanmış bir Buchner tüneli vasıtası ile filtrelendi (297- mikron mesh, Spectrum Labs, 20 Ft. Lauderdale, FL). Filtrat, ince tanecikleri yakalamak için bir kez geri dönüştürüldü ve hamur küspesi 2 L DI su ile yıkandı. Küspe pastası daha sonra 1.5 L DI su içinde yeniden süspanse edildi ve pH sırasıyla X ve Do aşamalarından önce pH 8 ve pH 4'e ayarlandı. Küspenin nem içeriği bir Mettler- Toledo nem analiz cihazı (Fisher Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

25 TAPPI metodu T- 272 sp- 97'ye (TAPPI Test Yöntemleri (2000- 2001), 2003 173 / id) göre TAPPI standart ekipmanı (Kalamazoo Paper Chemicals, Richland, MI) kullanılarak ağartılmış kağıt hamurundan el test amaçlı elle yapılan kağıt sayfaları yapılmıştır. Her bir kağıt sayfasının % GE parlaklığı, TAPPI yöntemi T- 452 om- 98'e göre bir Technidyne Brightimeter™ Micro S- 5 / BC (Technidyne Corp., New Albany, 30 IN) kullanılarak ölçülmüştür.

| Analizde kullanılan BİLEŞENLER | (1) |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 1M NaOH • 0.5 M Sodyum fosfat tamponu pH 8 • Üreticinin talimatlarına göre hazırlanmış % 1 Arabinoksilan - (Megazim # P- WAXYM) • Ksiloz – hazırlama standartları, H₂O içinde çözünmüş D- ksiloz kullanarak 0.15 mM – 2 mM • 96 oyuklu PCR plakası (Fisher 05 500- 48) • PCR plaka contaları | <ul style="list-style-type: none"> • Çözelti 1 : 800 mL H₂O içinde 12g K⁺/Na⁺ tartrat; 24g Na₂CO₃; 16g NaHCO₃; 144g Na₂SO₄ • Çözelti 2 : 200 mL H₂O içinde 4g CuSO₄*5H₂O; 36 g Na₂SO₄ • Reaktif A : Çözelti 1'in 4 hacmi ile çözelti 2'nin 1 hacmi karıştırılır. Not- günlük olarak taze hazırlanır |
| <ul style="list-style-type: none"> • Standart 96 oyuklu şeffaf plakalar | <ul style="list-style-type: none"> • Reaktif B : 450 mL H₂O su içinde 25g (NH₄)₂MoO₄; 21 mL konsantre edilmiş H₂SO₄ ekle, karıştır. 25 mL dH₂O içinde 3g Na₂HAsO₄*7H₂O çöz; amonyum molibdat çözeltisi ile karıştır ve reaktifi 24- 48 saat boyunca 37 °C'de inkübe et. Çözeltiyi karanlık bir şişede yani, ışıktan uzakta oda sıcaklığında sakla. |
| <ul style="list-style-type: none"> • 96 oyuklu blok için 1 mL tüpler (E&K 671511- RC) | |

Prosedür

1. Reaktif A'yı hazırlayın
2. 96 oyuklu bir PCR plakasının her oyuğuna 5 uL 1 M NaOH pipetleyin. Plakayı buz üzerinde tutun.
3. Reaksiyon karışımını hazırlayın. Alternatif olarak, birden fazla numune için bir ana karışım hazırlayabilirsiniz. İşte 1X karışımı. 1 mL tüplere ekleyin ve 96 oyuklu bloğa yerleştirin.

1. a. 50 uL pH8 Na- fosfat tamponu
2. b. % 1'lik substrattan 250 uL (% 0.5'lik bir nihai konsantrasyon yapmak için)
3. c. 150 uL H₂O
- 5 4. Reaksiyon karışımını 3 dakika boyunca istenen sıcaklığa getirmek için ön ısıtma uygulayın.
5. 0.5 M fosfat tamponunu 5 mM pH 8'e kadar seyreltin ve bu tamponu kullanarak enzim seyreltmeleri yapın.
6. 75 uL seyreltilmiş enzimi bir 96 oyuklu bir mikrotitre plakasının bir oyuğuna pipetleyin
- 10 7. Reaksiyon karışımını içeren 1 mL'lik tüpe 50 uL seyreltilmiş enzim pipetleyin.
8. İstenen zaman noktasında, her reaksiyon karışımından 50 uL NaOH içeren tüplere (NaOH pH'yi 12'ye çıkararak reaksiyonu söndürecek) pipetleyin.
9. NaOH içeren tüpleri ayırmak için her bir standarttan 50 uL ekleyin. Standartlar, 0.25 mM ksiloz ile 2.0 mM arasında lineerdir. Standart eğriyi oluşturmak için en az 4 standart
- 15 kullanın.
10. Her bir oyuğa 50 uL Reaktif A ekleyin. Microseal™ 'A' Filmi kullanarak plakayı kapatın.
11. Plakayı 20 dakika boyunca bir PCR makinesinde 100 °C'de ısıtın. Numuneyi ısıtıldıktan sonra makineyi 4 °C'ye soğumaya ayarlayın.
- 20 12. Her tüpe 50 uL reaktif B ekleyin, karıştırın.
13. - Not, reaktif B'nin eklenmesinden sonra önemli bir miktarda CO₂ oluşur. Bu numunelerin komşu oyukları kirletmemesine oldukça dikkat edilmelidir.
14. Her bir numunenin veya standartın 100 uL'sini 96 oyuklu bir mikrotitre plakasının ayrı oyuklarına pipetleyin.
- 25 15. Levhayı 560 nm'de okuyun.
16. Standart eğri verisini çizin ve standartlarını ksilozun umolları olarak ifade edin, yani 2.5 mM'luk 50 uL ksiloz, .125 µmol ksilozdur.
17. Her zaman noktası için örnek verilerden tampon kontrolünü çıkartın ve verileri çizin
18. Zamanlama eğrisi eğim değerini, ksiloz standart eğri eğim değeri ile bölün

19. 10 ile çarpın (50 uL örnekler için hesaplar (toplam analiz hacminin 1 / 10'u)

20. Dakikada enzimin mL'si ya da enzimin U/mL'si başına salınan ksilozun μ mol'lerini elde etmek için analizde (0.05) kullanılan hacme bölün.

21. U / mg'yi elde etmek için bu sayıyı protein konsantrasyonu ile bölün.

- 5 Buluşun örnek polipeptitlerinde ksilanaz aktivitesini gösteren "Nelson- Somogyi" analizlerinden elde edilen veriler aşağıda Tablo 8'de verilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi, analiz koşulları pH 8'i; 65 °C U / mL veya pH8; 40 °C (U / mL)'yi içermiştir.

Tablo 8'de Tablo 8'in okunmasına yardımcı olmak için "SEK ID NO: 151, 152", "örn., SEK ID NO: 151'de belirtilen gibi bir sekansa sahip bir nükleik asit tarafından kodlanan
10 SEK ID NO: 152'de belirtilen gibi bir sekansa sahip polipeptit", vb. anlamına gelir:

Tablo 8

| SEK ID NO: | pH 8; 65 C U/mL | ph 8; 40 C (U/mL) |
|------------|-----------------|-------------------|
| 151, 152 | düşük | 17.3 |
| 155, 156 | | 13.5 |
| 169, 170 | Belirsiz | 1.62 |
| 195, 196 | 6.3 | 6.47 |
| 23, 24 | Belirsiz | 1 |
| 215, 216 | 34.7 | 55.9 |
| 5, 6 | Belirsiz | 6.3 |
| 121, 122 | Belirsiz | 139.4 |
| 405, 406 | Belirsiz | 41.34 |
| 47, 48 | Belirsiz | 31.2 |
| 191, 192 | 23 | 5 |
| 353, 354 | Belirsiz | 7 |

| | | |
|----------|---|-------|
| 247, 248 | 5 | 146.3 |
| 307, 308 | 2.2 | 18 |
| 175, 176 | 37.7 | 36.2 |
| 7, 8 | Belirsiz | 16.1 |
| 161, 162 | 65 | 39.5 |
| 33, 34 | Test edilen koşullarda görünür aktivite yok | 18.9 |
| 221, 222 | 2.2 | 2 |
| 225, 226 | Belirsiz | 9.5 |
| 27, 28 | Belirsiz | 10.1 |
| 163, 164 | 1186.44273 | 670.1 |
| 19, 20 | Belirsiz | 12.2 |
| 81, 82 | Belirsiz | 434 |
| 91, 92 | 88 | 194 |
| 61, 62 | Belirsiz | 0.9 |
| 469, 470 | | 0.19 |
| 159, 160 | 224 | |
| 299, 300 | 1.3 | 1 |
| 349, 350 | 577 | 128 |
| 233, 234 | | 2.1 |
| 171, 172 | 0.55 | 0 |
| 203, 204 | 11.5 | 15.4 |

| | | |
|----------|----------|--------|
| 181, 182 | 282 | |
| 227, 228 | | 5.4 |
| 165, 166 | 4 | 3.34 |
| 335, 336 | 63 | |
| 339, 340 | 60 | 1.9 |
| 141, 142 | Belirsiz | 544.63 |
| 231, 232 | | 8 |
| 367, 368 | Belirsiz | 3 |
| 333, 334 | 4.1 | 10.18 |
| 281, 282 | | 3.7 |
| 361, 362 | 5.4 | ND |
| 261, 262 | 32 | 49.5 |
| 319, 320 | 24.9 | 0 |
| 357, 358 | düşük | 65.5 |
| 365, 366 | 190 | 51 |
| 273, 274 | | 16.65 |
| 277, 278 | 450 | 74.4 |
| 455, 456 | 850 | 423.02 |
| 129, 130 | 2.1 | |
| 271, 272 | Belirsiz | 3 |
| 285, 286 | 25 | 11 |

| | | |
|----------|----------|--------|
| 259, 260 | 235 | 240.8 |
| 325, 326 | 1.5 | 7.4 |
| 359, 360 | 13 | 5.2 |
| 303, 304 | Belirsiz | 13.4 |
| 363, 364 | | 2.1 |
| 93, 94 | Belirsiz | 24 |
| 157, 158 | Belirsiz | 2.6 |
| 189, 190 | 0.8 | ND |
| 25, 26 | düşük | 13.2 |
| 323, 324 | 260 | 51 |
| 49, 50 | Belirsiz | 0.05 |
| 85, 86 | 8 | 3.4 |
| 29, 30 | 3 | |
| 51, 52 | 0.2 | ND |
| 35, 36 | 11.2 | 6.53 |
| 287, 288 | | 1.45 |
| 293, 294 | 1042 | 219.23 |
| 99, 100 | 11.1 | 5.7 |
| 351, 352 | Belirsiz | 2 |
| 119, 120 | 3.4 | 19.36 |
| 123, 124 | 169 | 18.2 |

| | | |
|----------|----------|-------|
| 249, 250 | 2 | |
| 311, 312 | 467 | 78.9 |
| 149, 150 | 9 | |
| 167, 168 | 1500 | 46.8 |
| 207, 208 | 83 | 44.81 |
| 213, 214 | Belirsiz | 0.06 |
| 177, 178 | 12.1 | 7.6 |
| 113, 114 | 158 | 22.6 |
| 289, 290 | Belirsiz | 16.65 |
| 75, 76 | | 1 |
| 111, 112 | Belirsiz | 4.8 |
| 117, 118 | Belirsiz | 134.4 |
| 115, 116 | 36 | 15.9 |
| 125, 126 | Belirsiz | 31.5 |
| 137, 138 | Belirsiz | 2 |
| 451, 452 | 235 | 23.8 |
| 69, 70 | 44 | 2.1 |
| 205, 206 | düşük | 75 |
| 211, 212 | düşük | 159 |
| 197, 198 | 40 | 16.5 |
| 373, 374 | Belirsiz | 17.91 |

| | | |
|----------|----------|-------|
| 89, 90 | 12 | |
| 31, 32 | Belirsiz | 11.4 |
| 13, 14 | Belirsiz | 20.7 |
| 65, 66 | | 3.5 |
| 257, 258 | Belirsiz | 0.28 |
| 57, 58 | Belirsiz | 9.13 |
| 185, 186 | 49.9 | 119.3 |
| 77, 78 | 81 | |
| 73, 74 | Belirsiz | 3.5 |
| 243, 244 | | 8.6 |
| 229, 230 | 27 | 24.4 |
| 223, 224 | 1.5 | 2 |
| 109, 110 | 98 | 25.7 |
| 291, 292 | 17.65 | 3.8 |
| 179, 180 | Belirsiz | 5.7 |
| 3, 4 | | 77.1 |
| 193, 194 | 24 | 8.5 |
| 173, 174 | düşük | 15 |
| 217, 218 | 2.7 | 0.17 |
| 59, 60 | Belirsiz | 34.5 |
| 71, 72 | Belirsiz | 6.6 |

| | | |
|----------|----------|-------|
| 101, 102 | Belirsiz | 9 |
| 39, 40 | 99 | 61 |
| 269, 270 | Belirsiz | 3.2 |
| 139, 140 | | 13.2 |
| 55, 56 | 133 | 81.2 |
| 15, 16 | Belirsiz | 242.4 |
| 131, 132 | Belirsiz | 11.6 |
| 95, 96 | 146 | 136.3 |
| 143, 144 | 13 | 0.94 |
| 17, 18 | 7.2 | 2.6 |
| 21, 22 | Belirsiz | 8.1 |
| 153, 154 | 1.7 | 2 |
| 127, 128 | | 0.46 |
| 253, 254 | 12.6 | 28.3 |
| 255, 256 | | 13.15 |

“Nelson- Somogyi” analizlerinden elde edilen “Aktivite Birimleri” verileri, aşağıda Tablo 9’da özetlendiği gibi, biyo- ağartma deneylerinde (TAPPI yöntemlerine dayalı olarak) dozlamayı belirlemek için kullanılmıştır (Tablo 9’un okunmasına yardımcı olmak için, 5 “SEK ID NO: 151, 152”, “örn., SEK ID NO: 151’de belirtilen gibi bir sekansa sahip bir nükleik asit tarafından kodlanan SEK ID NO: 152’de belirtilen gibi bir sekansa sahip polipeptit”, vb. anlamına gelir):

Tablo 9

| SEK ID NO: | Sıcaklık | pH | Ksılanaz eklenen birimler | Küspe tipi | Çıktı |
|------------|----------|----|---------------------------|------------|-------|
| 151, 152 | 40 | 8 | 2 | SSW | + |
| 169, 170 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 195, 196 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 121, 122 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 191, 192 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 247, 248 | 65 | 8 | 2 | SSW | + |
| 161, 162 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 225, 226 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 27, 28 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 81, 82 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 91, 92 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 61, 62 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 233, 234 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 171, 172 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 141, 142 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 231, 232 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 367, 368 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 261, 262 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 357, 358 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 365, 366 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |

| | | | | | |
|----------|----|---|---|----------|----|
| 273, 274 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 277, 278 | 65 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 271, 272 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 285, 286 | 65 | 8 | 2 | SSW | - |
| 325, 326 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 93, 94 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 157, 158 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 25, 26 | 65 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 85, 86 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 167, 168 | 65 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 9, 10 | 40 | 8 | 2 | SSW | - |
| 43, 44 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 75, 76 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 111, 112 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 117, 118 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 115, 116 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 125, 126 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 69, 70 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 205, 206 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 211, 212 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 197, 198 | 65 | 8 | 2 | SSW | + |

| | | | | | |
|----------|----|---|---|----------|----|
| 31, 32 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 13, 14 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 65, 66 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 57, 58 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 73, 74 | 40 | 8 | 2 | SSW | -- |
| 229, 230 | 40 | 8 | 2 | SSW | + |
| 179, 180 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 3, 4 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 193, 194 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 173, 174 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 59, 60 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 71, 72 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 101, 102 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 39, 40 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 15, 16 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 131, 132 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 95, 96 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 143, 144 | 40 | 8 | 2 | SSW | -- |
| 393, 394 | 65 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |
| 21, 22 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | - |
| 255, 256 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | -- |

| | | | | | |
|----------|----|---|---|----------|----|
| 215, 216 | 65 | 8 | 2 | Yeni SPB | ++ |
| 175, 176 | 65 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 203, 204 | 40 | 8 | 2 | Yeni SPB | + |
| 253, 254 | 40 | 8 | 2 | SSW | ++ |

Tablo 9'daki sonuç tanımları:

+ = yüksek Kappa faktörü kontrolüne kadar Kappa Faktörü kontrollerinin orta noktasından daha büyük

5 ++ = yüksek Kappa Faktörü kontrolünden daha büyük

- = Kappa Faktörü kontrollerinin orta noktasından küçük veya eşit, fakat düşük Kappa Faktörü kontrolünden daha az değil

- = düşük Kappa Faktörü kontrolünden daha düşük

Tablo 9 için Terim Anahtarı: SPB = Ladin Çam Huş; SSW = Güney Yumuşak Ağaç

10 Tablo 9'da özetlenen çalışmalarda, düşük Kappa faktör kontrolünün altında performans sergileyen enzimler için, enzim örneğindeki malzemenin parlaklığını azaltmaya katkıda bulunduğu varsayılmaktadır. Bu materyalin, enzim örneğindeki ksilanaz adayının zenginleştirilmesi veya daha da saflaştırılmasıyla uzaklaştırılması, performansı arttırabilir.

15 Bir yaklaşımda, burada tarif edildiği gibi tekli amino asit kalıntı mutasyonları, örneğin, aşağıda Tablo 10'da açıklandığı gibi, nokta mutasyonlarının en az iki, birkaçının veya tamamının bulunduğu bir ksilanaz enziminin üretilmesi için birleştirildi. Tablo 10'daki "enzim no." sütunu, aşağıda değinilen Şekil 15'teki "enzim no." sütunu ile ilişkilidir.

Tablo 10A, B, C: kombine mutantlar, Nokta yukarı mutantlar, Kısa karıştırılmış yukarı

20 mutantlar

Tablo 10A

| | |
|-------------------|--|
| kombine mutantlar | SEK ID NO: 384'teki Amino Asit Pozisyonu |
|-------------------|--|

| | | | | | | | | | | | | |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Enzim No. | 4 | 9 | 10 | 13 | 14 | 18 | 25 | 30 | 34 | 35 | 71 | 194 |
| Vahşi tip | T | S | Q | T | N | Y | S | N | Q | S | S | S |
| 20 | | P | | Y | H | F | E | | C | E | T | H |
| 21 | | P | | F | H | F | | | L | E | T | |
| 22 | | | S | F | H | | | | C | E | T | H |
| 23 | | P | | F | H | | E | | H | E | | H |
| 24 | | P | S | | H | F | E | | H | E | T | H |
| 25 | | P | S | Y | H | F | E | | L | E | T | H |
| 26 | | P | | F | H | F | E | | C | E | T | |
| 27 | | P | | F | H | F | E | | C | E | T | H |
| 28 | | P | S | F | H | | E | V | C | E | T | H |
| 29 | | P | S | Y | H | F | E | | C | E | T | H |
| 30 | | P | | Y | H | | E | V | L | E | | H |
| 31 | | P | | Y | H | | E | V | L | E | T | H |
| 32 | | P | S | | H | F | E | | C | E | T | |
| 33 | | P | S | | H | F | E | V | H | E | T | |
| 34 | | P | S | F | H | F | E | | C | E | | H |
| 35 | | P | S | F | H | F | E | | H | E | T | H |
| 36 | | P | | Y | H | | E | | L | E | T | H |
| 37 | | P | S | Y | H | F | E | | H | E | T | H |
| 38 | | P | S | | H | F | E | V | L | E | T | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|--|---|---|---|---|--|---|---|---|---|
| 39 | | P | | Y | H | | | | C | E | T | H |
| 40 | | P | | Y | H | | E | | H | E | T | |
| 41 | | P | | Y | H | F | E | | C | E | T | H |
| 15 | | | | Y | | F | | | | | T | |
| 16 | | P | | | H | F | | | C | E | | |
| 17 | L | | | | H | | E | | C | E | | |

Tablo 10B

| Noktasal Yukarı Mutantlar | | |
|---------------------------|----------|-------|
| | Mutasyon | Kodon |
| 1 | T4L | CTT |
| 2 | S9P | CCC |
| 3 | Q10S | TCA |
| 4 | T13Y | TAC |
| 5 | T13F | TTT |
| 6 | T13W | TGG |
| 7 | Y18F | TTC |
| 8 | S25E | GAG |
| 9 | Q34L | TTG |
| 10 | Q34H | CAT |
| 11 | Q34C | TGT |

| | | |
|----|-------|-----|
| 12 | S35E | GAG |
| 13 | S71T | ACA |
| 14 | S194H | CAT |

Tablo 10C

| | |
|------------------------------------|--------------------|
| Kısa harmanlanmış yukarı mutantlar | |
| 15 | 13Y 18F 71T |
| 16 | 9P 14H 18F 34C 35E |
| 17 | 4L 14H 25E 34C 25E |

- Şekil 15, yukarıdaki, Tablo 10'da belirtilen gibi sekanslara sahip olan enzimlerin enzimatik aktivitesini gösteren verileri özetleyen bir tablo olup, burada bu enzimlerin tamamının Tablo 10'da belirtildiği gibi SEK ID NO: 384'ün sekans varyasyonları olduğu belirtilmektedir. Örneğin, "enzim 20" de: amino asit pozisyonu 9 bir P veya bir prolin ("vahşi tip" veya "SEK ID NO: 384, bir S veya bir serindir) amino asit pozisyonu 13 bir "Y", veya bir " tirozin" ("vahşi tip" veya SEK ID NO: 384, bir T veya treonindir). Aksi belirtilmedikçe, tüm çalışmalar, Kuzey yumuşak kereste brownstock küspesi (örn. SSWB, Güney yumuşak kereste brownstock küspesi) üzerinde yapılmıştır. Yüksek / düşük kapa faktörleri belirtilmiştir. Metodoloji yukarıda tartışılmıştır (örneğin, "X", "Do" ve "E1" veya "Ep" için, yukarıdaki Örnek 9 ve 10'daki açıklamalara bakınız). Parlaklık ve "kimyasal tasarrufları" belirtilmiştir; buluşa ait bir hemiselüolitik enzimin (ksilanaz) hemiselülozu parçalamak (hidrolize etmek) için başlangıçta kullanıldığı ve bir ikinci ağartma kimyasal adımının kalan ligninin parçalanması için kullanıldığı ikinci bir ağartma kimyasal adımında "kimyasal tasarrufları" klor (element halde klor ya da klor dioksit), sodyum hidrosülfid ve / veya sodyum hipoklorit gibi kimyasal ağartıcının daha az kullanımını gösterir.
- Yukarıda belirtildiği gibi, buluşun enzimleri ve prosesleri, aynı zamanda, lakkazı ve / veya manganez peroksidaz (MnP) gibi oksidatif enzimler kullanarak, pulpatı delignize

etmek için enzimatik ağartmaya ikinci bir yaklaşım ile birlikte de kullanılabilir. Bu enzimlerden lakkaz tercih edilir, çünkü MnP hidrojen peroksit, mangan (II) iyonları ve bir şelatör gerektirir. Lakkaz, hafif oksijen basıncı altında hamurun ayrılmasına neden olabilir, ancak yukarıda bahsedildiği gibi, araçlar eklendiğinde oldukça etkilidir.

- 5 Katalizörün geliştirilmiş delignasyon yöntemleri, örneğin, polisülfid veya antrakınon ile birlikte kullanılabilir. Antrakınon, küspe haline getirme hızını artırabilen, verimi artırabilen ve küspe haline getirmede kimyasal kullanım miktarını % 10'a kadar azaltabilen bir küspe reaksiyon katalizörüdür. Antrakınon ve polisülfürün her ikisinin birlikte kullanımı mümkündür.
- 10 Lakkaz, yukarıda tartışıldığı gibi, açıklama yöntemleriyle bağlantılı olarak kullanılabilir. Örneğin, lakkaz bir işlemde bir oksijen reaktöründe kullanılır, burada lakkaz oksijen reaktöründeki lignini parçalar. Küspe, lakkaza kendiliğinden aracılık eden çeşitli bileşenleri salabilirken, organik ya da inorganik araçlar eklenir (yukarıdaki tartışmaya bakınız, örneğin, alternatif örnek araçlar, bir örnek organik aracı olarak 2,2'-azinobis
- 15 (3- etilbenzotiazolin- 5- sülfonat) (ABTS) ya da U.S. patent başvurusu no. 20030096394Dokümanında dokümanında tarif edilen gibi araçlar içerir). Bir esteraz (örneğin, bir lipaz) ve / veya bir oksidoredüktaz (örneğin, bir peroksidaz) gibi başka bir hidrolaz da eklenebilir. pH ve / veya sıcaklık reaktörde değiştirilebilir.

ORNEK 11: SEK ID NO: 382'nin enzimatik aktivitesini gösteren çalışmalar

- 20 Bu örnek, SEK ID NO: 382'de (örn., SEK ID NO: 381 ile kodlanmış) belirtilen bir amino asit sekansına sahip olan ksilanaz enziminin enzimatik aktivitesini gösteren çalışmaları açıklar.

SEK ID NO: 382'nin enzimatik aktivitesi, Güney Yumuşak Ağaç (SSWB) üzerinde gösterildi, enzimin SSWB üzerindeki performansı Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil

25 19'da özetlendi.

Brownstock için: SEK ID NO: 382, 40- 70 °C sıcaklık aralığında ve 5- 8 pH aralığında çok iyi bir performans gösterdi. Bu koşullar altındaki kimyasal tasarrufları % 18 ila % 22 arasında değişti. SEK ID NO: 382'nin stabilitesi, SSWB'de 90 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda, pH 8'de (kimyasal tasarruflar şartlara bağlı olarak) çalışmasına izin verdi.

- 30 O₂ sonrası için SSW- O₂, OD küspesinin her bir gramında 0.05U SEK ID NO: 382 kadar az gerekti. SEK ID NO: 382, SSW- O₂'nin ön- muamelesinde kullanıldığında sıcaklık, pH, katı madde % 'si, muamele süresi dahil olmak üzere çeşitli işlem koşulları için

mükemmel bir stabilite sergilemiştir. Kimyasal tasarruflar SSW- O₂ üzerinde % 22'yi (sadece Do- aşaması tasarrufları) geçebilir.

Şekil 16, SEK ID NO: 382 aktivitesini gösteren ve SSWB 0803 (Kappa # 22.8) üzerindeki (X) DoEp verilerini özetleyen (ayrıntılı açıklama için yukarıda bakınız) bir tablodur; X: % 0 katı ve 60 dak.; istenilen pH'a ayarlanmış küspe filtratı - tamponlanmamış sistem. Şekil 16'da, SEK ID NO: 382, % 18 kimyasal tasarruf sağlayan 0.6 U / g OD küspesinde aktivite göstermiştir.

Şekil 17, SEK ID NO: 382 aktivitesini gösteren ve SSWB 0803 (Kappa # 22.8) üzerindeki (X) DoEp verilerini özetleyen bir tablodur; X: pH = 8 ve 30 dak, % 10 katı madde; istenilen pH'a ayarlanmış küspe filtratı - tamponlanmamış sistem. Şekil 17'de, SEK ID NO: 382, SSWB- GP Brunswick üzerinde 0.9 U / g, 40 °C ve 50 °C'de, pH 8, 30 dakikada % 14 tasarruf sağlayan aktivite göstermiştir.

Şekil 18, SEK ID NO: 382 aktivitesini gösteren ve SSWB 0803 (Kappa # 22.8) üzerindeki (X) DoEp verilerini özetleyen bir tablodur; X: 40 °C, 30 dak ve % 10 katı; istenilen pH'a ayarlanmış küspe filtratı - tamponlanmamış sistem. Şekil 18'de, SEK ID NO: 382, SSWB- Brunswick'in SEK ID NO: 382 ile ön- muamelesinin % 18'lik bir kimyasal tasarruf sağladığını gösteren ve daha düşük bir pH'ta (pH 6), 40 °C'de, 30 dakika biraz daha iyi bir performans gösterdiğini gösteren aktiviteyi kanıtlamıştır.

Şekil 19, SEK ID NO: 382 aktivitesini gösteren ve SSWB 0803 (Kappa # 22.8) üzerindeki (X) DoEp verilerini özetleyen bir tablodur; SSWB üzerindeki (X)DoEp (Kappa # 28.6) X: 40 °C, pH = 7, 30 dak ve % 4.5 katı; İstenen pH - istenilen pH'a ayarlanmış küspe filtratı - tamponlanmamış sistem. Şekil 19'da, SEK ID NO: 382, SSWB- Brunswick'in SEK ID NO: 382 ile ön muamelesinin % 4.5'lük katılarda % 18'lik kimyasal tasarruf sağladığını gösteren aktiviteyi kanıtlamıştır.

Şekil 20, SEK ID NO: 382'nin, ayrıca O₂ sonrası Kuzey Sert Ağacı (NHW) üzerinde, 6- 8.5 pH aralığında, pH 10'da, 60 °C ve 90 °C bile tutma aktivitesinde de etkili olduğunu gösteren bir tablodur. Şekil 20'de, NSWB Kuzey Ağacı'nın (Kappa # 24.8) (X)DoEp biyo- ağartması X: 0.7U / g, pH = 10, 60 dak, % 10 katı madde.

Ozetle: SEK ID NO: 382, örneğin yumuşak ağaç, sert ağaç, düşük kappa, yüksek kappa, vb. dahil olmak üzere test edilen tüm hamur tiplerinde aktiftir; SEK ID NO: 382, örneğin, sıcaklık, pH,% katı madde, muamele süresi dahil olmak üzere, işlem koşulu değişimi için yüksek bir toleransına sahiptir; SEK ID NO: 382, en iyi performansa 70

°C'ye kadar sahip geniş bir çalışma sıcaklığı aralığı (39 °C ila 90 °C) üzerinde gerçekleştirir; SEK ID NO: 382 geniş bir pH aralığında (en azından test edilen pH 5.2-10.0) ve pH 6.0- 8.0 aralığında optimal olarak aktiftir; SEK ID NO: 382, yaklaşık 20 dakika içinde istenen ön- ağartma etkisini elde edebilmekte ve bu sayede gelişmiş besleme hızları elde edilebilmektedir; ve SEK ID NO: 382, çeşitli küspe kıvamlarında (yaklaşık % 3 ila % 10) iyi bir performans sergiler ve X aşaması sırasında artan besleme seçeneğine izin verir.

ORNEK 12: Buluşun enzimlerinin enzimatik aktivitesini gösteren çalışmalar

Bu örnek, SEK ID NO: 482 (örn. SEK ID NO: 481 ile kodlanmış), SEK ID NO: 490, SEK ID NO: 502, SEK ID NO: 504 ve SEK ID NO: 512'nin amino asit sekanslarına sahip enzimler dahil olmak üzere, örnek ksilanazın enzimatik aktivitesini gösteren çalışmaları tarif eder. SEK ID NO: 512 amino asit sekansına sahip olan ksilanaz için pH 10'da ve 45 °C, 50 °C ve 55 °C sıcaklıklarda aktiviteler tarif edilmiştir.

Bu ksilanazların değerlendirilmesi için örnek bir analiz:

1. Başlangıç Taraması - azo- ksilan (çözelti tabanlı) substratı kullanarak
 - a. Keşif vuruşları uygun bir ekspresyon vektörüne alt klonlandı
 - b. Ksilanaz alt klonları, standart koşullar altında 1 L'lik çalkalama tüpünde eksprese edildi.
 - c. Alt klonların ekspresyon seviyeleri SDS- PAGE ile belirlendi.
 - d. Enzimlerin enzimatik aktivitesinin seviyesi, üreticinin tavsiye edilen analiz protokolüne göre, 100 mM sodyum fosfatta, pH 8 olan Megazyme® substratı Birchwood Azo- ksilan kullanılarak Azo- ksilan analizi ile belirlenmiştir. Enzim numunelerinin konsantrasyonları, pH 8'de eşit miktarda ksilanaz aktivitesine sahip olacak şekilde ayarlandı.
 - e. Azo- ksilan analizi, daha sonra pH 10.4'te 100 mM sodyum borat tamponu içinde normalize edilmiş numunelerle tekrarlandı.

SEK ID NO: 482, SEK ID NO: 490, SEK ID NO: 502, SEK ID NO: 504 ve SEK ID NO: 512'nin amino asit sekanslarına sahip olan enzimleri kullanan bu protokolden elde edilen azo- ksilan analizi verileri, Şekil 21'de gösterilmektedir.

2. Başlangıç Taraması - ENZ- CHEK ULTRA XYLANASE ASSAY KIT™ (Invitrogen)

a. Ksilanaz enzim numuneleri, Azo- ksilan analizi ile aynı şekilde hazırlandı (yukarıda bölüm 1).

b. Enzimlerin enzimatik aktivitesi, Invitrogen tarafından ENZ- CHEK ULTRA XYLANASE ASSAY KIT™ (Ürün numarası E33650) adıyla satılan ticari olarak temin edilebilen analiz kiti kullanılarak ölçülmüştür. ENZ- CHEK™ kit substratı, klonlanazların varlığında, kitle sağlanan standartlar kullanılarak ksilanaz aktivitelerini ölçmek için kullanılabilen floresan sinyal üretir. Ksilanaz enzimlerini test etmek için kullanılan protokol, üreticinin önerdiği protokolü biraz değiştirdi. Modifikasyonlar temel olarak üretici tarafından tavsiye edilen farklı pH ve sıcaklıklarda ksilanazların test edilmesini içeriyordu.

3. İkincil Tarama - Örnek Küspe Analizleri

a. Azo- ksilan analizinden elde edilen enzimler, burada daha önce tarif edildiği gibi Nelson- Somogyi analizi kullanılarak buğday arabinoksilan üzerinde aktivite için test edildi. Daha sonra, belirli bir küspe türü ve klor dioksit yüklemesi için elde edilebilecek kimyasal tasarruf miktarını belirlemek için bir laboratuvar ölçekli ağartma deneylerinde test edildi. İstenen performans özelliklerini karşılayanlar, TAPPI torbalı biyo- ağartma deneyinde, çeşitli yüklemelerde ve pH seviyelerinde üç kopya halinde test edildi.

b. Bu analiz için tipik veriler Şekil 22 ve Şekil 23'te gösterilmektedir.

4. Örnek enzim karakterizasyonu taraması - Sıcaklık profili

a. Ksilanazların termotoleransı, gittikçe daha yüksek sıcaklıklarda pH 8 ve pH 10.4'te azo- ksilan analizi kullanılarak analiz edilebilir; ve bu buluşa ait enzimler, bu analiz kullanılarak test edildi. Her sıcaklıkta reaksiyonun başlangıç hızları kaydedildi ve ksilanazların optimum performans sıcaklığını belirlemek için çizildi. Tipik termal profil grafikleri Şekil 24 ve Şekil 25'te gösterilmektedir.

b. Kalıntı aktivitesi - Enzimlerin termostabilitesini test etmek için kullanılacak bir başka örnek analiz, kalıntı aktivitesi metodudur, ki burada bir enzim numunesi belirli bir süre boyunca belirli bir pH'ta yükseltilmiş bir sıcaklıkta işlenir ve daha sonra standart koşullar altında müsaade edilen sıcaklık (tipik olarak 37 °C) altında analiz edilir. Belirli bir sıcaklıktaki bir yarı ömür daha sonra belirlenir ve bu sıcaklık koşulları altında belirli bir enzim uygunluğunun bir ölçüsünü sağlar. SEK ID NO: 512amino asit dizisine sahip olan buluşun örnek ksilanazının birinin pH 10'da ve 45 °C, 50 °C ve 55 °C'lik sıcaklıklarda bir kalıntı aktivitesi grafiği Şekil 26'da gösterilmektedir.

ORNEK 13: Yapı analizi için kristallendirme ve veri toplama

Bu örnek, amino asit dizisi SEK ID NO: 482'ye (örn., SEK ID NO: 481 tarafından kodlanmış) sahip olan ksilanaz için kristalizasyon ve veri toplama ve yapı analizini açıklar ve gösterir.

5 Kristallendirme ve veri toplama

SEK ID NO: 482'nin kristalleri (ddH₂O içinde 21g/l), 20 °C'de % 55 (w/v) PEG 400, 0.15 M lityum sülfat, 0.1 M tri- sodyum asetat (pH 5.1) içinde büyütüldü. Kristaller iki ila üç günlük bir periyot süresince büyüdü ve ana likörde kriyo korumalıydı. SEK ID NO: 382'nin (SEK ID NO: 381 tarafından kodlanmış) kristalleri (ddH₂O içinde 21g/l), 20 °C'de % 12 (w/v) PEG 8000, 0.1 M Tris/HCl (pH 9) içinde büyütüldü. Kristaller ayrıca iki ila üç gün sonra gözlemlendi ve ilave % 30 (v/v) gliserol içeren ana sıvı içinde kriyo-soğutuldu. SEK ID NO: 382 için 1.8Å ve SEK ID NO: 482 için 1.9Å'lık bir maksimum çözünürlük için kırınım verileri, bir MicroMax 007 (bakır 1.5418 Å) dönen anot X- ışını kaynağı üzerine monte edilmiş bir RAXIS- IV görüntü plakası detektörü kullanılarak 100 K'de tek kristallerden kaydedilmiştir. Kırınım verileri MOSFLM'ye entegre edildi ve SCALA'da ölçeklendi. Diğer tüm hesaplamalar CCP4 paketinin programlarıyla gerçekleştirilmiştir. Her iki veri kümesinin her biri toplam 250 görüntü içerdi ve 1 °lik salınım açısı ile toplandı.

Yapı çözümü

Kırınım verileri, $a=64.7 \text{ Å}$, $b=33.6 \text{ Å}$, $c=83.1 \text{ Å}$, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=101.90^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$ olan birim hücre boyutları ile ve kristalografik asimetric birimi işgal eden bir molekül ile SEK ID NO: 482'nin kristallerinin C2 uzay cisminde ait olduğunu ortaya koymuştur. SEK ID NO: 482'nin yapısı, araştırma modeli olarak Bacillus circulans XynA'nın (PDB erişim numarası 1xnb; PDB, Yapısal Biyoenformatik Araştırma (RCSB) web sitesinden elde edilen Protein Veri Bankasıdır) daha önceden belirlenmiş bir yapısı kullanılarak MOLREP'te moleküler ikame ile çözülmüştür. Coot'ta manuel yeniden yapılanma turları, REFMAC'de kısıtlı arıtma ile değiştirildi. Çözücü su molekülleri Arp_waters kullanılarak eklendi ve Coot kullanılarak manuel olarak kontrol edildi.

SEK ID NO: 382 'nin kristallerinden kaynaklanan kırınım verileri, $a=36.3 \text{ Å}$, $b=63.2 \text{ Å}$, $c=75.1 \text{ Å}$, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=90.00^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$ birim hücre boyutları ve ayrıca kristalografik asimetric birimi işgal eden bir molekül ile P2₁2₁2₁ uzay grubuna aitti. SEK ID NO: 382'nin yapısı, arama modeli olarak SEK ID NO: 482'nin yapısı kullanılarak

MOLREP'de moleküler ikame ile çözülmüştür. Arıtma daha sonra SEK ID NO: 482'ye benzer şekilde gerçekleştirilmiştir.

ORNEK 14: Buluşun enzimlerinin enzimatik aktivitesi ve karakterizasyonu

5 Bu örnek, ksilanaz enzimlerinin çeşitli özelliklerini ve bu tespitleri yapmak için örnek deneyleri tarif eder.

Buluş, SEK ID NO: 382'nin olgun örnek enziminin M_r 'si 382 23 kDa idi, SDS- PAGE ile belirlendi. Boyut dışlama kromatografisi ile tahmin edilen doğal enzimin boyutu, enzimin monomerik olduğunu gösteren 25 kDa'dır. SEK ID NO: 382 , yulaf kırmızılı ksilanı $155000 \pm 2700 \text{ dk}^{-1}$ lık bir k_{cat} ile ve $2.6 \pm 1.4 \text{ mg/ml}$ K_m ile hızla hidrolize eder. 10 Enzim belirgin termostabilite gösterdi ve 70 °C'ye kadar termal inaktivasyona tabi değildir. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) (yukarıda detaylı olarak tarif edilmiştir), ksilanazın erime sıcaklığının 74.2 °C olduğunu göstermiştir. Açılımın termodinamikleri, proteinin ısıl açılımı geri dönüşümsüz olduğu için araştırılmamıştır; yeniden katlama taraması yapmak mümkün olmamıştır ve proteinin belirgin bir şekilde 15 çökmesi olmuştur. Ksilanazın katlanmış ve katlanmamış formu arasındaki ΔG ölçüm girişimleri de başarısız oldu, çünkü dairesel dikroizm ve floresan spektroskopisi, proteinin 37 °C'de 6 M guanidin hidroklorid içinde üç ay inkübe edildiğinde bile denatüre edilemeyeceğini gösterdi.

Tekli amino asit mutantları S9P, N14H, T13F, Y18F, Q34L, S35E ve S71T ve buluşun 20 SEK ID NO: 482 örnek enzimi anyon değişim kromatografisi ile elektroforetik homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. Bu mutantların aktivitesi, stabiliteyi arttıran enzim yapısında değişiklikler olarak memnuniyet verici olan "vahşi tip" enzime göre tehlikeye girmeyen tüm spesifik aktivitelerin, genellikle katalitik verimin azalmasıyla sonuçlandığını gösterdi. Burada rapor edilen tam katalitik aktivitenin korunması 25 muhtemelen kullanılan tarama stratejisini yansıtmaktadır.

Ksilanaz mutantlarının Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC), tek bir amino asit değişikliği ihtiva eden tüm varyantların "vahşi tip" enzimin 2- 11° (derece) üstünde değişen yükseltilmiş T_m 's sergilediğini göstermiştir. Buluş, SEK ID NO: 482 kombine "Mutant" örnek ksilanazı: ana ksilanazından 29° daha yüksek olan 103 °C'lik bir 30 T_m 'ye sahip oldu. Termal inaktivasyona karşı direnci araştırmak için SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482, çeşitli sıcaklıklardaki 15 dakika boyunca ısıtılmış ve 37 °C'lik izin sıcaklığında test edilmiştir; SEK ID NO: 382 ksilanazının "vahşi tip" inin termal

inaktivasyonunu ve buluşun SEK ID NO: 482'nin varyantı veya "mutant" örnek ksilanazını gösteren Şekil 27'ye bakınız. İki enzim, gösterilen çeşitli sıcaklıklarda inkübe edildi, alikotlar, çeşitli zaman noktalarında çıkarıldı ve substrat olarak 4-nitrofenil- β - Dksilotriosit kullanılarak 37 °C'de kalıntısız ksilanaz aktivitesi için analiz edildi.

79 °C'de termal inaktivasyon için sözde birinci derece hız sabitleri, sırasıyla SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482, için $0.573 \pm 0.054 \text{ dk}^{-1}$ ve $0.0026 \pm 0.00029 \text{ dk}^{-1}$ olmuştur. Toplu olarak, termal inaktivasyon çalışmaları SEK ID NO: 482'yi oluşturmak üzere SEK ID NO: 382'ye uygulanan yedi mutasyonun, ksilanazın termostabilitesini büyük ölçüde arttırdığını gösteren T_m verileriyle tutarlıdır.

SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482'nin inaktivasyonunun enerjisindeki farklılığı araştırmak için termal inaktivasyon çeşitli sıcaklıklarda ölçülmüş ve veriler Arrhenius grafiklerini oluşturmak için kullanılmıştır; bu Arrhenius grafiğini gösteren Şekil 28'e bakınız: sözde 1. dereceden inaktivasyon oranının temeli, sıcaklığın karşısına karşı çizilmiştir. Çizgilerin eğimi, inaktivasyon enerjisini verir. SEK ID NO: 482 ($68.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) inaktivasyon enerjisi, vahşi tip enzime ($54.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) göre $14.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ kadar artırılır. Guanidinyum hidroklorür yükseltilmiş sıcaklıklarda uzatılmış inkübasyondan sonra bile proteini denatüre etmediği için SEK ID NO: 482'nin açılmasının ΔG 'sinin araştırılması mümkün olmamıştır.

Amino asit süstitüsyonlarının SEK ID NO: 482 enziminin termal stabilitesini arttırdığı mekanizmayı araştırmak için, hem "vahşi tip" enzimin (SEK ID NO: 382 enzimi) ve SEK ID NO: 482'nin kristal yapısı; sırasıyla, 1.8\AA ve 1.9\AA 'lık bir çözünürlükte, arama modeli olarak SEK ID NO: 382 ile % 59 sekans özdeşliği gösteren *Bacillus circulans* ksilanaz XynA (PDB erişim numarası 1xnb) kullanılarak moleküler yer değiştirme ile belirlenmiştir. Gln- 3 Gly- 197'den uzanan amino asitler, kristal yapıda açıkça görülebilmektedir; bu, klonlanmış enzimin üç N- terminali kalıntısının yüksek ölçüde düzensiz olduğunu veya proteolitik olarak işlendiğini göstermektedir. "Vahşi tip" enzim (SEK ID NO: 382 enzim), GH11 ksilanazlara özgü β - jelly rulo kıvrımını gösterir. Gerçekten de, GH11 enzimlerinin konformasyonu, sağ elin üst kısmında "parmaklar", altta "avuç" ve molekülün sağ tarafındaki başparmak ile karşılaştırılmıştır. Enzimin son modeli, sırasıyla 6 ve 8 β - iplik içeren 1 α - sarmal ve iki eğri antiparalel β - tabaka içerir. Bir DALI araştırması, SEK ID NO: 382'nin üç boyutlu yapısının, *Trichoderma reesei*'den, 0.76 \AA 'lık bir RMSD ile en çok endo- 1,4- ksilanaz II'ye benzer olduğunu ve

gerçekten de tamamı GH11 ksilanazları olan 36 protein için <1.0 Å'lık bir RMSD sergilediğini göstermektedir.

SEK ID NO: 382 enziminin içbükey büyük β - tabakası substrat bağlanma yarığını içerir. Aktif alanın merkezinde, sırasıyla β - iplikçikleri 9 ve 13 üzerinde iki katalitik kalıntı, Glu- 89 (katalitik nükleofil) ve Glu- 181 (katalitik asit- baz) bulunmaktadır. GH11 5 enzimlerinde değişmez olan iki glutamat, çift değiştirme mekanizması ile glikosidik bağları hidrolize eden "tutma" glikosid hidrolazların katalitik aygıtı ile tamamen uyumlu olan ~ 6 Å ile ayrılır. GH11 ksilanazların pH optimumu, asit / baz katalizörüne bitişik amino asit tarafından etkilenir. Bir asit pH optimumunu gösteren enzimlerde bu kalıntı 10 aspartik asit iken, daha alkali koşullar altında çalışanlarda asparagindir. SEK ID NO: 382'de Glu- 181'e bitişik kalıntı, katalitik asit- baz, enzim tarafından gösterilen alkalın pH optimum ile tutarlı Asn- 48'dir. Substrat bağlanma yarığının topolojisi, enzimin beş şeker bağlayıcı alt alan, üç glikon (- 3 ila - 1) ve bağ bölünmesi sahasının iki aglikonunu (+1 ve +2) içerdiğini gösterir.

15 Buluşun SEK ID NO: 482'sinin örnek niteliğindeki enziminin kristal yapısı, "vahşi tip" enzime - SEQ İD NO: 382 enzimine - son derece benzemektedir. Proteinin N- terminal bölgesinde bulunan "vahşi tip" SEK ID NO: 382 ve "mutant" ksilanaz SEK ID NO: 482 arasındaki amino asit farklılıkları, β - iplikçikleri 2, 3 ve 4 ve β - iplikçikleri 1 ve 2 ile 5 ve 6'yı bağlayan halkalar üzerinde bulunur. Bu amino asit değişikliklerinin enzimin 20 termostabilitesini arttıran mekanizmalar ilgi çekicidir. N14H mutasyonları, vahşi tip enzimden yaklaşık 11 °C daha yüksek olan bir T_m ile termostabilitede en önemli artışa neden olurken, bu amino asit ve vahşi enzim Asn- 14'teki eşdeğer kalıntı arasındaki etkileşimler çok benzerdir. Böylece, her iki kalıntının O ve N omurgası, sırasıyla, kalıntı 17'nin karbonil ve amini ile hidrojen bağları yapar. "Vahşi tip" enzimdeki (SEK ID NO: 25 382) Asn- 14'ün N δ 2'si ve SEK ID NO: 482'deki His- 14'ün N ϵ 2'si, her ikisi de amino asit 34'ün karbonil omurgası ile bir hidrojen bağı yaparken, histidin ve asparajin zincirleri de, bu etkileşimlerin geometrisi ideal hidrojen bağları için alt optimum olmasına rağmen, Asn- 15 ile ek bir zayıf etkileşime neden olabilir. His- 14'ün imidazol halkasının elektron bulutu Asn- 15 ve Leu- 33 arasına sıkıştırılır ve böylece bu iki kalıntı 30 ile van der Waals temasları yapacaktır ve bu etkileşimlerin genel protein stabilitesine katkıda bulunması mümkündür. N14H mutasyonunun termostabilitede bu kadar önemli bir artışa neden olduğu kesin mekanizma şu anda çok belirsizdir ve protein yapısındaki son derece ince değişikliklerin termal stabilite üzerinde önemli bir etkisi

olabileceğine işaret etmektedir. S9P mutasyonu ayrıca enzimin, T_m 'sinde (4.6 °C) önemli bir artış ile sonuçlanır, ancak, stabilitedeki bu artışın moleküler temeli kolaylıkla belirgin değildir. Mutanttaki prolin, Phe- 21'in aromatik yan zinciri ile zayıf hidrofobik etkileşimler meydana getirmektedir, bununla birlikte, vahşi tip ksilanazdaki Ser- 9'un Oγ'si, omurga karbonil ve Lys- 23'ün NH'si ile hidrojen bağları oluşturmaktadır. Kalıntı 9, β- iplikçikleri 1 ve 2'yi bağlayan bölgede bulunduğu için, prolin halkasının, proteinin genel protein katmanı için bu döngünün konformasyonunu optimum bir konformasyona kilitleyerek protein stabilitesine katkıda bulunması mümkündür. T13F mutantında uygulanan fenilalanin, Phe- 18 ile sayısız van der Waals ile temas kurarken, vahşi tip enzimde Thr- 13'ün hidroksili, protein içinde doğrudan hidrojen bağları yapmaz. Böylelikle, T13F mutantı tarafından vahşi tipteki enzime (SEK ID NO: 382) kıyasla gösterilen artan termostabilite, Phe- 13 ve Phe- 18 arasındaki hidrofobik etkileşimlerin sonucudur. Y18F ve Q34L mutasyonlarının sağladığı stabilite artışı ilgi çekicidir. Glutaminin lösin ile ikamesi, Gln- 34'ün yan zinciri ile Gln- 3'ün Nε2'si ve Thr- 40'un Oγ'si ile protein içindeki Cys- 32'nin omurga karbonili arasındaki üç doğrudan hidrojen bağının kaybına yol açar. Bu hidrojen bağlarının kaybı, bir dereceye kadar, Leu- 34 ve Arg- 38 hidrokarbon zinciri arasındaki van der Waals temasları ile telafi edilebilir. Bu nedenle, hem Tyr- 18 hem de Leu- 34'ün, protein molekülü içindeki doğrudan etkileşimleri artırarak termostabiliteyi artırma ihtimalinin düşük olduğu görülecektir. Bununla birlikte, Tyr- 18 ve Gln- 56 ve Asn- 174'ün Oη'u arasında geniş çözücü aracılı hidrojen bağlama ağları bulunurken, Gln- 34'ün Oε1'inin de Gln- 3, Ser- 35 ve Arg38 ile su aracılı etkileşimler yaptığını belirtmek ilginçtir. Sırasıyla, Q34L ve Y18F mutasyonları yoluyla iki ve beş su molekülünün kaybı, protein katlanması ve dolayısıyla termostabilite ile ilişkili entropiyi arttırması mümkündür. S35E mutasyonunun sağladığı termostabilitedeki artış özellikle ilgi çekicidir. Uygulanan glutamatın yan zinciri, protein ile herhangi bir etkileşime girmez ve aslında oldukça düzensizdir ve dört farklı konformasyon halinde modellenmiştir. Yüzeyde yüklenen kalıntılarla önemli ölçüde stabilizasyon, tuz köprüsü oluşumuna bağlı olmasına rağmen, bireysel elektrostatik şebekede bireysel yüklü yüzey kalıntılarının optimum şekilde yerleştirilmesinin, hipertermofilik protein stabilitesi için genel bir model sağladığı gösterilmiştir. Yüklü yan zincirlerin desolvasyonu destabilize olduğu için, yük girişinin, β- iplikçikleri 4 ve 5'i (β- iplikçik 4'ün en ucunda Glu- 35) bağlayan ilmiği stabilize ederek, lokal konformasyonunu sınırlayabilir ve işbirliğini geliştirmeyi mümkün

kılmaya devam eder. Bu döngünün bozulması, açılma sürecini başlatırsa, S35E mutasyonunun protein stabilitesi üzerindeki dramatik etkisinin mantığı daha belirgindir.

Bu çalışma, yapısal düzeyde artan stabilite ile enzimlerin (bu buluşa ait polipeptidler dahil) tasarlanması için Gen Bölgesi Doygunluk Mutajenezi™'nin (GSSM™) evriminin güçlü metodolojisini göstermektedir. İlgi çekici bir şekilde mutasyonların çoğunluğu, 5 iyon çiftleri, disülfür köprüleri, boşlukların hidrofobik kalıntılarla doldurulması veya protein içinde artan hidrojen bağlama ağları gibi tipik olarak artan stabilite ile ilişkili etkileşimlere aracılık etmez. Dikkate değer bir şekilde, T_m 'de 8°'lik bir artışa yol açan en çok termostabilize mutasyon, histidinin imidazol halkası ve komşu kalıntılar arasındaki birkaç van der Waals temaslarının katılmasıyla etkisine aracılık ediyor gibi 10 görünmektedir. Bu nispeten zayıf etkileşimlerin, stabilitede böyle büyük bir artışa neden olması beklenmezken, Y18F mutasyonu, protein içindeki doğrudan etkileşimler üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir, fakat bir çözücü aracılı hidrojen bağı ağını keserek stabiliteyi arttırabilir. Kristalografik yapısal analiz, geçmişte bile, SEK ID NO: 482'deki 15 mutasyonların enzimin termostabilitesine katkıda bulunduğu mekanizmanın net olmadığını göstermektedir. Bu yöntem, hem GSSM evrimi hem de yüksek verimlilik taraması kullanarak, burada alınan stokastik olmayan yaklaşım GSSM yönteminin gücünü vurgular.

SEK ID NO: 382 ve SEK ID NO: 482'nin biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, bu 20 enzimleri endüstriyel ve diğer kullanımlar için çekici hale getirir; bunlar - ve bu buluşun tüm enzimleri - hayvan yemi, kağıt / kağıt hamuru ve biyoenerji sektörleri dahil olmak üzere çeşitli biyoteknoloji temelli sanayide birçok potansiyel uygulamaya sahiptir.

ORNEK 15: Buluşun enzimlerinin enzimatik aktivitesi ve karakterizasyonu

25 Bu örnek, aşağıda detaylı olarak açıklandığı gibi, örneğin, enzimatik aktivite (enzimatik aktivite (bilinen enzimlere sekans özdeşliği - veya homolojisi - ile belirlenen aktivite dahil olmak üzere), polipeptidin başlangıç kaynağı ve benzerleri dahil olmak üzere çeşitli ksilanaz karakteristiklerini tarif etmektedir.

Orneğin, hemen aşağıdaki tabloyu okumaya yardımcı olmak için, birinci satırda, 30 örneğin SEK ID NO: 483 ile kodlanan SEK ID NO: 484 dizisine sahip olan polipeptide referans verilerek, bu dizinin başlangıç kaynağı bilinmemektedir, bilinen enzimlere olan sekans homolojisine dayanarak, ksilanların Aile 10'u içine sınıflandırılabilir, bilinen

enzimlere olan sekans homolojisine dayanarak "tahmin edilen" bir EC numarası olan 3.2.1.8'e sahiptir ve ksilanaz aktivitesine sahiptir; sağdaki son kolonda, azo- ksilanın enzimatik aktivitesinin sonuçları (analiz yukarıda tarif edilmektedir).

Aşağıdaki ikinci tablo, dizilerin kamu veri tabanları ile sekans özdeşlik karşılaştırması dahil olmak üzere, nükleik asitlerin ve polipeptitlerin seçilmiş özelliklerini tanımlayan tablolarıdır. Tablo 2 ve 3'te tarif edilen tüm diziler, iki takım veri tabanına karşı bir BLAST araştırmasına (aşağıda detaylı olarak tarif edildiği gibi) tabi tutulmuştur. İlk veri tabanı seti NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) aracılığıyla kullanılabilir. Bu veritabanlarına karşı yapılan araştırmaların tüm sonuçları "NR Açıklama", "NR Erişim Kodu", "NR E değeri" veya "NR Organizması" başlıklı sütunlarda bulunur. "NR", NCBI tarafından muhafaza edilen Yedeksiz nükleotid veri tabanını ifade eder. Bu veritabanı GenBank, GenBank güncellemeleri ve EMBL güncellemelerinin bir bileşimidir. "NR Açıklaması" sütunundaki girişler, kaynak organizma, gen adı / protein adı veya sekansın fonksiyonunun bir açıklaması gibi sekansın bir tanımını içeren herhangi bir NCBI kaydındaki tanım hattını ifade eder. "NR Erişim Kodu" sütunundaki girişler, bir dizi kaydına verilen benzersiz tanımlayıcıyı belirtir. "NR E değeri" sütunundaki girdiler, sorgu dizisi ile bir veritabanı dizisi arasında bulunan bir hizalama skorunun, aynı sayıda karşılaştırmalar arasında bulunabilme olasılığını temsil eden Beklenen değerini (E değeri) belirtir. Mevcut BLAST araştırmasında yapıldığı gibi rastgele diziler. "NR Organizması" sütunundaki girdiler, en yakın BLAST vuruşu olarak tanımlanan dizinin kaynak organizmasını ifade eder. İkinci veri tabanı seti, toplu olarak Thomson Derwent (Philadelphia, PA) aracılığıyla sunulan GENESEQ™ veritabanı olarak bilinir. Bu veritabanına karşı yapılan aramaların tüm sonuçları "GENESEQ™ Protein Açıklaması", "GENESEQ™ Protein Erişim Kodu", "GENESEQ™ Protein E Değeri", "GENESEQ™ DNA Açıklaması", "GENESEQ™ DNA Erişim Kodu" ya da "GENESEQ™ DNA E Değeri" başlıklı sütunlarda bulunur. Bu sütunlarda bulunan bilgiler, NCBI veri tabanları yerine GENESEQ™ veritabanına karşı BLAST aramalarından türetilmesi dışında, yukarıda açıklanan NR sütunlarında bulunan bilgilerle karşılaştırılabilir. Ayrıca, bu tablo "Ongörülen EC No." sütununu içerir. Bir EC numarası, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) Enzim Komisyonu tarafından geliştirilen bir standart enzim isimlendirme şemasına göre bir enzim tipine atanan sayıdır. "Ongörülen EC No." sütunundaki sonuçlar, Kegg (Genler ve Genomlar Kyoto Ansiklopedisi) veritabanına karşı bir BLAST araması ile belirlenir. Üst BLAST

eşleşmesini e^{-6} 'ya eşit veya daha az bir E değeri varsa, üst eşleşmeye atanan EC numarası tabloya girilir. En vuruşların EC numarası, buluşun dizisinin EC sayısının ne olabileceğine dair bir kılavuz olarak kullanılır. "Sorgu DNA Uzunluğu" ve "Sorgulama Protein Uzunluğu" sütunları, sırasıyla NCBI veya GENESEQ™ veri tabanlarına karşı araştırılan veya sorgulanan buluşun dizisinde sırasıyla, nükleotidlerin sayısını veya sayı amino asitlerini ifade eder. "GENESEQ™ veya NR DNA Uzunluğu" ve "GENESEQ™ veya NR Protein Uzunluğu" sütunları, sırasıyla BLAST araştırmasından gelen üst eşleşme dizisindeki nükleotidlerin sayısını veya sayı amino asitlerini belirtir. Bu sütunlarda sağlanan sonuçlar, ya NCBI veritabanlarından ya da Geneseq veritabanından daha düşük E değerini döndüren aramadan gelir. "GENESEQ™ veya NR % ID Protein" ve "GENESEQ™ veya NR % ID DNA" sütunları, buluşun dizisi ile üst BLAST eşleşmesi dizisi arasındaki yüzde dizi özdeşliğini ifade eder. Bu sütunlarda sağlanan sonuçlar, NCBI veritabanlarından veya GENESEQ™ veritabanından daha düşük E değerini döndüren aramadan gelir.

15

| SEK ID NO: | Kaynak | AİLE | Tahmin Edilen EC Numarası | Aktivite Sınıfı | Azo- Ksilan üzerindeki Enzimatik Aktivite |
|------------|------------|------|---------------------------|-----------------|---|
| 483, 484 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 485, 486 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | test edilen koşullar altında hiçbir şey gözlemlenmedi |
| 487, 488 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | ++ |
| 489, 490 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | düşük |
| 491, 492 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | düşük |

| | | | | | |
|-------------|------------|----|---------|----------|---|
| 493, 494 | Bilinmeyen | 10 | | Ksılanaz | |
| 495, 496 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 497, 498 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 499, 500 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 501, 502 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 503, 504 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 505, 506 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 507, 508 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 509, 510 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | test edilen koşullar altında hiçbir şey gözlemlenmedi |
| 511, 512 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 513, 514 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 515, 516 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |

| | | | | | |
|-------------|------------|-------------|---------|----------|---|
| 517, 518 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 519, 520 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 521, 522 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 523, 524 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | test edilen koşullar altında hiçbir şey gözlemlenmedi |
| 525, 526 | Bilinmeyen | 10 ve 43 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 527, 528 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | test edilen koşullar altında hiçbir şey gözlemlenmedi |
| 529, 530 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | + |
| 531, 532 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 533, 534 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 535, 536 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |
| 537, 538 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | ++ |
| 539, 540 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | bir miktar |

| | | | | | |
|-------------|------------|----|---------|-------------------|---|
| 541, 542 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | + |
| 543, 544 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 545, 546 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 547, 548 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 549, 550 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 551, 552 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 553, 554 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 555, 556 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 557, 558 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 559, 560 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 561, 562 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksilanaz | |
| 563, 564 | Bilinmeyen | 8 | | Ksilanaz/Glukanaz | |

| | | | | | |
|-------------|------------|----|---------|----------|--|
| 565, 566 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 567, 568 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 569, 570 | Bilinmeyen | 30 | | Ksılanaz | |
| 571, 572 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 573, 574 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 575, 576 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 577, 578 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 579, 580 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 581, 582 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 583, 584 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 585, 586 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 587, 588 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |

| | | | | | |
|-------------|------------|----|---------|----------|--|
| 589, 590 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 591, 592 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 593, 594 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 595, 596 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 597, 598 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 599, 600 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 601, 602 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 603, 604 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 605, 606 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 607, 608 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 609, 610 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 611, 612 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |

| | | | | | |
|-------------|------------|----|---------|----------|--|
| 613, 614 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 615, 616 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 617, 618 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 619, 620 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 621, 622 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 623, 624 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 625, 626 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 627, 628 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 629, 630 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 631, 632 | Bilinmeyen | 10 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |
| 633, 634 | Bilinmeyen | 8 | | Ksılanaz | |
| 635, 636 | Bilinmeyen | 11 | 3.2.1.8 | Ksılanaz | |

| SEK ID NO: | NR Açıklama | NR Erişim Kodu | NR E değeri | NR Organizma | Geneseq Protein Açıklaması | Geneseq Protein Erişim Kodu | Geneseq Protein Edeğeri | Geneseq DNA Açıklama | Geneseq DNA Erişim Kodu |
|------------|---|----------------|-------------|----------------------------------|--|-----------------------------|-------------------------|--|-------------------------|
| 483, 484 | aile 10 ksilanaz [Caldicellulosiruptor sp. Rt69B.1] | 2760908 | 0 | Caldicellulosiruptor sp. Rt69B.1 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34904 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34903 |
| 485, 486 | Ksilanaz, glikozil hidrolaz aile 10 [Clostridium acetobutylicum]. | 15004819 | 5.00E-75 | Clostridium acetobutylicum | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34864 | 1.00E-78 | İnsan enzim proteini kodlayan gen. | AAD48289 |
| 487, 488 | Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 [gb]ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+08 | 3.00E-88 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35142 | 1.00E-93 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34915 |
| 489, 490 | Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 [gb]ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+08 | 1.00E-115 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35142 | 1.00E-132 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34881 |
| 491, 492 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 90023252 | 0 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | AEH81891 | 0 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | AEH81892 |
| | Glikozit hidrolaz, aile 10: Klostridyum | | | | Çevresel numune | | | Propionibakterium acnes | |

| | | | | | | | | | |
|-------------|--|--------------|-------------------|---|---|--------------|---------------|---|--------------|
| 493, 494 | selülozon enzimi, dokerin tipi I:Karbonhidrat bağlama, CenC- benzeri [Clostridium thermocellum ATCC 27405] | 678738 37 | 5.00 E- 33 | Clostridium thermocellum ATCC 27405 | SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 854 | 4.00E- 32 | immünojenik protein # 28612. | AAS59 544 |
| | gi 67851540 gb EA M47104.1 Glikozit hidrolaz, aile 10:Klostridyum selülozon enzimi, dokerin tipi I: | | | | | | | | |
| | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+ 08 | 1.00 E- 112 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 920 | 1.00E- 141 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 81 |
| 495, 496 | gi 116224961 gb ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | | |
| 497, 498 | endo- 1;4- beta- ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 462536 16 | 1.00 E- 107 | kültürlenmemi ş bakteri | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 978 | 1.00E- 108 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 63 |
| | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+ 08 | 1.00 E- 122 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 142 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 41 |
| 499, 500 | gi 116224961 gb ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | | |
| 501, 502 | endo- 1;4- beta- ksilanaz XynI [Cellulomonas flavigena] | 1.1E+0 8 | 4.00 E- 79 | Cellulomonas flavigena | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 996 | 1.00E- 112 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 95 |
| 503, 504 | endo- beta- 1;4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 757807 | 1.00 E- 100 | Cellvibrio mixtus | Çevresel numune SEQ ID | ADJ34 976 | 1.00E- 107 | Pseudomona s fluorescens ksilanaz kodlama dizisi | AAA07 246 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|-------------------|--------------------------------|---|--------------|---------------|--|--------------|
| | | | | | 14'ten Ksilanaz. | | | çin PCR primeri. | |
| 505, 506 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 104 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 990 | 1.00E- 171 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 89 |
| 507, 508 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 106 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 996 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 89 |
| 509, 510 | Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] gi 118663312 gb EAV69968.1 Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] | 1.19E+ 08 | 2.00 E- 79 | Clostridium cellulolyticum H10 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 872 | 1.00E- 69 | İnsan kanseri ile ilişkili protein HP13-036.1. | ABD32 815 |
| 511, 512 | beta- 1,4- ksilanaz [Pseudomonas sp. ND137]. | 178269 47 | 1.00 E- 106 | Pseudomonas sp. ND137 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 152 | 1.00E- 148 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 89 |
| 513, 514 | endo- 1,4- beta-ksilanaz [Bacillus sp. YA- 335] | 133425 1 | 1.00 E- 147 | Bacillus sp. YA- 335 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 948 | 1.00E- 147 | Termostabil alkalin endo-1,4- beta- D-Ksilanaz . | AAQ92 878 |
| 515, 516 | alkalin aktif endoksilanaz öncüsü [Bacillus halodurans] | 565672 73 | 0 | Bacillus halodurans | Bakteriyel polipeptit #10001. | ADS28 252 | 0 | Termostabil alkalin endo-1,4- beta- D-Ksilanaz . | AAQ92 862 |
| 517, 518 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 132 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 046 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 45 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|--|--------------|-------------------|--------------------------------|--|--------------|---------------|---|--------------|
| 519, 520 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 132 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 046 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 95 |
| 521, 522 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 142 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 110 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 09 |
| 523, 524 | endo- beta- 1; 4-ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 757807 | 3.00 E- 59 | Cellvibrio mixtus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 998 | 4.00E- 60 | İnsan immün / hematopoietik antijen genomik sekansı SEQ ID NO: 41436. | AAK72 613 |
| 525, 526 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900232 52 | 0 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | AEH81 891 | 0 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | AEH81 884 |
| 527, 528 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 117 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 932 | 1.00E- 132 | Bakteriyel polipeptit #10001. | ADS63 654 |
| 529, 530 | ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | 1.19E+ 08 | 5.00 E- 80 | kültürlenmemiş bakteri | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 952 | 6.00E- 98 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 95 |
| 531, 532 | endo- beta- 1; 4-ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 757807 | 2.00 E- 59 | Cellvibrio mixtus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 976 | 2.00E- 58 | Oligonucleotide SEK ID NO: 62. | AAA05 701 |
| 533, 534 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900232 52 | 1.00 E- 170 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Microbulbifer parçalayıcılar | AEH81 891 | 1.00E- 171 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem | AEH81 884 |

| | | | | | | | | | |
|----------|---|-----------|------------|--------------------------------|---|-----------|-----------|--|-----------|
| | | | | | Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | | | proteini - SEQ ID 8. | |
| 535, 536 | endo- beta- 1;4-ksilanaz [Bacillus sp.] | 662884 | 1.00 E-133 | Bacillus sp. | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 918 | 1.00E-136 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 27 |
| 537, 538 | Endo- 1;4- beta-ksilanaz [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900222 78 | 1.00 E-125 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 932 | 1.00E-135 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 09 |
| 539, 540 | endo- 1;4- beta-ksilanaz [Thermobifida fusca YX] | 721616 17 | 5.00 E-96 | Thermobifida fusca YX | T. fusca ksilanaz. | AAR73 967 | 1.00E-96 | T. fusca ksilanaz. | AAQ90 388 |
| 541, 542 | ksilanaz X [Paenibacillus sp. BL11] | 824919 44 | 1.00 E-102 | Paenibacillus sp. BL11 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 948 | 1.00E-104 | Termostabil alkalın endo- 1,4- beta- D- Ksilanaz . | AAQ92 877 |
| 543, 544 | hücre içi ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | 315807 23 | 1.00 E-128 | kültürlenmemiş bakteri | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 846 | 1.00E-137 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 77 |
| 545, 546 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ÖNCÜSÜ (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A). | 172290 4 | 1.00 E-120 | Bacteroides ovatus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 118 | 1.00E-152 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 05 |
| 547, 548 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E-112 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 932 | 1.00E-123 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 31 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|-------------------|---|---|--------------|---------------|--|--------------|
| 549, 550 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Bacillus sp.] | 662884 | 1.00 E- 120 | Bacillus sp. | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 918 | 1.00E- 122 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 95 |
| 551, 552 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLA Z A) (XYLA). | 250638 5 | 1.00 E- 107 | Pseudomonas fluorescens | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 136 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 35 |
| 553, 554 | endo- 1;4- beta- ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 462536 18 | 1.00 E- 83 | kültürlenmemi ş bakteri | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 054 | 1.00E- 140 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 53 |
| 555, 556 | ksilanaz [Microbulbifer hydrolyticus] | 507271 08 | 1.00 E- 108 | Microbulbifer hydrolyticus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 152 | 1.00E- 150 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 89 |
| 557, 558 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 103 | Saccharophag us degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 996 | 1.00E- 169 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 95 |
| 559, 560 | endo- beta- 1;4- ksilanaz [Bacillus sp.] | 662884 | 1.00 E- 115 | Bacillus sp. | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 878 | 1.00E- 119 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 45 |
| 561, 562 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLA Z A) (XYLA). | 250638 5 | 1.00 E- 107 | Pseudomonas fluorescens | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 136 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 35 |
| 563, 564 | CHU büyük protein; aday b- glikosidaz; Glikozit hidrolaz aile 8 proteini | 1.11E+ 08 | 1.00 E- 53 | Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406 | Bakteriyel polipeptit #10001. | ADS21 231 | 2.00E- 53 | İnsan yumuşak doku sarkomu- | ADQ21 453 |

| | | | | | | | | | |
|----------|---|-----------|-------------|--------------------------------|--|-----------|------------|--|-----------|
| | [Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406] | | | | | | | yukarı regüle protein - SEQ ID 40. | |
| 565, 566 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900232 52 | 0 | Saccharophagus degradans 2- 40 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | AEH81 891 | 0 | Ksilanaz XYNB. | AAT072 00 |
| 567, 568 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 140 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 110 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 09 |
| 569, 570 | Olası ksilan parçalama enzimi (glikozil hidrolaz aile 30- benzeri etki alanı ve Risin B- benzeri etki alanı) [Clostridium acetobutylicum]. | 150048 22 | 6.00 E- 40 | Clostridium acetobutylicum | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 028 | 8.00E- 27 | Ciona intestinalis sinir sistemi ile ilişkili protein SeqID62. | ADQ08 627 |
| 571, 572 | Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 [gb ABJ83670.1] Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+ 08 | 1.00 E- 123 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 142 | 1.00E- 165 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 41 |
| 573, 574 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A) (XYLA). | 250638 5 | 1.00 E- 105 | Pseudomonas fluorescens | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 136 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 35 |
| 575, 576 | Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] | 1.19E+ 08 | 1.00 E- 135 | Clostridium cellulolyticum H10 | Çevresel numune SEQ ID | ADJ34 872 | 2.00E- 84 | Yeni insan salgılanan protein SEQ ID 151. | ADN41 761 |

| | | | | | | | | | |
|----------|--|----------|------------|-------------------------------|--|----------|-----------|---|----------|
| | gi 118663312 gb EAV69968.11 Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] | | | | 14'ten Ksilanaz. | | | | |
| 577, 578 | endo- 1;4- beta-ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 46255070 | 1.00 E-120 | kültürlenmemiş bakteri | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34942 | 1.00E-120 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34941 |
| 579, 580 | Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 gb ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+08 | 1.00 E-129 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35142 | 1.00E-167 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35141 |
| 581, 582 | endo- 1;4- beta-ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 46253618 | 4.00 E-78 | kültürlenmemiş bakteri | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35082 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34957 |
| 583, 584 | aile 10 glikozil hidrolaz XynB [Fibrobacter succinogenes S85]. | 11526752 | 5.00 E-79 | Fibrobacter succinogenes S85 | Microbulbifer parçalayıcılar Selülaz sistem proteini - SEQ ID 8. | AEH81883 | 6.00E-79 | İnsan yeni protein SEK ID NO 122. | ADB31515 |
| 585, 586 | beta- 1,4-sellobiosidaz [Pseudomonas sp. PE2]. | 25137524 | 3.00 E-84 | Pseudomonas sp. PE2 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35132 | 1.00E-89 | İnsan salgılanan protein geni 36 SEK ID NO: 46. | AAC99935 |
| 587, 588 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 57639627 | 1.00 E-111 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34932 | 1.00E-112 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34915 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|--|--------------|-------------------|---|---|--------------|------------------|---|--------------|
| 589, 590 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLA Z A). | 172290 4 | 1.00 E- 123 | Bacteroides ovatus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 118 | 1.00E- 158 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 43 |
| 591, 592 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 112 | Saccharophag us degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 046 | 1.00E- 172 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 89 |
| 593, 594 | endo- beta- 1;4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 757807 | 1.00 E- 57 | Cellvibrio mixtus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34 976 | 4.00E- 60 | Yeni fare geni sekansı # 5. | ADO35 732 |
| 595, 596 | endo- 1;4- beta- ksilanaz [Thermobifida fusca YX] | 721631 90 | 1.00 E- 102 | Thermobifida fusca YX | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35 080 | 1.00E- 103 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 79 |
| 597, 598 | Gram- pozitif cocci'den yüzey proteini, bağlantı bölgesi [Clostridium phytofermentans ISDg] gi 106768036 gb EAT 24745.1 Gram- pozitif cocci'den yüzey proteini, bağlantı bölgesi [Clostridium phytofermentans ISDg] | 1.07E+ 08 | 3.00 E- 61 | Clostridium phytofermentan s ISDg | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 68 | 2.00 E- 50 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 41 |
| 599, 600 | ksilanaz XynA GH 10 [Paenibacillus sp. JDR- 2] | 629900 90 | 0 | Paenibacillus sp. JDR- 2 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 58 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ348 57 |
| 601, 602 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+ 08 | 1.00 E- 84 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID | ADJ348 82 | 5.00 E- 91 | Çevresel numune SEQ ID | ADJ348 81 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|-------------------|---------------------------------------|---|--------------|-------------------|---|--------------|
| | gi 116224961 [gb]ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | 14'ten Ksilanaz. | | | 14'ten Ksilanaz. | |
| 603, 604 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 [gb]ABJ83670.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+ 08 | 1.00 E- 119 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 42 | 1.00 E- 152 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 61 |
| 605, 606 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 120 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 32 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 31 |
| 607, 608 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 900227 03 | 1.00 E- 134 | Saccharophagu s degradans 2- 40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 46 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 95 |
| 609, 610 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 144 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 10 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 09 |
| 611, 612 | hücre içi ksilanaz IXT6 [Geobacillus stearothermophilus] | 1.14E+ 08 | 1.00 E- 113 | Geobacillus stearothermoph ilus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ350 78 | 1.00 E- 114 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ351 39 |
| 613, 614 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 121 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 32 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 31 |
| 615, 616 | selloksilanaz CelW [Clostridium stercorarium]. | 233048 49 | 1.00 E- 116 | Clostridium stercorarium | Streptomy ces sp. Bgal geni | AAW931 48 | 1.00 E- 117 | Çevresel numune SEQ ID | ADJ347 95 |

| | | | | | RBS RNA fragmenti. | | | 14'ten Ksilanaz. | |
|----------|---|----------|------------|-------------------------------|---|----------|------------|---|----------|
| 617, 618 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A). | 1722904 | 1.00 E-127 | Bacteroides ovatus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35044 | 1.00 E-140 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34905 |
| 619, 620 | endo- 1; 4- beta-ksilanaz [Bacillus sp. YA- 335] | 1334251 | 4.00 E-56 | Bacillus sp. YA-335 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35102 | 2.00 E-86 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35101 |
| 621, 622 | Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 [gb ABJ83670.1] Endo- 1,4- beta-ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.17E+08 | 2.00 E-95 | Solibacter usitatus Ellin6076 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35056 | 1.00 E-173 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35055 |
| 623, 624 | endo- beta- 1;4-ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 757809 | 6.00 E-97 | Cellvibrio mixtus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35126 | 3.00 E-97 | Vibrio harveyi Endoglukanaz DNA. | AAT94196 |
| 625, 626 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 90022703 | 1.00 E-114 | Saccharophagus degradans 2-40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ35046 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34995 |
| 627, 628 | ksilanaz 5 [Aeromonas punctata]. | 27227837 | 0 | Aeromonas punctata | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34858 | 0 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34857 |
| 629, 630 | Endo- 1;4- beta-ksilanaz [Saccharophagus degradans 2- 40] | 90022278 | 1.00 E-126 | Saccharophagus degradans 2-40 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ34932 | 1.00 E-138 | Bakteriyel polipeptit #10001. | ADS63654 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|-------------------|--------------------------------------|---|--------------|-------------------|--|--------------|
| 631, 632 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 576396 27 | 1.00 E- 116 | kültürlenmemiş organizma | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 32 | 1.00 E- 130 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 31 |
| | Glikozit hidrolaz, aile 8 [Clostridium cellulolyticum H10] | 1.19E+ 08 | 2.00 E- 66 | Clostridium cellulolyticum H10 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ347 92 | 8.00 E- 66 | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ347 89 |
| 633, 634 | gi 118665052 gb EAV 71675.1 Glikozit hidrolaz, aile 8 [Clostridium cellulolyticum H10] | | | | | | | | |
| 635, 636 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 757807 | 1.00 E- 58 | Cellvibrio mixtus | Çevresel numune SEQ ID 14'ten Ksilanaz. | ADJ349 60 | 4.00 E- 60 | HWAAQ40 'in EGF benzeri etki alanı # 7, insanın atraktin benzeri bir proteinini klonu. | AAD028 09 |

| SEK ID NO: | NR Açıklama | Genese q DNA Erişim Kodu | Genes eq DNA E değeri | Öngörül en EC Numara sı | Sorgu DNA Uzunlu ğu | Sorgu Protein Uzunlu ğu | Genese q/NR DNA Uzunluğ u | Geneseq /NR Protein Uzunluğu | Geneseq /NR % ID Protein | Genes eq/ NR% ID DNA |
|---------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 385, 386 | aile F ksilanaz [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]. | AAF883 15 | 0.27 | 3.2.1.4 | 1122 | 373 | 1155 | 384 | 52 | 62 |
| 387, 388 | ksilanaz T- 6 [Geobacillus stearothermophilus] | AAQ92 862 | 2.00E- 05 | 3.2.1.8 | 1221 | 406 | 0 | 407 | 75 | 64 |
| 389, 390 | Endoglukanaz [Erwinia rhapontici]. | AAN70 617 | 2.00E- 05 | 3.2.1.4 | 1008 | 335 | 1002 | 333 | 66 | 66 |
| 391, 392 | olası Endoglukanaz öncüsü [Salmonella enterica subsp. enterica serovar | AAS90 145 | 1.00E- 21 | 3.2.1.4 | 1116 | 371 | 0 | 369 | 77 | 75 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|--|--------------|--------------|--------------|------|-----|------|------|----|----|
| | Paratypi A str. ATCC 9150] | | | | | | | | | |
| 393, 394 | adlandırılmamış protein ürünü [Bacillus circulans] | ABZ348 64 | 0.11 | | 1677 | 558 | 0 | 409 | 31 | 39 |
| 395, 396 | Endoglukanaz- N257 [Bacillus circulans]. | AAK99 798 | 0 | | 1224 | 407 | 1224 | 407 | 97 | 94 |
| 397, 398 | endo- 1,4- beta- ksilanaz A [Thermotoga maritima]. | AAT081 43 | 1.00E- 08 | 3.2.1.8 | 741 | 246 | 3180 | 1059 | 56 | 64 |
| 399, 400 | alfa- L - arabinofuranosidaz ArfA [Clostridium cellulovorans]. | ABQ58 362 | 0.65 | 3.2.1.5 5 | 2637 | 878 | 1479 | 492 | 32 | 30 |
| 401, 402 | ksilanaz T- 6 [Geobacillus stearothermophilus] | AAQ92 862 | 2.00E- 11 | 3.2.1.8 | 1242 | 413 | 0 | 407 | 71 | 68 |
| 403, 404 | ksilanaz öncüsü [Bacteroides ovatus] | AAT635 66 | 5.00E- 09 | 3.2.1.8 | 1158 | 385 | 0 | 376 | 45 | 53 |
| 405, 406 | beta- 1,4- ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | AAT635 61 | 2.00E- 08 | 3.2.1.8 | 1065 | 354 | 0 | 360 | 39 | 48 |
| 407, 408 | glikozil hidrolaz, aile 10 [Caulobacter crescentus]. | AAC49 543 | 1.1 | 3.2.1.8 | 1173 | 390 | 1131 | 376 | 50 | 59 |
| 409, 410 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ I ONCUSU (KSİLANAZ I) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLA Z I). | AAQ42 685 | 1.00E- 32 | 3.2.1.8 | 630 | 209 | 2059 | 211 | 77 | 76 |
| 411, 412 | endoksilanaz II; pl 9 [Hypocrea jecorina] | AAV81 332 | ##### ## | 3.2.1.8 | 666 | 221 | 1015 | 223 | 92 | 86 |
| 413, 414 | COG3405: Endoglukanaz Y [Clostridium | AAV07 164 | 0.14 | 3.2.1.8 | 2244 | 747 | 0 | 477 | 20 | 31 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|---|-----------|----------|---------|------|-----|------|-----|-----|-----|
| | thermocellum ATCC 27405] | | | | | | | | | |
| 415, 416 | olası Endoglukanaz öncüsü [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150] | AAS88 676 | 2.00E-26 | 3.2.1.4 | 1107 | 368 | 0 | 369 | 74 | 73 |
| 417, 418 | Endoglukanaz öncüsü [Escherichia coli CFT073] gi 26110594 gb AA N82779.1 Endoglukanaz öncüsü [Escherichia coli CFT073] | AAS88 676 | 0 | 3.2.1.4 | 1107 | 368 | 0 | 370 | 100 | 100 |
| 419, 420 | 11406961 Endoglukanaz - Cellulomonas uda | AAN70 617 | 2.00E-17 | 3.2.1.4 | 990 | 329 | 1828 | 359 | 61 | 68 |
| 421, 422 | ksilanaz III [Hypocrea jecorina]. | ABZ518 18 | 0.97 | 3.2.1.8 | 1044 | 347 | 1044 | 347 | 82 | 75 |
| 423, 424 | COG3405: Endoglukanaz Y [Ralstonia eutropha JMP134] | AAV58 939 | 0.32 | 3.2.1.4 | 1335 | 444 | 0 | 392 | 58 | 62 |
| 425, 426 | varsayılan beta- 1; 4- ksilanaz [Streptomyces avermitilis MA-4680] | AAI613 73 | 0.29 | 3.2.1.8 | 1221 | 406 | 0 | 451 | 29 | 43 |
| 427, 428 | 1 N82 B İxt6'nın Yüksek Çözünürlüklü Kristal Yapısı; A Termofilik; G. Stearothermophilus' dan Hücre İçi Ksilanaz | AAQ92 862 | 0.001 | 3.2.1.8 | 996 | 331 | 0 | 331 | 99 | 54 |
| 429, 430 | varsayılan Endoglukanaz [Escherichia coli O157:H7 EDL933]. | AAS88 676 | 0 | 3.2.1.4 | 1107 | 368 | 1107 | 368 | 99 | 98 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|--------------|---------|------|-----|-------|-----|----|----|
| 431, 432 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ ONCUSU (KSİLANAZ) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLA Z) (FIA- KSİLANAZ). | AAQ74 636 | 0 | 3.2.1.8 | 984 | 327 | 0 | 327 | 98 | |
| 433, 434 | ksilanaz I [Streptomyces thermoviolaceus] | AAA12 986 | 5.00E- 18 | 3.2.1.8 | 1134 | 377 | 0 | 476 | 59 | |
| 435, 436 | aile F ksilanaz [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]. | AAI720 46 | 2.00E- 88 | 3.2.1.8 | 1116 | 371 | 3028 | 384 | 74 | |
| 437, 438 | [I40696] Endoglukanaz - Cellulomonas uda | ABK13 050 | 3.00E- 07 | 3.2.1.4 | 993 | 330 | 11772 | 359 | 59 | |
| 439, 440 | hücre içi ksilanaz [Bacillus stearothermophilus] | AAF619 48 | 0.97 | 3.2.1.8 | 1041 | 346 | 996 | 331 | 61 | 60 |
| 441, 442 | ORF_ID:lr1902~ olası endo- 1,4- beta- ksilanaz [Therm osynechococcus elongatus BP- 1]. | ABL295 15 | 0.29 | 3.2.1.8 | 1239 | 412 | 1158 | 385 | 26 | 44 |
| 443, 444 | COG3693: Beta- 1; 4- ksilanaz [Microbulbifer degradans 2- 40] | AAT941 96 | 0 | 3.2.1.8 | 912 | 303 | 849 | 282 | 92 | |
| 445, 446 | hücre içi ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | ABQ94 225 | 4.4 | 3.2.1.8 | 1191 | 396 | 0 | 336 | 38 | |
| 447, 448 | varsayılan Endoglukanaz [Escherichia coli O157:H7 EDL933]. | AAS90 145 | 2.00E- 17 | 3.2.1.4 | 1107 | 368 | 1107 | 368 | 71 | 70 |
| 449, 450 | endo- 1,4- D- glukanaz | AAS90 145 | 3.00E- 19 | 3.2.1.4 | 1107 | 368 | 1110 | 369 | 73 | 72 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|--|--------------|--------------|---------|------|-----|------|------|-----|-----|
| | [Salmonella typhimurium LT2]. | | | | | | | | | |
| 451, 452 | [139760] endo- 1; 4- beta- ksilanaz (EC 3.2.1.8) - Bacillus stearothermophilus | ABK82 442 | 0.61 | 3.2.1.8 | 681 | 226 | 0 | 330 | 76 | |
| 453, 454 | varsayımsal protein FG06445.1 [Gibberella zeae PH- 1] | AAT740 74 | 7.00E- 14 | 3.2.1.8 | 1002 | 333 | 0 | 367 | 56 | |
| 455, 456 | COG3693: Beta- 1; 4- ksilanaz [Clostridium thermocellum ATCC 27405] | AAZ518 17 | 0 | 3.2.1.8 | 2823 | 940 | 0 | 1077 | 99 | |
| 457, 458 | olası Endoglukanaz öncüsü [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150] | AAS94 208 | 1.00E- 21 | 3.2.1.4 | 984 | 327 | 0 | 369 | 74 | |
| 459, 460 | endoksilanaz [Alternaria alternata]. | AAQ74 636 | 1.00E- 07 | 3.2.1.8 | 1524 | 507 | 1281 | 426 | 55 | 56 |
| 461, 462 | endo- 1,4- beta- D- glukanaz öncüsü [Pectobacterium chrysanthemi]. | AAN70 617 | 2.00E- 20 | 3.2.1.4 | 990 | 329 | 999 | 332 | 58 | 64 |
| 463, 464 | [1 N82]B İxt6'nın Yüksek Çözünürlüklü Kristal Yapısı; A Termofilik; G. Stearothermophilus' dan Hücre İçi Ksilanaz | AAT635 71 | 0.004 | 3.2.1.8 | 1023 | 340 | 0 | 331 | 62 | |
| 465, 466 | ksilanaz [Thermotoga neapolitana] | AAT625 89 | 2.00E- 68 | 3.2.1.8 | 2142 | 713 | 0 | 1055 | 75 | |
| 467, 468 | Endoglukanaz fragmenti [Aquifex aeolicus]. | ABL343 26 | 0.9 | 3.2.1.4 | 978 | 325 | 978 | 325 | 100 | 100 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|--------------|---------|------|-----|------|-----|----|----|
| 469, 470 | COG3693: Beta- 1; 4- ksilanaz [Clostridium thermocellum ATCC 27405] | AAZ542 96 | 1.9 | 3.2.1.8 | 1929 | 642 | 0 | 639 | 35 | |
| 471, 472 | ksilanaz öncüsü [Bacteroides ovatus] | AAT635 66 | 0.001 | 3.2.1.8 | 1119 | 372 | 0 | 376 | 40 | |
| 473, 474 | hücre içi ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | ABL181 93 | 0.061 | 3.2.1.8 | 1020 | 339 | 0 | 336 | 36 | |
| 475, 476 | endo- 1,4- beta- ksilanaz [Thermobacillus xylanilyticus]. | AAA12 989 | 0.005 | 3.2.1.8 | 1248 | 415 | 1104 | 367 | 35 | 50 |
| 477, 478 | kitosanaz- glukanaz [Bacillus sp. D- 2]. | AAF080 31 | 0.54 | | 2199 | 732 | 2394 | 797 | 38 | 54 |
| 479, 480 | ksilanaz [Aspergillus niger] | AAV19 126 | 1.00E- 14 | 3.2.1.8 | 636 | 211 | 558 | 211 | 72 | |

| SEK ID NO: | NR Açıklaması | Genes eq DNA E değeri | Sorgu DNA'sı Uzunlu ğu | Sorgu Protein Uzunlu ğu | Geneseq/ NR DNA Uzunluğu | Geneseq/ NR Protein Uzunluğu | Geneseq/ NR % ID Protein | Geneseq/ NR % ID DNA |
|------------------|---|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 483, 484 | aile 10 ksilanaz [Caldicellulosiruptor sp. Rt69B.1] | 0 | 2532 | 843 | 0 | 1595 | 79 | |
| 485, 486 | Ksilanaz, glikozil hidrolaz aile 10 [Clostridium acetobutylicum]. | 3.4 | 1242 | 413 | 3433 | 430 | | |
| | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | |
| 487, 488 | gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 2.00E- 07 | 1152 | 383 | 1218 | 384 | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|------|-----|------|------|----|--|
| | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | |
| 489, 490 | gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 2.00E- 16 | 1170 | 389 | 1407 | 384 | | |
| 491, 492 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 7.00E- 05 | 1530 | 509 | 0 | 1186 | 67 | |
| 493, 494 | Glikozit hidrolaz, aile 10:Klostridyum selülozon enzimi, dokerin tipi I:Karbonhidrat bağlama, CenC- benzeri [Clostridium thermocellum ATCC 27405] | 0.022 | 1959 | 652 | 0 | 639 | 22 | |
| | gi 67851540 gb EAM4710 4.1 Glikozit hidrolaz, aile 10:Klostridyum selülozon enzimi, dokerin tipi I: | | | | | | | |
| 495, 496 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.00E- 11 | 1125 | 374 | 1407 | 389 | | |
| | gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | |
| 497, 498 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 1.00E- 11 | 1008 | 335 | 852 | 279 | | |
| 499, 500 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 0 | 1155 | 384 | 1155 | 384 | | |
| | gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|-----------|------|-----|------|-----|----|--|
| | ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | |
| 501, 502 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz Xynl [Cellulomonas flavigena] | 1.00E-66 | 744 | 247 | 1086 | 361 | | |
| 503, 504 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 8.00E-14 | 1545 | 514 | 847 | 350 | | |
| 505, 506 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 2.00E-62 | 1059 | 352 | 1068 | 355 | | |
| 507, 508 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 1.00E-131 | 1062 | 353 | 1068 | 361 | | |
| | Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] | | | | | | | |
| 509, 510 | gi 118663312 gb EAV699 68.1 Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] | 0.11 | 2325 | 774 | 0 | 541 | | |
| 511, 512 | beta- 1,4- ksilanaz [Pseudomonas sp. ND137]. | 1.00E-42 | 1107 | 368 | 1068 | 445 | | |
| 513, 514 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz [Bacillus sp. YA- 335] | 1.00E-08 | 1089 | 362 | 0 | 354 | 68 | |
| 515, 516 | alkalin aktif endoksilanaz öncüsü [Bacillus halodurans] | 3.00E-31 | 1188 | 395 | 0 | 396 | 77 | |
| 517, 518 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 6.00E-49 | 1728 | 575 | 1629 | 542 | | |
| 519, 520 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 6.00E-64 | 1473 | 490 | 1086 | 542 | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|----------|------|------|------|------|----|--|
| 521, 522 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 2.00E-26 | 1155 | 384 | 1146 | 381 | | |
| 523, 524 | endo- beta- 1;4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 7.00E-05 | 1533 | 510 | 8298 | 303 | | |
| 525, 526 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 4.00E-11 | 3048 | 1015 | 0 | 1186 | 65 | |
| 527, 528 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 6.00E-11 | 1140 | 379 | 1116 | 381 | | |
| 529, 530 | ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | 4.00E-29 | 696 | 231 | 1086 | 222 | | |
| 531, 532 | endo- beta- 1;4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 0.069 | 1551 | 516 | 0 | 656 | 32 | |
| 533, 534 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 1.00E-06 | 1359 | 452 | 1725 | 1186 | | |
| 535, 536 | endo- beta- 1;4- ksilanaz [Bacillus sp.] | 2.00E-10 | 1002 | 333 | 1011 | 336 | | |
| 537, 538 | Endo- 1;4- beta- ksilanaz [Saccharophagus degradans 2- 40] | 2.00E-04 | 1137 | 378 | 1146 | 381 | | |
| 539, 540 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz [Thermobifida fusca YX] | 1.00E-08 | 1092 | 363 | 1273 | 338 | | |
| 541, 542 | ksilanaz X [Paenibacillus sp. BL11] | 4.00E-24 | 1155 | 384 | 164 | 355 | | |
| 543, 544 | hücre içi ksilanaz [kültürlenmemiş bakteri] | 2.00E-04 | 1014 | 337 | 1011 | 346 | | |
| 545, 546 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ÖNCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A). | 6.00E-11 | 1143 | 380 | 1905 | 383 | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|----------|------|-----|------|------|----|--|
| 547, 548 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 0.003 | 1149 | 382 | 1146 | 381 | | |
| 549, 550 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Bacillus sp.] | 2.00E-04 | 981 | 326 | 3972 | 336 | | |
| 551, 552 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A) (XYLA). | 7.00E-11 | 1470 | 489 | 1860 | 619 | | |
| 553, 554 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 4.00E-67 | 1116 | 371 | 1110 | 369 | | |
| 555, 556 | ksilanaz [Microbulbifer hydrolyticus] | 1.00E-42 | 1071 | 356 | 1068 | 445 | | |
| 557, 558 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 7.00E-17 | 1371 | 456 | 1086 | 361 | | |
| 559, 560 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Bacillus sp.] | 3.00E-06 | 996 | 331 | 1041 | 336 | | |
| 561, 562 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A) (XYLA). | 3.00E-26 | 1809 | 602 | 1860 | 619 | | |
| 563, 564 | CHU büyük protein; aday b- glikosidaz; Glikozit hidrolaz aile 8 protein [Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406] | 0.37 | 2067 | 688 | 0 | 1152 | 29 | |
| 565, 566 | Metiyonin biyosentezi MetW [Saccharophagus degradans 2- 40] | 2.00E-08 | 1515 | 504 | 0 | 1186 | 68 | |
| 567, 568 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 1.00E-42 | 1158 | 385 | 1146 | 381 | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|----------|------|-----|------|-----|----|----|
| 569, 570 | Olası ksilan parçalama enzimi (glikozil hidrolaz aile 30- benzeri etki alanı ve Risin B- benzeri etki alanı) [Clostridium acetobutylicum]. | 0.73 | 1062 | 353 | 1761 | 586 | 33 | 46 |
| 571, 572 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 gb ABJ8367.0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 3.00E-25 | 1149 | 382 | 1155 | 384 | | |
| 573, 574 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ONCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A) (XYLA). | 2.00E-11 | 1326 | 441 | 1860 | 619 | | |
| 575, 576 | Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] gi 118663312 gb EAV699.68.1 Karbonhidrat bağlama ailesi 6 [Clostridium cellulolyticum H10] | 0.01 | 876 | 291 | 0 | 541 | | |
| 577, 578 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 0 | 642 | 213 | 0 | 214 | 97 | |
| | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 1.00E-11 | 1158 | 385 | 1155 | 384 | | |
| 579, 580 | gi 116224961 gb ABJ8367.0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|----------|------|------|------|------|----|----|
| 581, 582 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz öncüsü [kültürlenmemiş bakteri] | 3.00E-04 | 1596 | 531 | 1503 | 613 | | |
| 583, 584 | aile 10 glikozil hidrolaz XynB [Fibrobacter succinogenes S85]. | 2.00E-04 | 1362 | 453 | 1761 | 586 | 38 | 51 |
| 585, 586 | beta- 1,4- sellobiosidaz [Pseudomonas sp. PE2]. | 3.2 | 1188 | 395 | 798 | 597 | | |
| 587, 588 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 0.003 | 1095 | 364 | 1218 | 381 | | |
| 589, 590 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ÖNCÜSÜ (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A). | 1.00E-05 | 1149 | 382 | 1143 | 383 | | |
| 591, | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri | 5.00E-16 | 2094 | 697 | 1068 | 542 | | |
| 592 | [Saccharophagus degradans 2- 40] | | | | | | | |
| 593, 594 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 3.00E-06 | 1137 | 378 | 2557 | 350 | | |
| 595, 596 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz [Thermobifida fusca YX] | 3.00E-21 | 978 | 325 | 1134 | 377 | | |
| 597, 598 | Gram- pozitif cocci'den yüzey proteini, bağlantı bölgesi [Clostridium phytofermentans ISDg] gi 106768036 gb EAT247 45.1 Gram- pozitif cocci'den yüzey proteini, bağlantı bölgesi [Clostridium phytofermentans ISDg] | 0.021 | 1842 | 613 | 0 | 806 | 29 | |
| 599, 600 | ksilanaz XynA GH 10 [Paenibacillus sp. JDR- 2] | 1.00E-08 | 3801 | 1266 | 0 | 1467 | 58 | |

| | | | | | | | | |
|-------------|---|--------------|------|-----|------|-----|--|--|
| 601, 602 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 3.00E- 10 | 1536 | 511 | 1407 | 468 | | |
| 603, 604 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 0.003 | 1167 | 388 | 1128 | 384 | | |
| 605, 606 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 0 | 1146 | 381 | 1146 | 381 | | |
| 607, 608 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 9.00E- 60 | 1515 | 504 | 1086 | 542 | | |
| 609, 610 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 0 | 1146 | 381 | 1146 | 381 | | |
| 611, 612 | hücre içi ksilanaz IXT6 [Geobacillus stearothermophilus] | 7.00E- 07 | 993 | 330 | 1125 | 333 | | |
| 613, 614 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 0 | 1146 | 381 | 1146 | 381 | | |
| 615, 616 | selloksilanaz CelW [Clostridium stercorarium]. | 0.33 | 1875 | 624 | 1224 | 388 | | |
| 617, 618 | ENDO- 1,4- BETA- KSİLANAZ A ÖNCUSU (KSİLANAZ A) (1,4- BETA- D- KSİLAN KSİLANOHİDROLAZ A). | 4.00E- 12 | 1152 | 383 | 1905 | 380 | | |
| 619, 620 | endo- 1; 4- beta- ksilanaz [Bacillus sp. YA- 335] | 1.00E- 16 | 582 | 193 | 1695 | 564 | | |

| | | | | | | | | |
|-------------|--|--------------|------|------|------|------|----|----|
| 621, 622 | Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | 4.00E- 67 | 1134 | 377 | 1128 | 375 | | |
| | gi 116224961 gb ABJ8367 0.1 Endo- 1,4- beta- ksilanaz [Solibacter usitatus Ellin6076] | | | | | | | |
| 623, 624 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 0.054 | 1215 | 404 | 849 | 448 | | |
| 625, 626 | ksilanaz/kitin deasetilaz benzeri [Saccharophagus degradans 2- 40] | 9.00E- 11 | 1812 | 603 | 1086 | 542 | | |
| 627, 628 | ksilanaz 5 [Aeromonas punctata]. | 4.00E- 05 | 3354 | 1117 | 3981 | 1326 | 32 | 44 |
| 629, 630 | Endo- 1; 4- beta- ksilanaz [Saccharophagus degradans 2- 40] | 2.00E- 04 | 1143 | 380 | 1116 | 381 | | |
| 631, 632 | ksilanaz [kültürlenmemiş organizma] | 1.00E- 08 | 1143 | 380 | 1146 | 381 | | |
| 633, 634 | Glikozit hidrolaz, aile 8 [Clostridium cellulolyticum H10] | 7.00E- 11 | 1398 | 465 | 0 | 477 | | |
| | gi 118665052 gb EAV716 75.1 Glikozit hidrolaz, aile 8 [Clostridium cellulolyticum H10] | | | | | | | |
| 635, 636 | endo- beta- 1; 4- ksilanaz [Cellvibrio mixtus] | 0.009 | 834 | 277 | 2109 | 350 | | |

<211> UZUNLUK: 375

<212> TİP: PRT

<213> ORGANİZMA: Bakteri

<400> SEKANS: 2

| 5 | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 |
| | Gly | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro |
| | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 |
| | Ser | Arg | Ala | Met | Met | His | Ala | Met | Val | Leu | Arg | Met | Leu | Met | Gln | Gly |
| | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 |
| | Met | Gly | Leu | Arg | Gly | Met | Met | Val | Met | Met | Met | Met | Met | Met | Met | Met |
| | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 | 466 | 467 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 468 | 469 | 470 | 471 | 472 | 473 | 474 | 475 | 476 | 477 | 478 | 479 | 480 | 481 | 482 | 483 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 484 | 485 | 486 | 487 | 488 | 489 | 490 | 491 | 492 | 493 | 494 | 495 | 496 | 497 | 498 | 499 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 500 | 501 | 502 | 503 | 504 | 505 | 506 | 507 | 508 | 509 | 510 | 511 | 512 | 513 | 514 | 515 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 516 | 517 | 518 | 519 | 520 | 521 | 522 | 523 | 524 | 525 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 532 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 538 | 539 | 540 | 541 | 542 | 543 | 544 | 545 | 546 | 547 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 548 | 549 | 550 | 551 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 564 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 570 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 594 | 595 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 596 | 597 | 598 | 599 | 600 | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 607 | 608 | 609 | 610 | 611 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 612 | 613 | 614 | 615 | 616 | 617 | 618 | 619 | 620 | 621 | 622 | 623 | 624 | 625 | 626 | 627 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 628 | 629 | 630 | 631 | 632 | 633 | 634 | 635 | 636 | 637 | 638 | 639 | 640 | 641 | 642 | 643 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 644 | 645 | 646 | 647 | 648 | 649 | 650 | 651 | 652 | 653 | 654 | 655 | 656 | 657 | 658 | 659 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 660 | 661 | 662 | 663 | 664 | 665 | 666 | 667 | 668 | 669 | 670 | 671 | 672 | 673 | 674 | 675 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 676 | 677 | 678 | 679 | 680 | 681 | 682 | 683 | 684 | 685 | 686 | 687 | 688 | 689 | 690 | 691 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 692 | 693 | 694 | 695 | 696 | 697 | 698 | 699 | 700 | 701 | 702 | 703 | 704 | 705 | 706 | 707 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 708 | 709 | 710 | 711 | 712 | 713 | 714 | 715 | 716 | 717 | 718 | 719 | 720 | 721 | 722 | 723 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 724 | 725 | 726 | 727 | 728 | 729 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 736 | 737 | 738 | 739 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 740 | 741 | 742 | 743 | 744 | 745 | 746 | 747 | 748 | 749 | 750 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 756 | 757 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 | 763 | 764 | 765 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 777 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 785 | 786 | 787 |
| | Met | Met | Arg | His | Asp | Ala | Ser | Glu | Val | Ser | Leu | Phe | Ala | Gln | Pro | Gly |
| | 788 | | | | | | | | | | | | | | | |

50
137

Lütfen dikkat edin:

Sekans Listesinde n ve/veya Xaa kullanımı saptanmıştır. En az bir n ya da Xaa verilen her sekansın <220> ile <223> alanlarında uygun bir açıklama verilmesini sağlamak için lütfen Sekans Listesini gözden geçirin.

Sek#:593; N Pos. 801,802,803

Sek#:594; Xaa Pos. 268

Geçersiz satır uzunluğu:

Kurallar bir satırın uzunluk olarak 72 karakteri geçmemesini gerektirir. Bu uzunluk boşlukları da kapsamaktadır.

Sek#:410; Satır(lar) 22715

Sek#:412; Satır(lar) 22833,22838

Sek#:456; Satır(lar) 26594,26604

Sek#:474; Satır(lar) 28520

Sek#:480; Satır(lar) 29175

Sek#:502; Satır(lar) 31257,31267

Sek#:504; Satır(lar) 31465

Sek#:506; Satır(lar) 31705

Sek#:508; Satır(lar) 31876,31886

Sek#:512; Satır(lar) 32420,32430

Sek#:514; Satır(lar) 32632

Sek#:518; Satır(lar) 33011,33016

Sek#:520; Satır(lar) 33287

Sek#:530; Satır(lar) 34568,34573

Sek#:540; Satır(lar) 35491,35496

Sek#:542; Satır(lar) 35690

Sek#:556; Satır(lar) 36911,36921

Sek#:558; Satır(lar) 37131,37141

Sek#:578; Satır(lar) 39141,39151

Sek#:608; Satır(lar) 42499

5 L:13 M:270 C: Mevcut Başvuru Numarası farklılık göstermektedir, Değiştirilmiş Mevcut Başvuru Numarası

L:14 M:271 C: Mevcut Dosyalama Tarihi farklılık göstermektedir, Değiştirilmiş Mevcut Dosyalama Tarihi

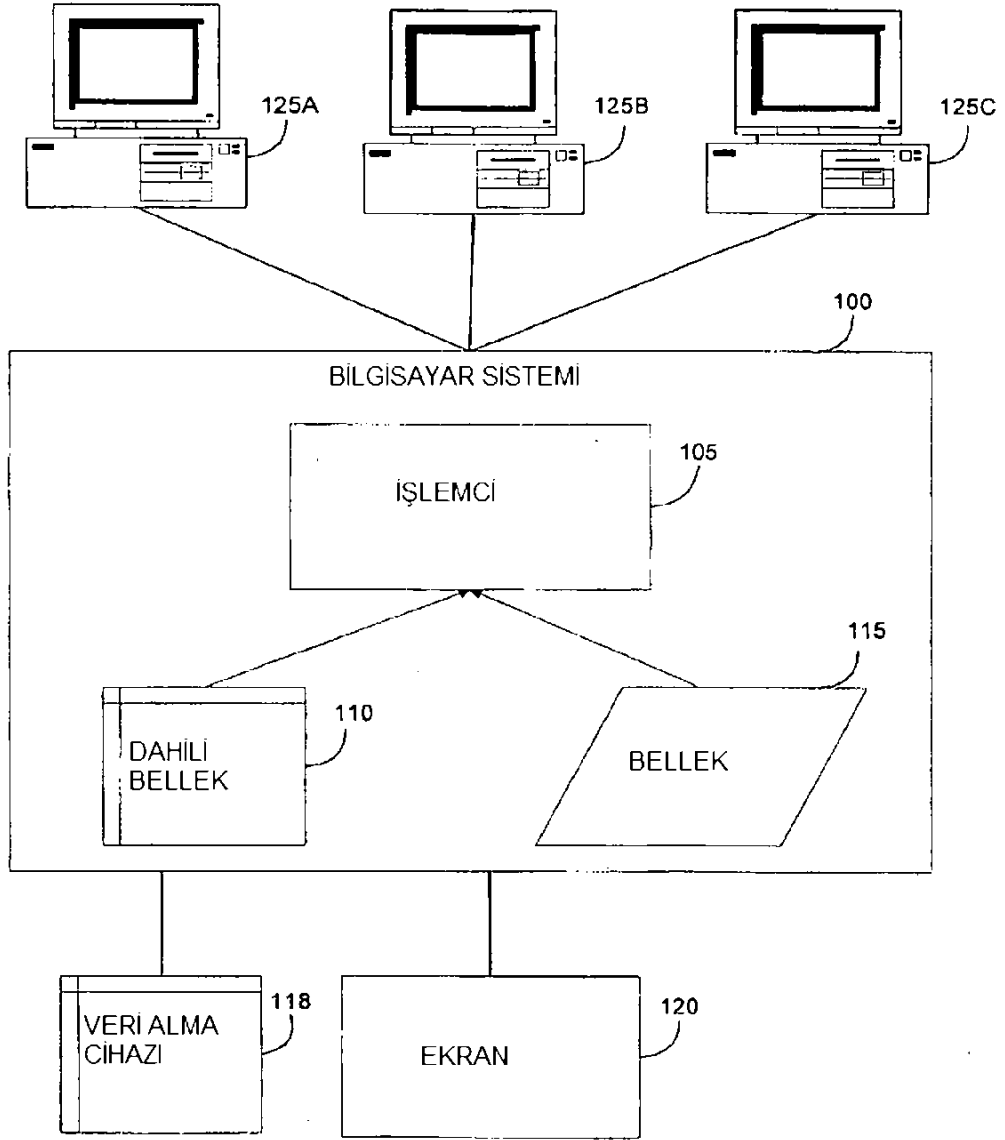
L:40716 M:341 W: (46) "n" ya da "Xaa" kullanılmış, pos.:780'den sonra SEK ID#:593 için

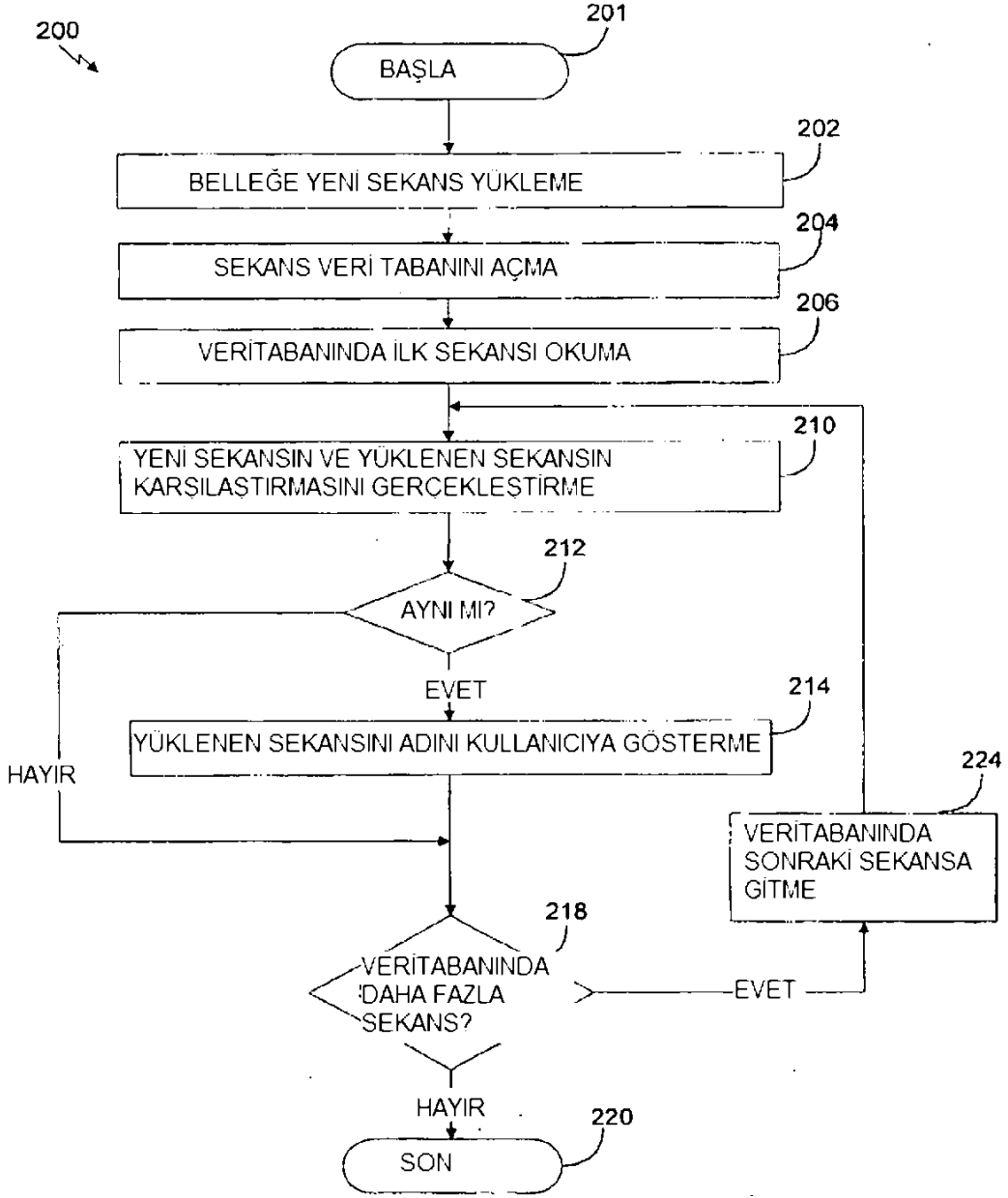
10 L:40830 M:341 W: (46) "n" ya da "Xaa" kullanılmış, pos.:256'dan sonra SEK ID#:594 için

15

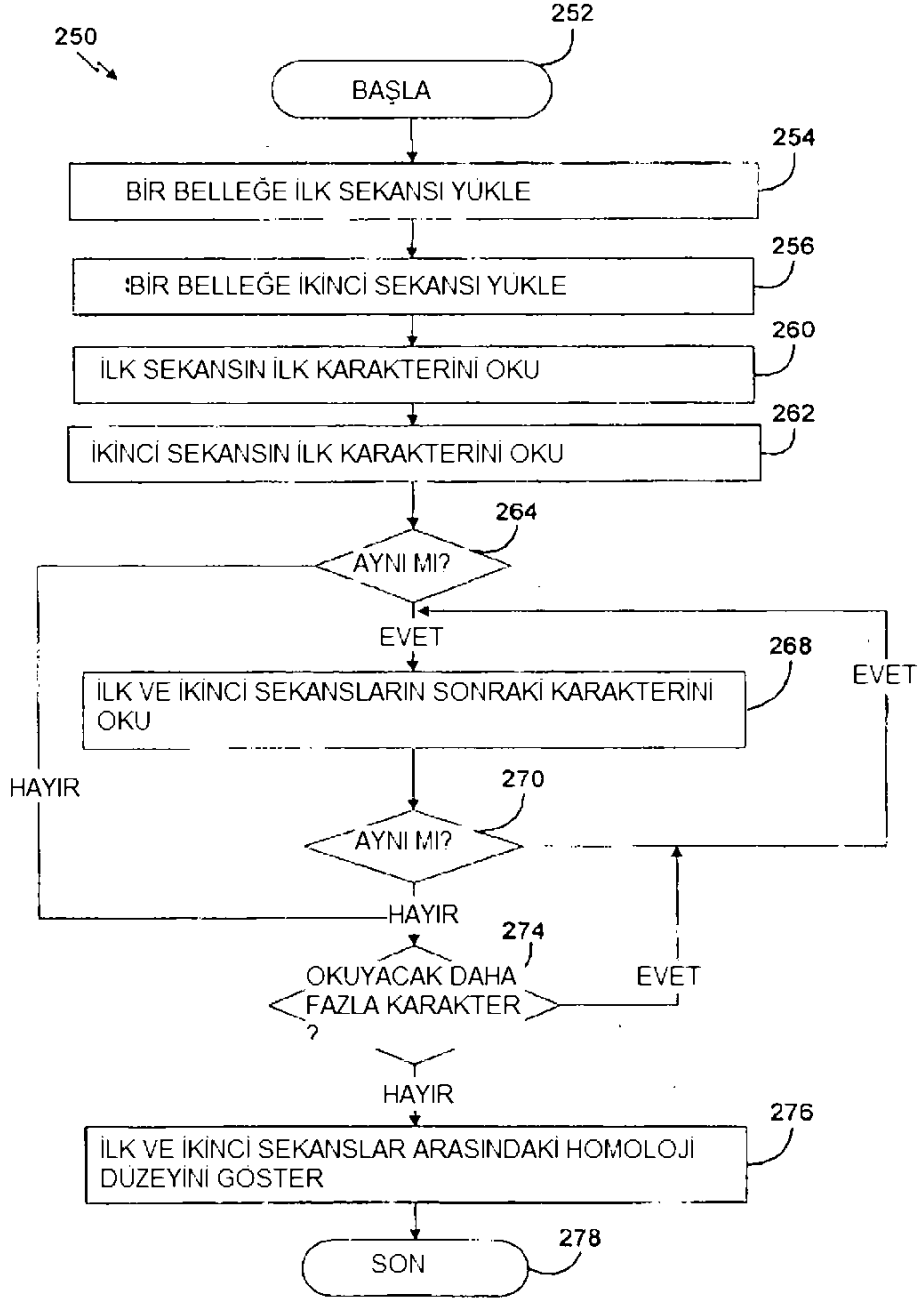
20

25

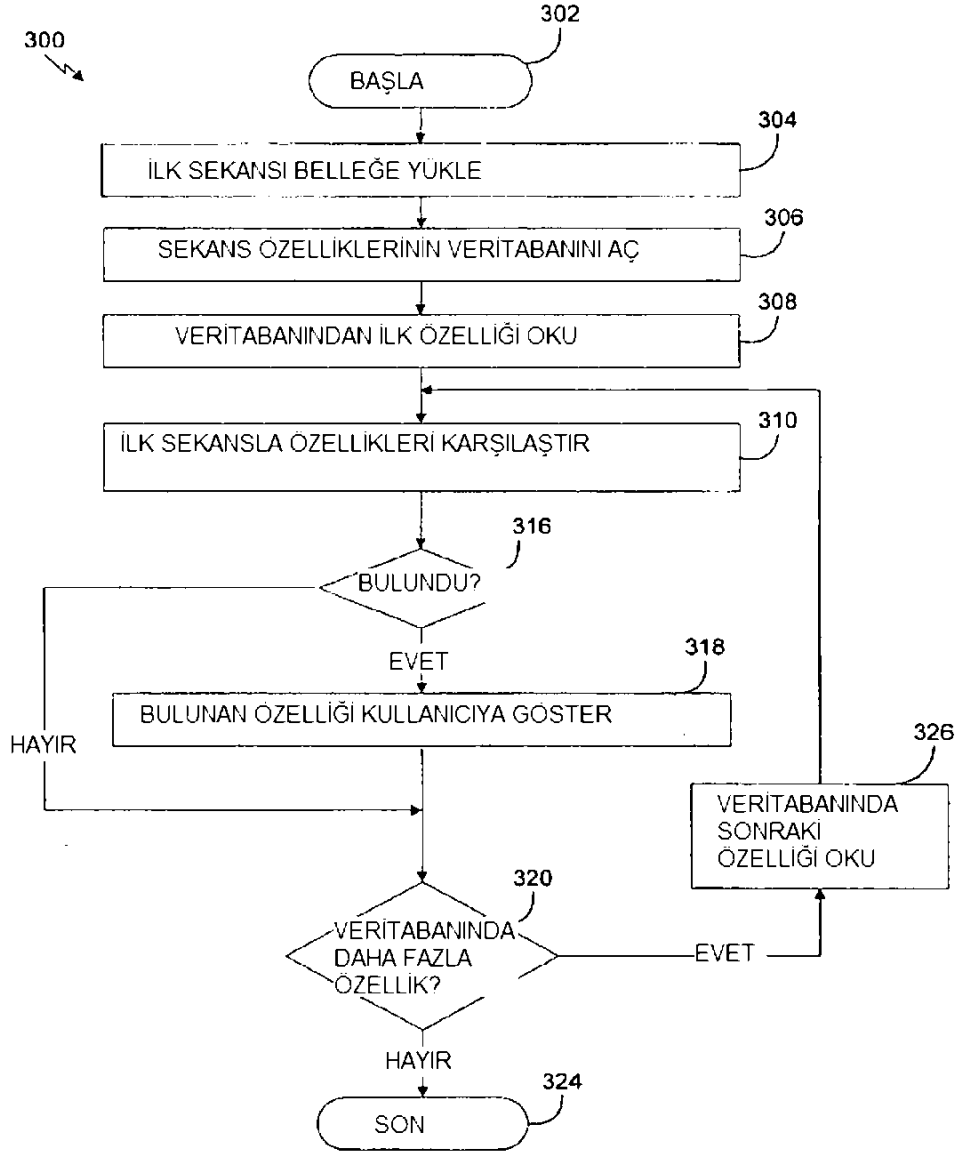
**ŞEKİL 1**



ŞEKİL 2

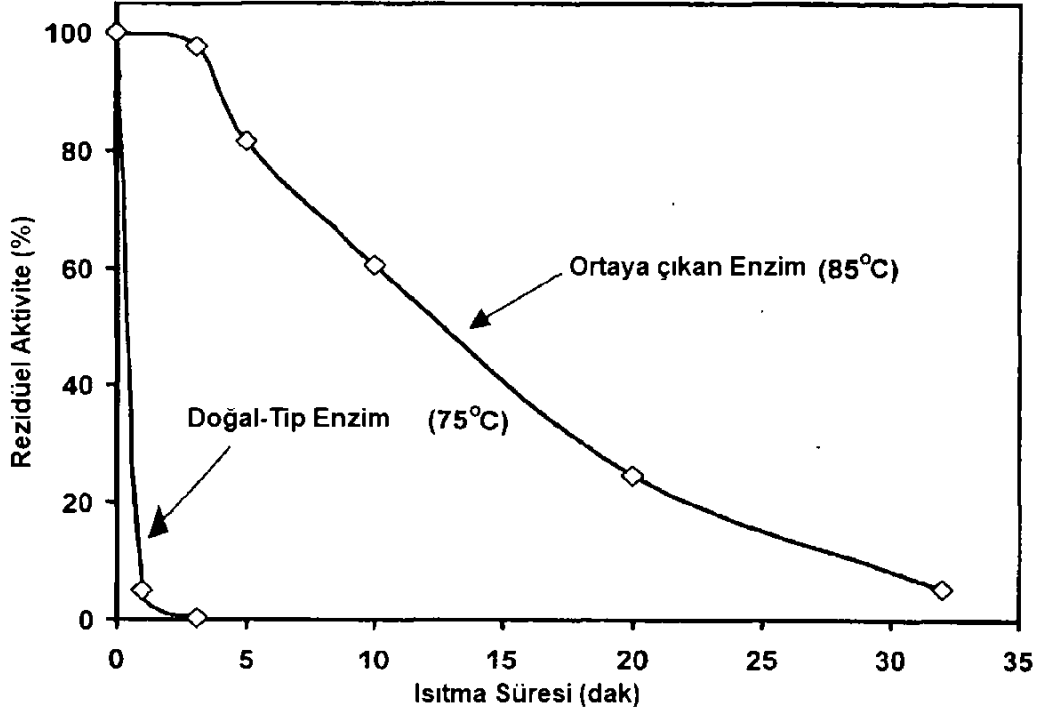


ŞEKİL 3

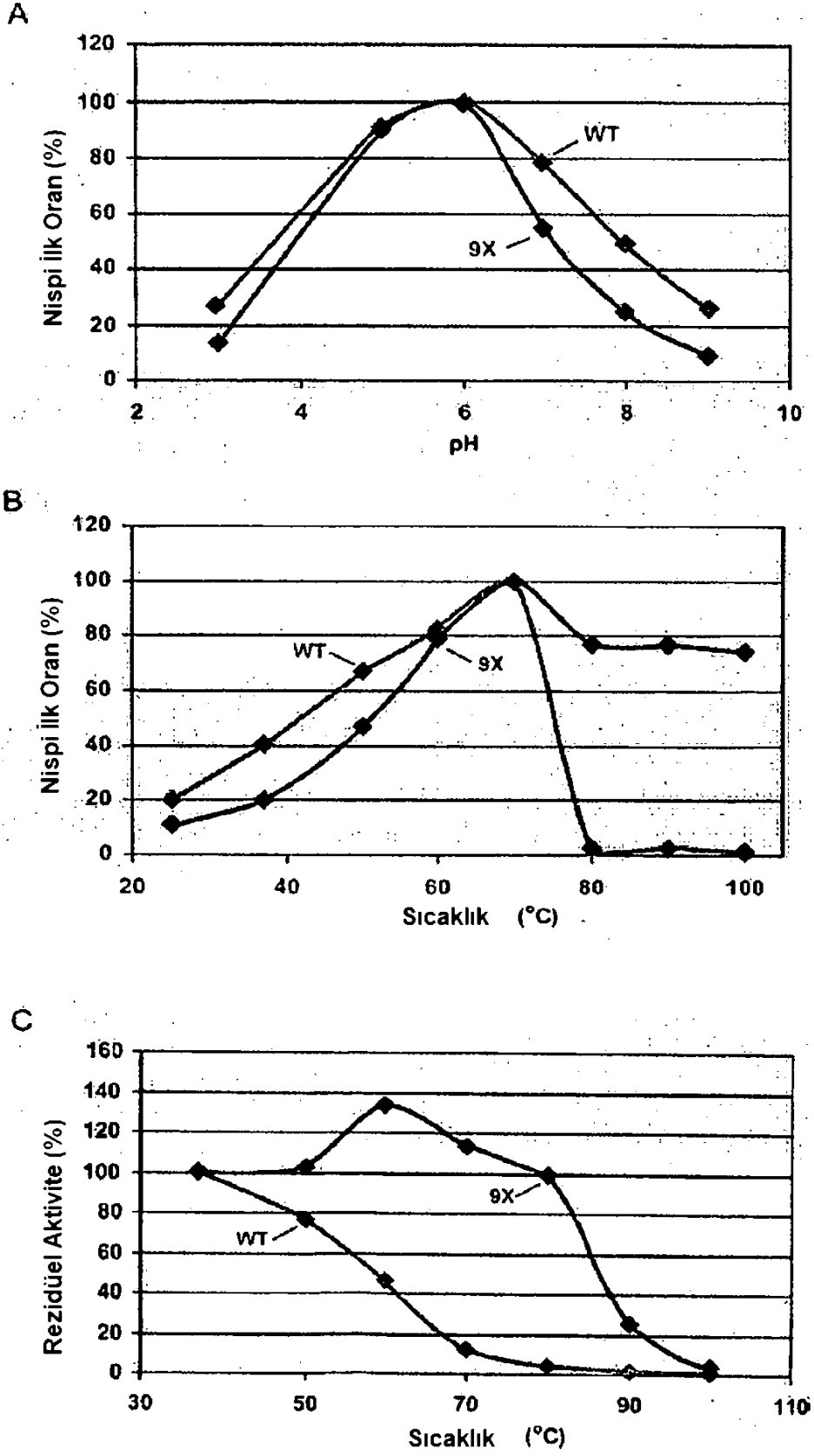


ŞEKİL 4

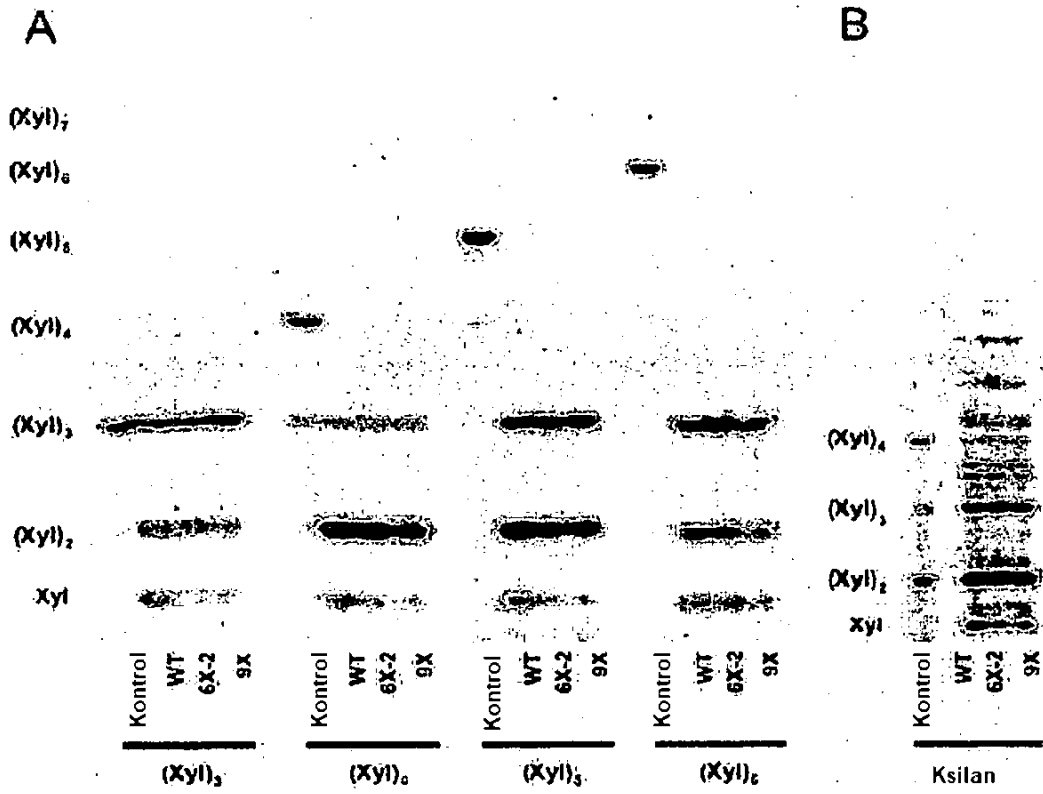
Şekil 5: 8x Mutantına karşılık Doğal tip Ksilanazın (SEK ID NO: 189 ve 190) Termal Toleransı



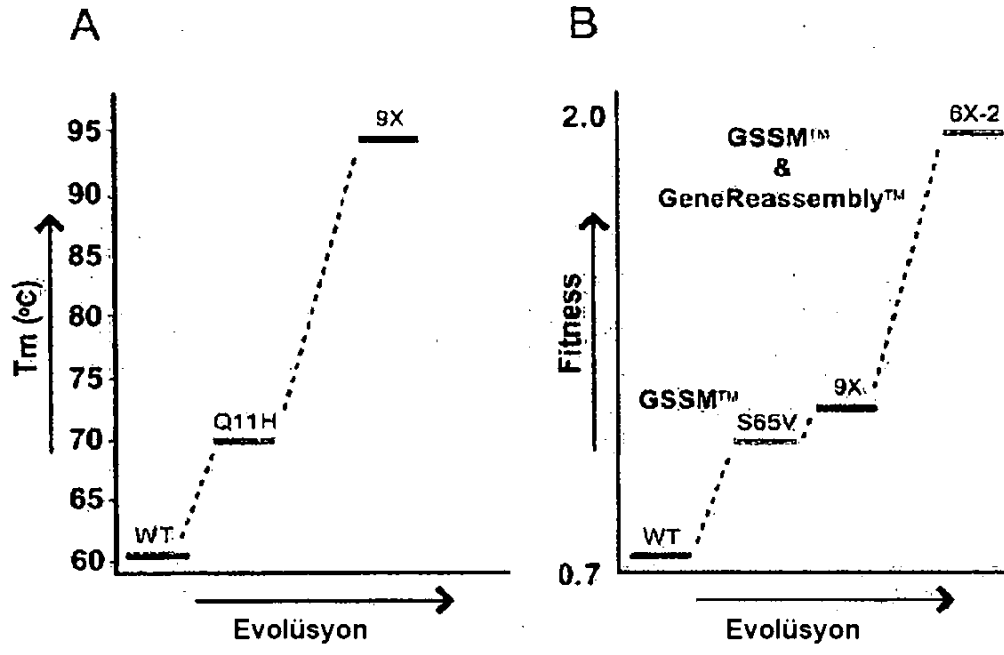
Şekil 7



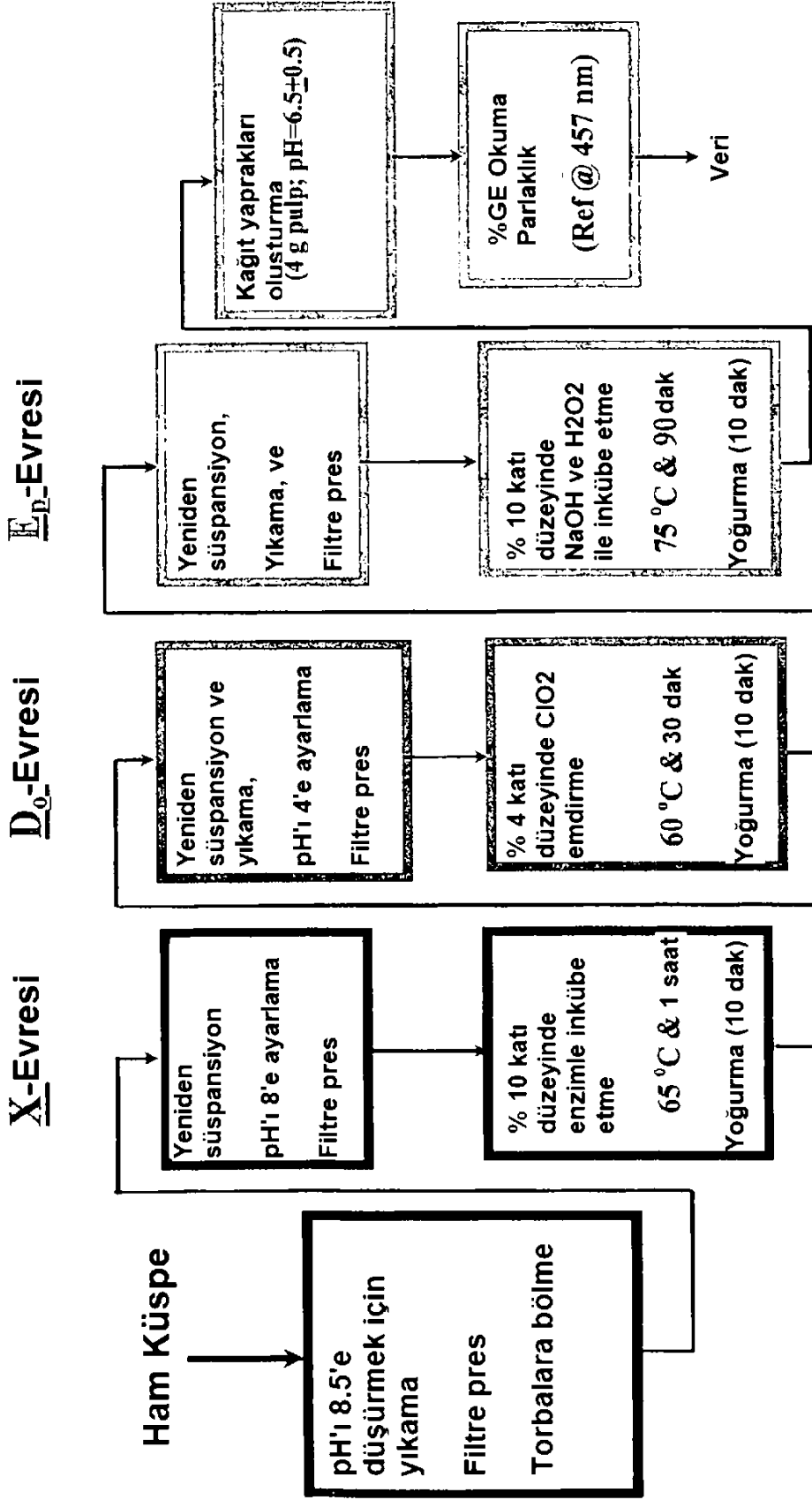
Şekil 9



Şekil 10

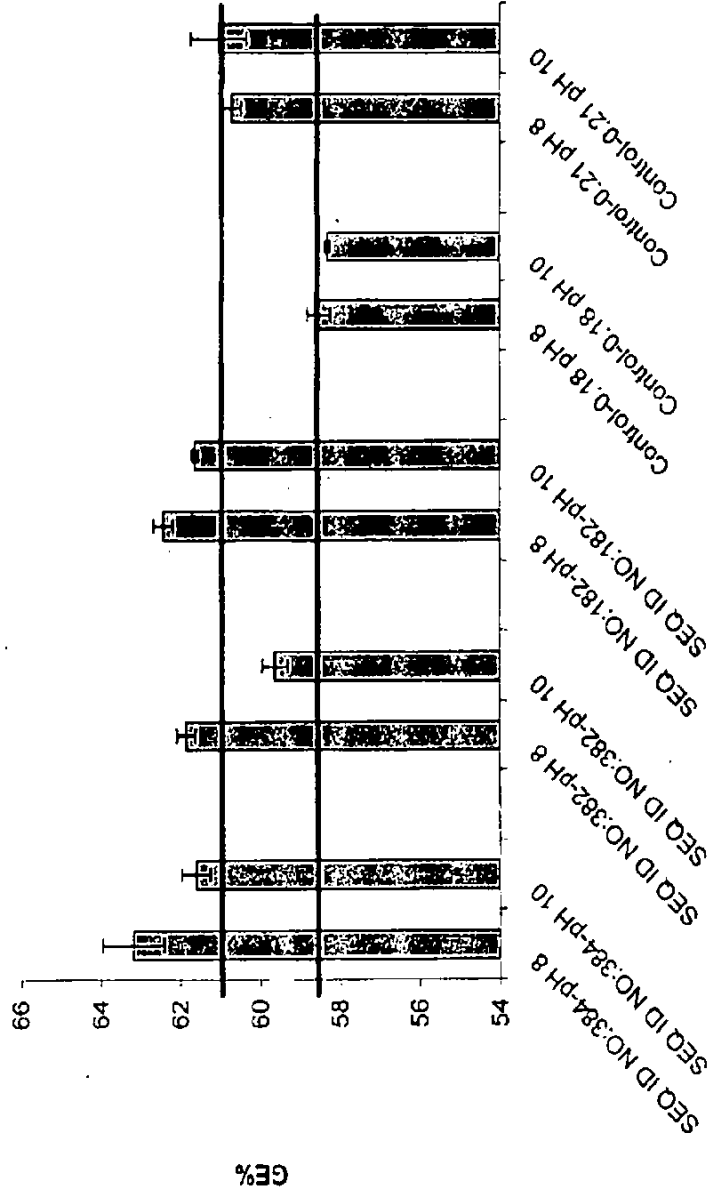


Şekil 11

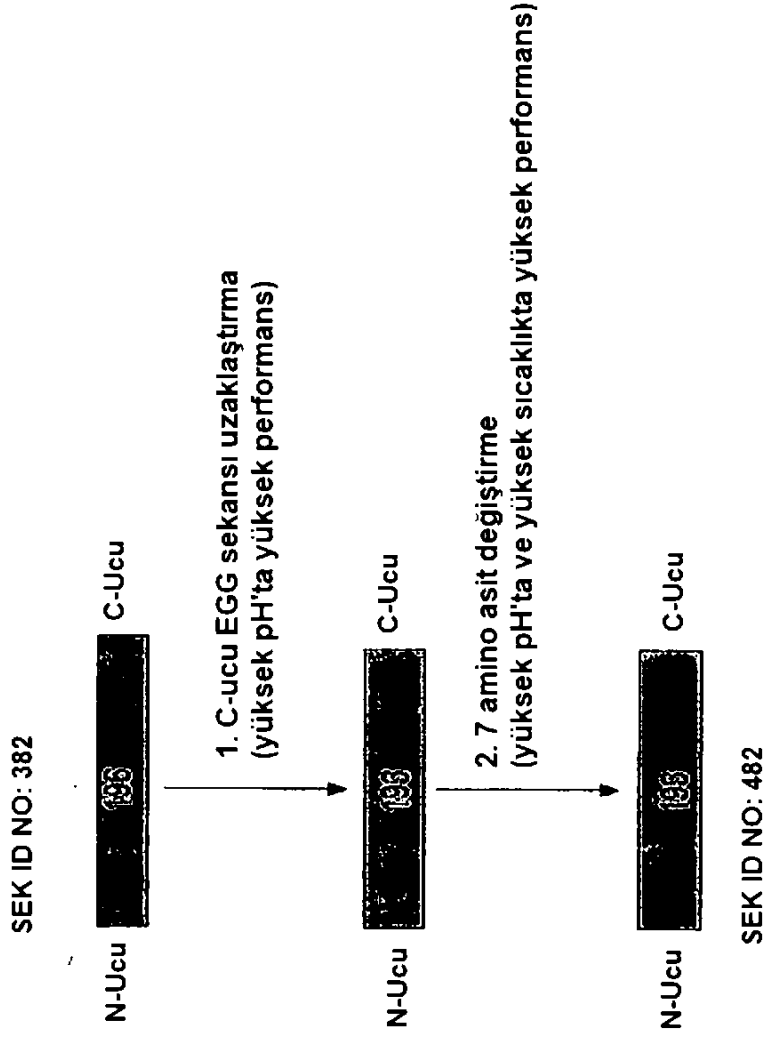


Şekil 12

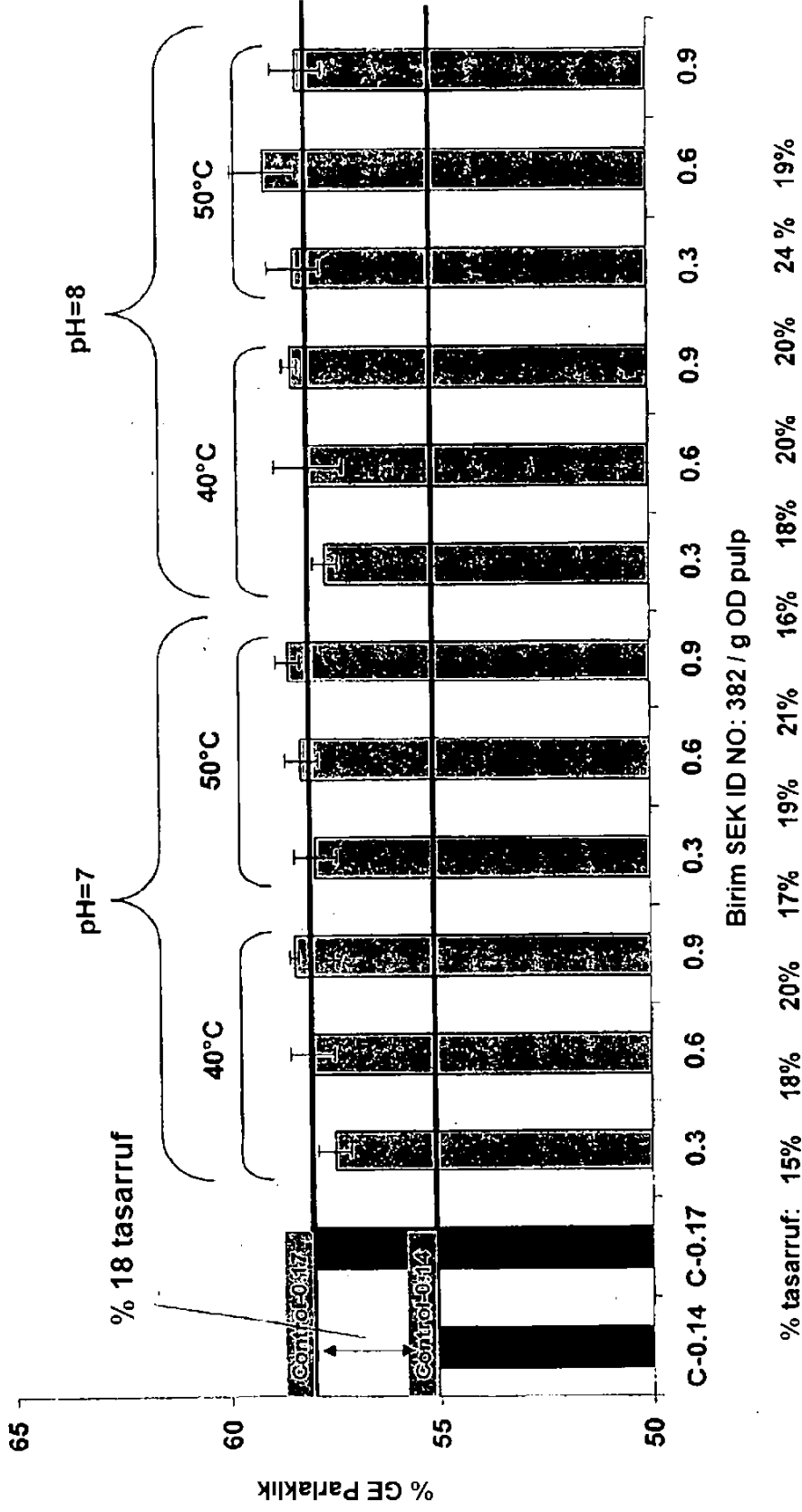
Biyo-Ağartma Sonuçları



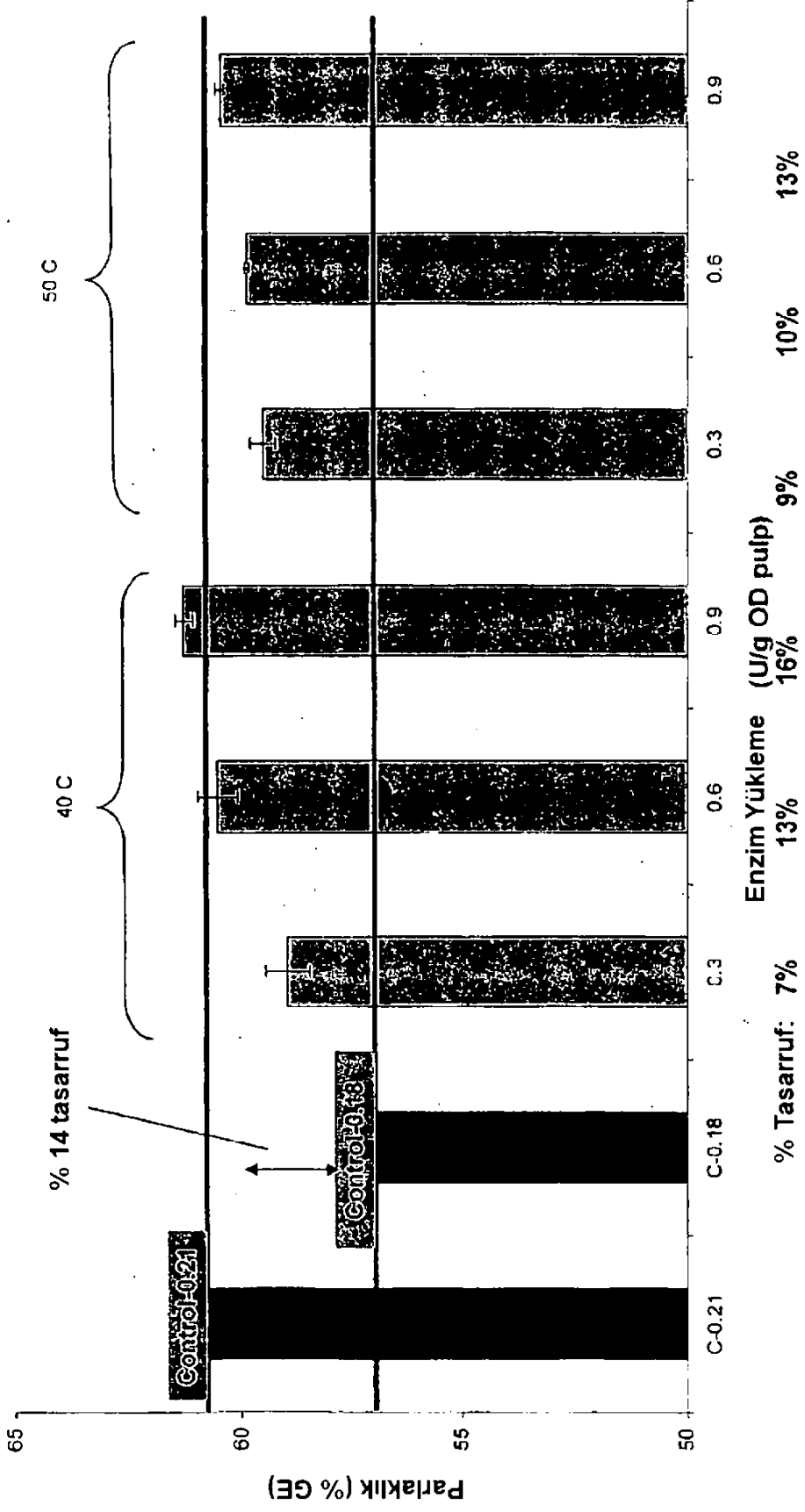
Şekil 13



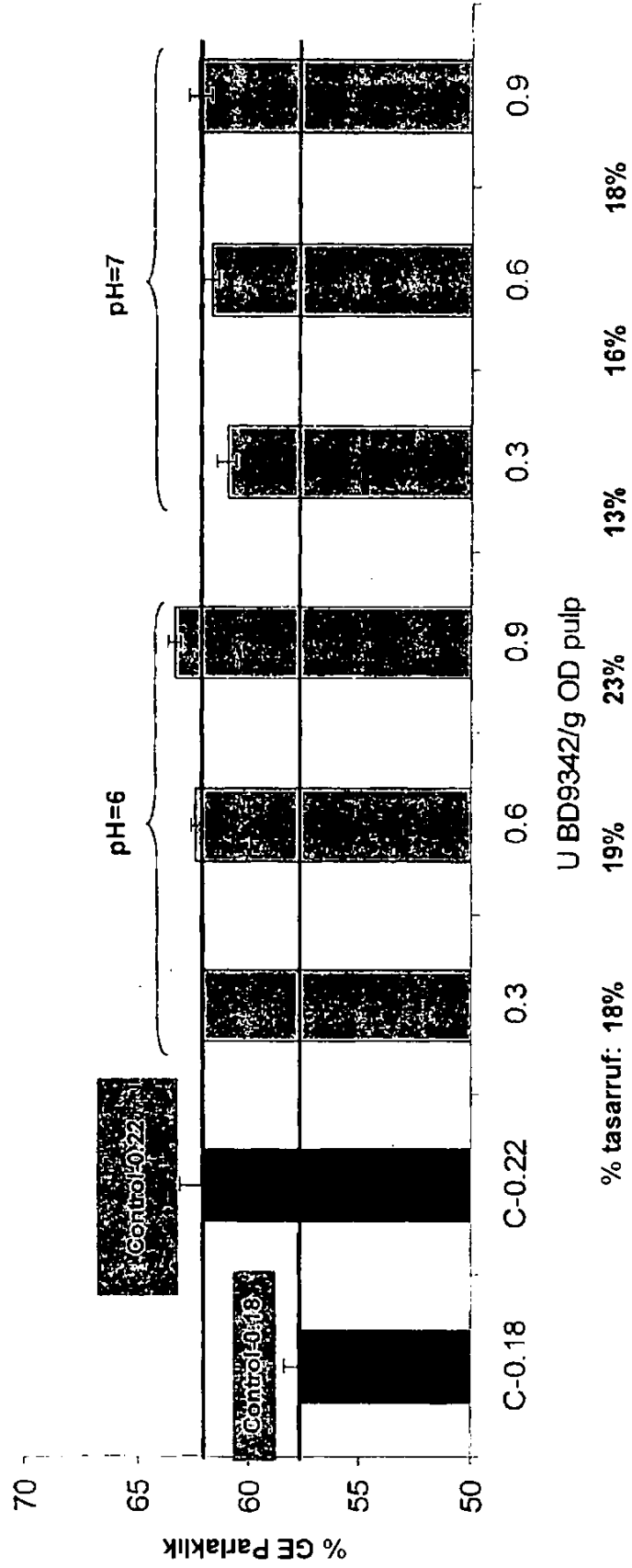
Şekil 16



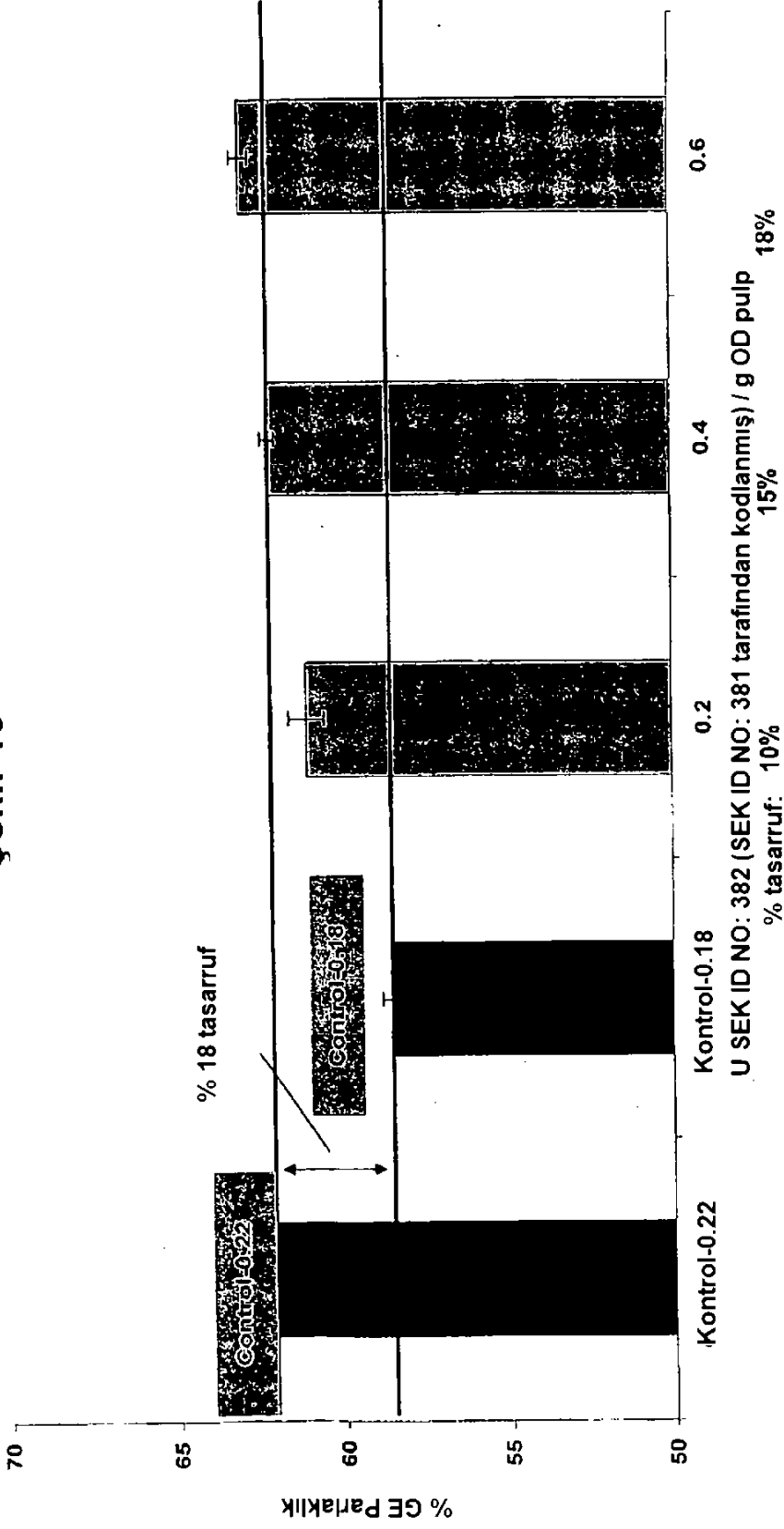
Şekil 17



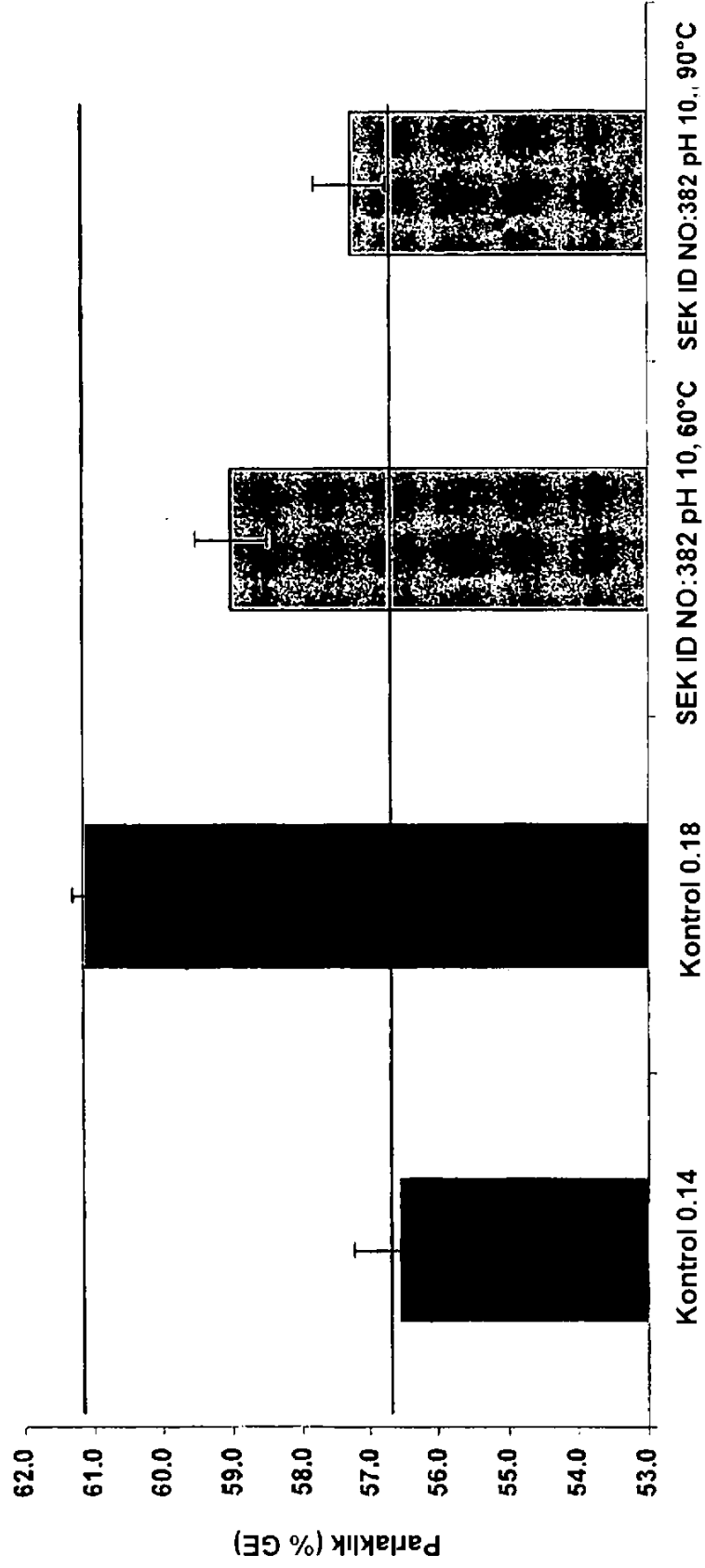
Şekil 18



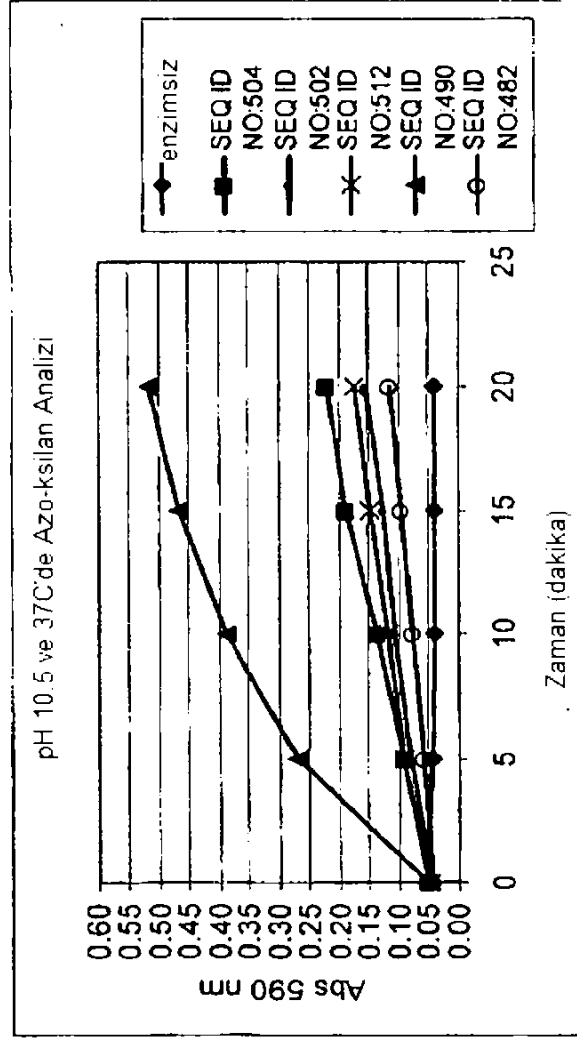
Şekil 19



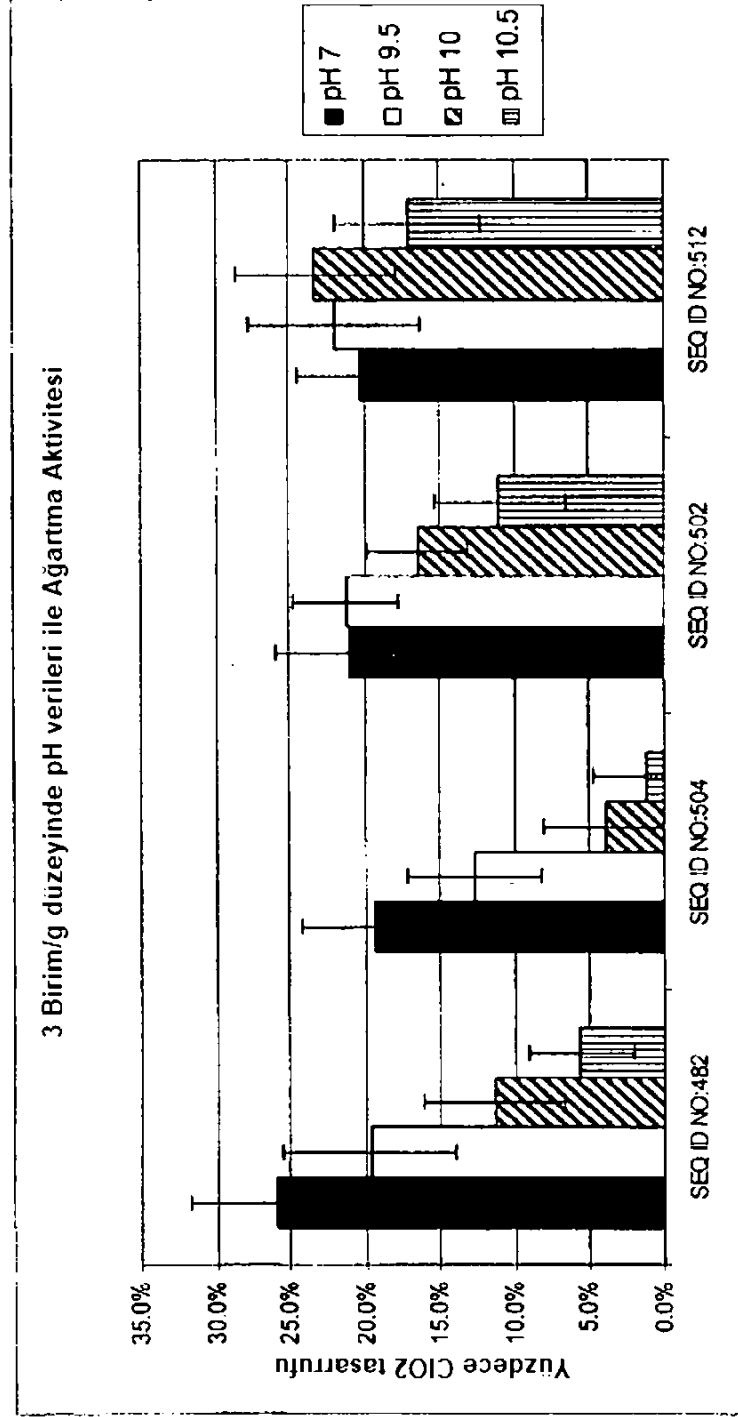
Şekil 20



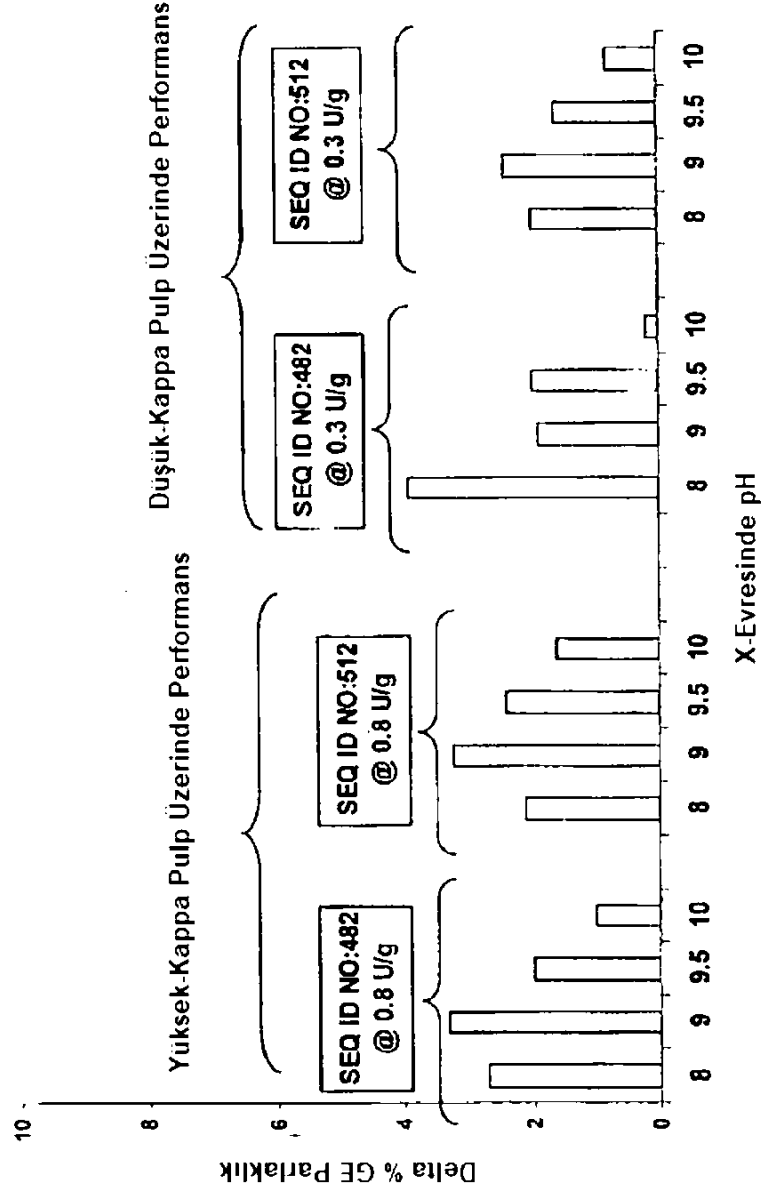
Şekil 21



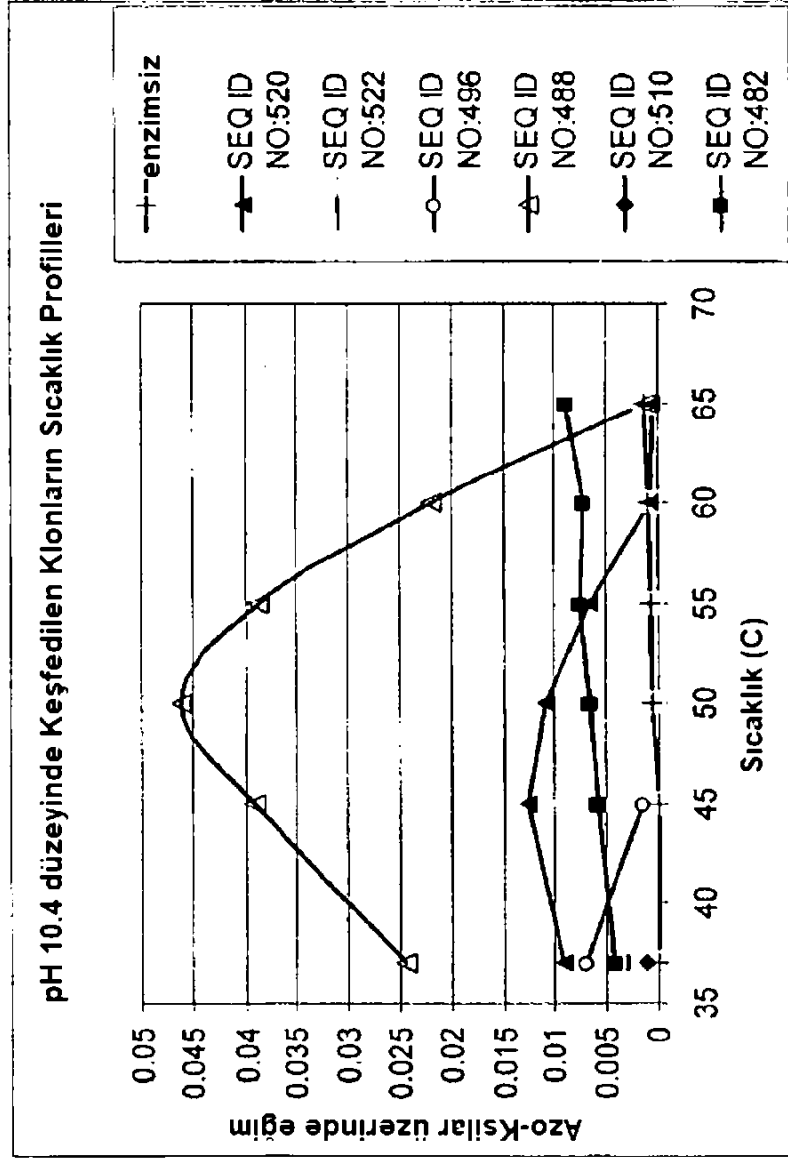
Şekil 22



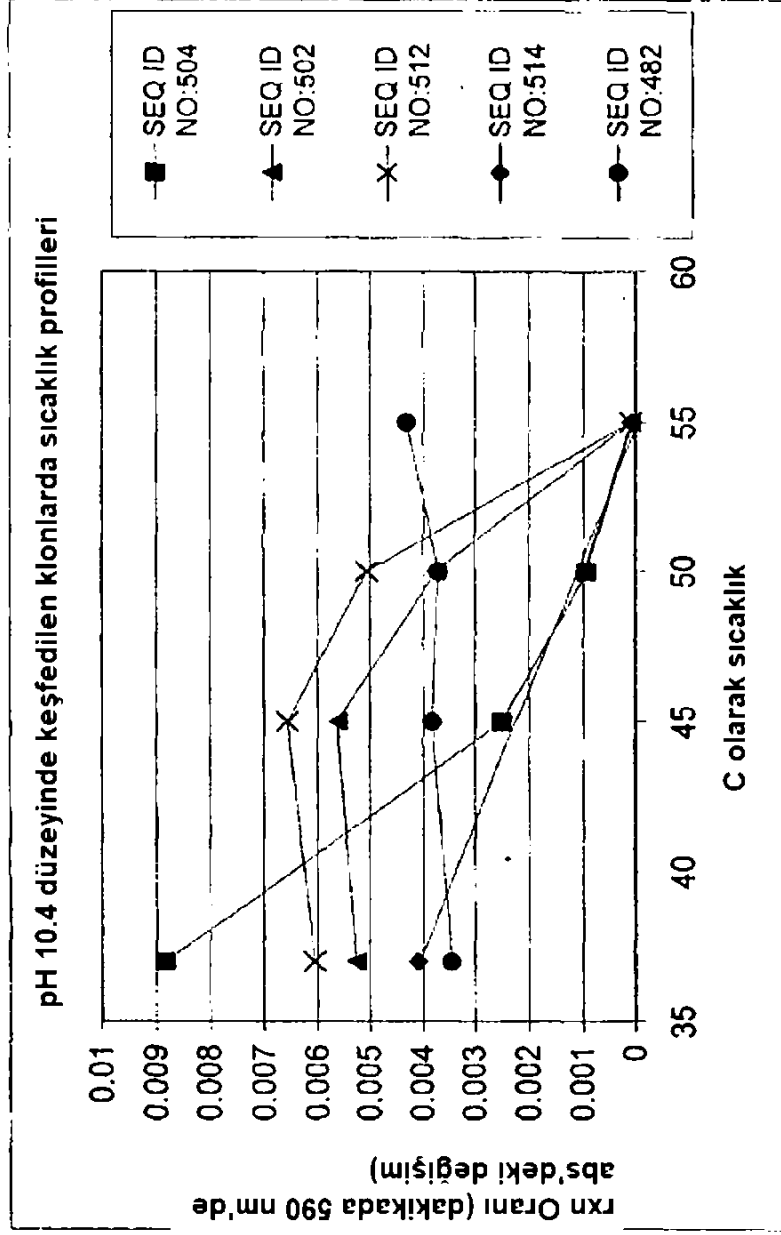
Şekil 23



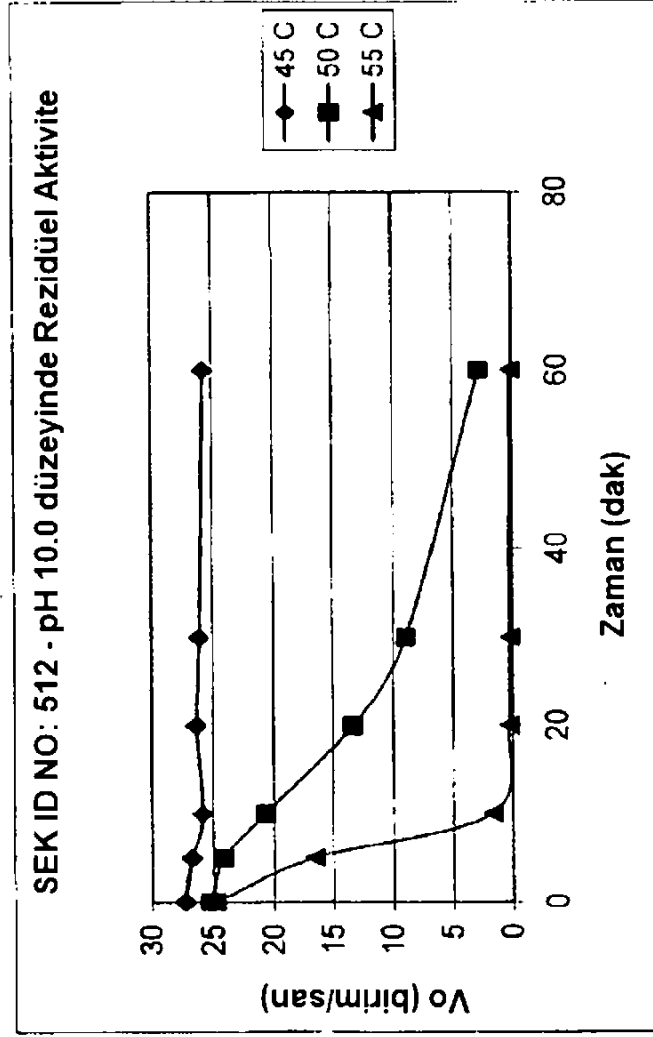
Şekil 24



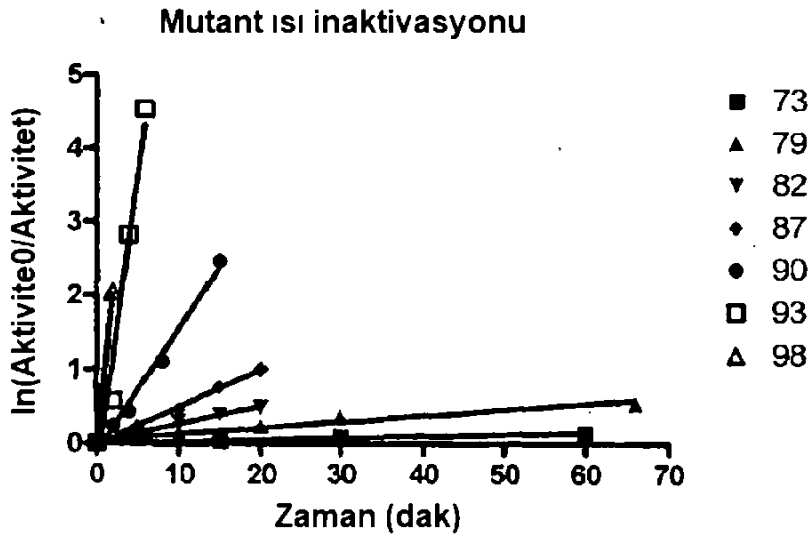
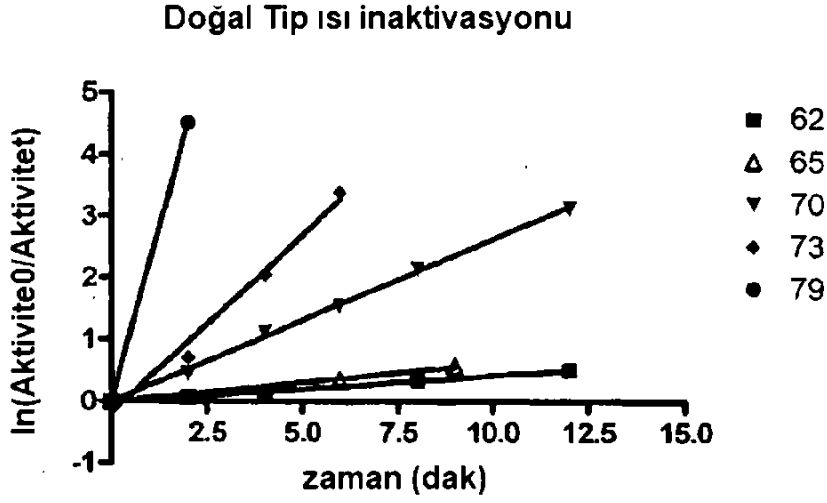
Şekil 25



Şekil 26



Şekil 27



Şekil 27A (üst)

Şekil 27B (alt)

Şekil 28

