(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

FI0001167958

(10) **FI 116795 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **28.02.2006**

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

C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12S 3/08 (2006.01)

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **934330**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **01.10.1993**

(24) Alkupäivä - Löpdag **27.03.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **01.10.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/DK92/00099**

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

02.04.1991 EP 91610027 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Schülein,Martin, Wiedeweltsgade 51, 2100 Koebenhavn Q, TANSKA, (DK)
2 •Heidt-Hansen,Hans Peter, Vangeledet 53, 2830 Virum, TANSKA, (DK)
3 •Dalboege,Henrik, Ligustervaenget 63, 2830 Virum, TANSKA, (DK)
4 •Halkier,Torben, Vodroffsvej 14 A 7, 1900 Frederiksberg C, TANSKA, (DK)
5 •Pedersen,Lars Saaby, Bagsvaerdvej 69 B 14, 2800 Lyngby, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Annankatu 42 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Ksylanaasi, vastaava yhdistelmä-DNA-sekvenssi, ksylanaasia sisältävä aine ja aineen käyttö
Xylanas, motsvarande rekombinant-DNA-sekvens, ett medel innehållande xylanas samt användning av medlet

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 6995 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 5116746 A, WO 91/02839 A1, WO 91/02791 A1, 90/01060 A1,
Nucleic Acid Research, (Zappe et al), vol. 18, nro 8, p. 2179, 1990, Poutanen, "Characterization of xylanolytic enzymes for potential applications", Technical Research centre of Finland, Publications 47, p. 3-24, 1988

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Ksylanaasi karakterisoidaan usealla osittaisella aminohapposekvenssillä ja se on immunoreaktiivinen vasta-aineen kanssa, joka on kohotettu puhdistettua ksylanaasia vastaan, joka on peräisin Humicola insolens, DSM 1800:sta. Tämä ksylanaasivalmiste on käytännöllisesti katsoen sellulaasitonta, ja se soveltuu hyvin paperimassan käsittelyyn, leivonta-aineena ja lisäaineeksi eläinrehuun.

Xylanas karakteriseras genom flera partiella aminosyrasekvenser och den är immunoreaktiv med en antikropp som har alstrats mot en renad xylanas, som härstammar från Humicola insolens, DSM 1800. Detta xylanaspreparat är i praktik cellulasfritt, och det lämpar sig bra för behandling av pappersmassa, såsom ett bakämne och såsom ett tillsatsämne till djurfoder.

Ksylanaasi, vastaava yhdistelmä-DNA-sekvenssi, ksylanaasia sisältävä aine ja aineen käyttö - Xylanas, motsvarande rekombinant-DNA-sekvens, ett medel innehållande xylanas samt användning av medlet

Tämä keksintö koskee ksylanaasia, vastaavaa yhdistelmä-DNA-sekvenssiä, vektoria, transformoitua isäntää, menetelmää ksylanaasin tuottamiseksi, ksylanaasia sisältävää ainetta, ja aineen käyttöä.

Ksylaani, kasvihemiselluloosan tärkeä komponentti, on polymeeriä D-ksyloosista, joka on liittynyt β-1,4-ksylosidisidoksin. Ksylaani voidaan hajottaa ksyloosiksi ja ksylo-oligomeereiksi happamalla tai entsymaattisella hydrolyysillä. Ksylaanin entsymaattisesta hydrolyysistä muodostuu vapaita sokereita ilman hapon kanssa muodostuneita sivutuotteita (esimerkiksi furaaneja).

Ksylanaaseilla on nykyisin viisi tärkeää sovellutusta: 1) maatalousjätteiden entsymaattinen hajotus alkoholipolttoaineiden tuottamiseksi; 2) eläinrehujen tai -rehukomponenttien modifiointi tai lisääminen eläinrehuihin hemiselluloosafraktion hajottamiseksi in vivo; 3) käyttö leivonta-aineena; 4) selluloosaa tuottavien liukenevien massojen valmistus; ja 5) puumassan biovalkaisu. [Detroym R.W. Teoksessa: Organic Chemicals from Biomass, (CRC Press, Boca Raton, FL, 1981) 19-41; Paice, M.G. ja L. Jurasek. J. Wood Chem. Technol. 4: 187-198; Pommier, J.C., J.L. Fuentes, G. Goma. Tappi Journal (1989): 187-191; Senior, D.J., et al., Biotechnol. Letters 10 (1988) 907-912]

Massa- ja paperiteollisuudessa käytetään ksylanaasikoostumuksia valkaisuprosessissa valkaistujen massojen vaaleusasteen kohottamiseen, vähentämään valkaisuvaiheissa käytettyjen kemikaalien määrää ja parantamaan massojen jauhautuneisuustilaa kierrätyspaperiprosessissa [Eriksson, K.E.L., Wood Science and Technology 24 (1990); 79-101; Paice, M. G., R.

Bernier ja L. Jurasek, Biotechnol. and Bioeng. 32 (1988) 235-239; Pommier, J.C., J.L. Fuentes ja G. Goma, Tappi Journal (1989) 187-191]

Kraftmassan valmistukseen, joka on massa- ja paperiteollisuudessa laajalti käytetty menetelmä, liittyy massan alkalinen sulfaattikeitto poistamaan 90-98 % ligniinistä. Loppu 1-10 % ligniinistä antaa massalle tummanruskean värin, jolla on taipumus tummeta UV-valossa tai hapetuksella. Jotta saataisiin valkoista massaa korkealaatuista paperia varten, ruskea väri poistetaan monivaiheisella valkaisuprosessilla käyttämällä kemikaaleja, esimerkiksi klooria, klooridioksidia, otsonia, happea tai vetyperoksidia.

Nykyisin kiinnitetään paljon huomiota valkaisuprosessissa muodostuneiden kemikaalien ympäristövaikutukseen. Entsyymit voivat auttaa poistamaan ligniiniä massasta ilman mitään haitallisia sivutuotteita. Kuvaukset osoittavat, että ligniini on puussa liittynyt ksylaaniin [Erikkon, O., et al., Wood Sci. Technol. 14 (1980) 267; Takashi, N. ja T. Koshijiima, Wood Sci. Technol. 22 (1988) 177-189]. Ksylaanin rajallisella hydrolyysillä tapahtuu valkaisun aikana suurempi ligniinin vapautuminen. Siten käsittelemällä massan entsymaattisesti ennen valkaisua pienenisi puolestaan tarvittavien valkaisukemikaalien määrä [Viikari, L., et al., Proceedings of the 3rd International Symposium on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (1986) 67].

Teknillisen kirjallisuuden mukaan on saatu hyviä tuloksia Trichoderma'sta olevien sienivalmisteiden avulla [Paice, M. G., L. Jurasek, J. Wood Chem. Technol. 4 (1989) 187-198; Senior, D.J., et al., Biotechnol. Letters. 10 (1988) 907-912], jotka vaativat puumassojen pH-arvon säätöä alle pH-arvon 6,0.

Erästä Trichoderma-ksylanaasivalmistetta, Pulpzyme™ HA (saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Novo Nordisk A/S) voidaan käyttää kraftmassojen ligniininpoistoon pH-arvossa 5-7. Ent-

syymillä on vain vähäinen vaikutus 50 °C:ssa ja pH-arvossa yli 7.

Myös erästä Bacillus pumilus-ksylanaasivalmistetta, Pulpzyme HB (saatavissa kaupallisesti yhtiöstä Novo Nordisk A/S), voidaan käyttää kraftmassojen ligniininpoistoon pH-arvossa 5-7. Entsyymillä on vain vähäinen vaikutus 50 °C:ssa ja pH-arvossa yli 7.

On kuvattu Humicola insolens-ksylanaasit (Yoshioka, H et al., Agric. Biol. Chem. 43(3) (1981) 579-586). Niillä voi olla raakavalmistuksessa pH-optimi 6,0 ja lämpötilaoptimi 60 °C. pH-arvossa 9 niillä on 25 % pH-arvossa 6 olevasta aktiivisuudesta. Artikkelin informaation mukaan entsyymit eivät olleet puhdistettuja, ja sisältävät sen vuoksi merkittävästi sellulsaasiaktiivisuutta, koska H. Insolens tunnetaan hyvänä sellulaasintuottajana, viitaten US-patenttijulkaisuun. Lisäksi entsyymejä ei ole karakterisoitu sellulaasien, M_w:n, pI:n tai aminohappokoostumuksen suhteen, eikä niitä ole testattu kraftmassoilla, leivonnassa tai eläinrehuun.

Tekniikan tason ksylanaasivalmiste Humicola insolens YH-8:sta, joka kuvataan julkaisussa Agric. Biol. Chem., ja muut edellä mainitut tekniikan tason ksylanaasivalmisteet eivät sovellu hyvin kraftmassan ligniininpoistoon, johtuen osaksi suhteellisen suuresta sellulaasipitoisuudesta.

Siten tämän keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön ksylanaasi, joka voidaan valmistaa valmisteena, jossa on hyvin pienet määrät muita entsyymiaktiivisuuksia, erityisesti sellulaasiaktiivisuuksia ja muita ksylanaasiaktiivisuuksia, ja soveltuu hyvin käytettäväksi kraftmassan ligniininpoistoon, leipomisaineena ja lisäaineena eläinrehuun.

Keksinnön mukaiselle ksylanaasille on tunnusomaista, että sillä on seuraavat osittaiset aminohapposekvenssit

1 Thr-Asn-Thr-Gly-Asn-Phe-Val-Gly-Gly-Lys-Trp-Asn-Pro-Gly-Thr-Gly-Arg-Thr-Lys-Asn-Tyr-,

2 Thr-Ala-Asn-Pro-Leu-Val-Glu-Tyr-Tyr-,

3 Ser-Trp-Trp-Ser-Asp-Gly-Gly-Gly-Gln-Val-Gln-Tyr-,

4 Val-Ser-Thr-Arg-Tyr-Asn-Gln-Pro-Ser-Ile-Asp-Gly-Thr-Arg-Thr-Phe-Gln-Gln-Tyr-Trp-Ser-Ile-Arg-Lys-,

5 Tyr-Val-Ile-Glu-Ser-Tyr-Gly-Thr-Tyr-Asn-Pro-Gly-Ser-Gln-Ala-Gln-Tyr-Lys-Gly-Thr-Phe-Tyr-Thr-Asp-Gly-Asp-Gln-Tyr-Asp-,

ja

6 Gln-Val-Thr-Pro-Asn-Ala-Glu-Gly-Trp-His-Asn-Gly-Tyr-Phe-Tyr-,

tai osittaisaminohapposekvenssi, jolla on sen kanssa ainakin 80-%, edullisesti ainakin 90-% homologia.

Hämmästyttävällä tavalla on keksitty, että on mahdollista tuottaa keksinnön mukainen ksylanaasi osana ksylanaasivalmistetta, joka sisältää entsyymiaktiivisuuksia, ksylanaasin ohella esimerkiksi sellulaaseja hyvin pienissä konsentraatioissa. Erityisesti on huomautettava, että keksinnön mukainen ksylanaasi on erityistä ksylanaasia, joka on valittu useista ksylanaaseista, joita Humicola insolens, DSM 1800, tuottaa luonnostaan ja joka on erinomaisen sopiva sekä aineena lisättäväksi paperimassaan, leivonta-aineena, ja lisäaineena eläinrehuun. On myös keksitty, että keksinnön mukaisella ksylanaasilla on spesifinen aktiivisuus, joka on suurempi kuin aktiivisuus millään tekniikan tason ksylanaaseista. Hämmästyttävintä on, että keksinnön mukaisella ksylanaasilla on ylivoimaiset ominaisuudet suhteessa kaikkiin näistä teknisistä alueista, jotka eivät muuten liity toisiinsa.

Keksinnön mukaisella ksylanaasilla on merkittävä vaikutus ligniinin poistossa massasta pH-arvossa 8, kuten myöhemmin osoitetaan. Ligniininpoistoteho on merkittävästi suurempi kuin tekniikan tasolla (B. pumilus), kuten myöhemmin osoitetaan.

Hyvä suorituskyky ligniininpoiston suhteen saavutetaan hämmästyttävällä tavalla keksinnön mukaisella ligniinillä yksinään, vaikka se on yksi H. insolens'issa olevasta useasta ksylanaasikomponentista. Ligniininpoistomenetelmä on taloudellisempi koska tarvitaan vain yhtä ksylanaasikomponenttia, jota tuotetaan suurilla saannoilla yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

Hämmästyttävästi on mahdollista tuottaa keksinnön mukainen ksylaasi ilman merkittävää sellulaasiaktiivisuutta, välttäen täten saantotappion, joka sellulolyyttinen hyökkäys selluloosakuituja vastaan massassa aiheuttaa ksylanaasin ligniinin poistoon käytön aikana.

Kuten myöhemmin osoitetaan, voi keksinnön mukainen ksylanaasi hämmästyttävällä tavalla poistaa enemmän ligniiniä havupuumassasta kuin B. pumilus-ksylanaasi, vaikka näillä kahdella ksylanaasilla on hyvin samanlaiset pH-profiilit.

Ksylanaasia (leipomoteollisuudessa käytetään tavallisesti nimeä pentosanaasi) käytetään vehnäleivän leivonta-aineena useisiin tarkoituksiin:

- taikinan kehittäminen
- taikinan elastisuuden ja stabiilisuuden parantaminen
- leivän tilavuuden lisääminen
- leivän sisuksen rakenteen parantaminen
- homehtumisenesto

Uskotaan, että jotkin ksylanaasit hajottavat pentosaaneja (arabinoksylaaneja) sillä lailla, että täten modifioidut pentosaanit parantavat taikinan elastisuutta, stabiilisuutta ja kehittymistä. Hämmästyttävällä tavalla keksinnön mukainen ksylanaasi voi modifioida pentosaaneja sillä lailla. Keksinnön mukainen ksylanaasi voidaan tuottaa ilman muita ksylanaaseja ja ksylaania modifioivia entsyymejä, ja tekee siten mahdolliseksi saada pentosaanien kontrolloitu modifiointi.

Taikinan pH-arvo on 6,0-5,5, mikä tekee tämän ksylanaasin ihanteelliseksi leivonta-aineena käyttöön, koska keksinnön mukaisen ksylanaasin pH-optimi on 5,5-7,5.

Keksinnön mukaista ksylanaasia voidaan myös käyttää modifioimaan eläinrehuja tai lisättäväksi eläinrehuihin hemiselluloosafraktion hajottamiseksi in vivo. Keksinnön mukaista ksylanaasia voidaan käyttää valmisteena, jolla ei ole käytännöllisesti katsoen lainkaan sivuvaikutuksia, kun taas tekniikan tason ksylanaasi, jota edustaa H. insolens-ksylanaasituote, voisi sisältää useita sivuaktiivisuuksia, mukaan lukien muita ksylanaaseja. Keksittiin, että keksinnön mukainen ksylanaasi ja tekniikan tason ksylanaasi aiheuttivat samanlaiset vaikutukset painonlisäyksen suhteen kananpojansyöttökokeissa. Tämä osoittaa, että keksinnön mukainen ksylanaasi on aktiivinen tai yksi aktiivisista H. insolens-ksylanaaseista suhteessa rehulisäainesovellutukseen. Lisäksi keksinnön mukaisella ksylanaasilla on merkittävä etu, että se sisältää hyvin puhdasta ksylanaasia, jolloin voidaan saavuttaa toistettavissa oleva painonlisäys, vastakohtana tekniikan tason ksylanaasille, joka sisältää useita sivuaktiivisuuksia, joilla on erästä riippuen vaihtelevat osuudet. Keksinnön mukainen ksylanaasi, joka on yksikomponenttiksylanaasia, avaa myös taloudellisemman rehulisäaineen mahdollisuuden.

Keksinnön mukaisen ksylanaasin eräälle edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että ksylanaasi on immunoreaktiivista vasta-aineen kanssa, joka on kehitetty puhdistettua ksylanaasia vastaan, joka on peräisin Humicola insolens, DSM 1800:sta.

Keksinnön mukaisen ksylanaasin eräälle edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että ksylanaasin isoelektrinen piste on 7,5-9,5, edullisesti 8,0-8,5.

Keksinnön mukaisen ksylanaasin eräälle edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että ksylanaasin spesifinen aktiivisuus on yli 330 EXU/mg proteiinia, edullisesti yli 400

EXU/mg proteiinia. EXU-ksylanaasiaktiivisuusyksikkö määritellään julkaisussa AF 293.9/1. Tämä AF-julkaisu ja muut tässä selityksessä mainitut AF-julkaisut ovat pyydettäessä saatavissa yhtiöstä Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd, Tanska.

Keksintö käsittää myös yhdistelmä-DNA-sekvenssin, jolle on tunnusomaista, että se koodittaa keksinnön mukaista ksylanaasia.

Eräälle keksinnön mukaiselle edulliselle yhdistelmä-DNA-sekvenssille on tunnusomaista se, että se käsittää seuraavan osittaisen DNA-sekvenssin

```
1                   5                   10                  15
ATG GTC TCG CTC AAG TCT GTC CTC GCG GCC GCC ACG GCT GTG AGC

                    20                  25                  30
TCT GCC ATT GCT GCC CCT TTT GAC TTC GTT CCT CGG GAC AAC TCG

                    35                  40                  45
ACG GCC CTT CAG GCT CGC CAG GTG ACC CCC AAC GCC GAG GGC TGG

                    50                  55                  60
CAC AAC GGC TAC TTC TAC TCG TGG TGG TCC GAC GGC GGA GGC CAG

                    65                  70                  75
GTT CAG TAC ACC AAC CTC GAG GGC AGC CGC TAC CAG GTC AGA TGG

                    80                  85                  90
NNN AAC ACC GGC AAC TTC GTC GGT GGT AAG GGT TGG AAC CCG GGA

                    95                  100                 105
ACC GGC CCC ACG ATC AAC TAC GGC GGC TAC TTC AAC CCC CAG GGC

                    110                 115                 120
AAC GGC TAC CTG GCC GTC TAC GGC TGG ACC NNN AAC CCG CTC GTC

                    125                 130                 135
GAG TAC TAT GTC ATC GAG TCG TAC GGC ACG TAC AAT CCC GGC AGC

                    140                 145                 150
CAG GCT CAG TAC AAG GGC ACA TTC TAT ACC GAC GGC GAT CAG TAT

                    155                 160                 165
GAC ATC TTT GTG AGC ACC CGT NNN AAC CAG CCC AGC ATC ACG GCA

                    170
CCC GGA CGT CCA GCT AGT ACT
```

Keksinnön mukaisen yhdistelmä-DNA-sekvenssin eräälle edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että se käsittää DNA-sekvenssin, joka on

a) Humicola insolens-ksylanaasi-DNA-insertio pHD 450:ssä

b) DNA-sekvenssi, joka hybridisoituu kypsän ksylanaasi-DNA:n koodialueeseen, joka koostuu a)-kohdan DNA-insertiosta, ja joka käsittää rakennegeenin polypeptidiä varten, jolla on ksylanaasiaktiivisuutta, ja mahdollisesti promoottorin, koodialueen signaali- tai johtopeptidiä varten ja/tai transkription terminaattorin

c) DNA-sekvenssi, jolla on riittävä homologia hybridisoitumaan suhteellisen ankarissa olosuhteissa (1,0 x SSC, 0,1 % SDS, 65 °C) patenttivaatimuksessa 6 ilmaistuun sekvenssiin, viitaten käsikirjaan T. Maniatis, A laboratory Manual (CSH)

d) a)-, b)- tai c)-kohdassa määritellyn DNA-sekvenssin johdannainen, tai

e) DNA-sekvenssi, joka koodittaa kypsää ksylanaasia tai sen signaalipeptidiä tai johtopeptidiä ja joka on degeneratiivinen geneettisen koodin merkityksen sisällä a)-, b)- tai c)-kohdan DNA-sekvenssin suhteen.

pHD450:n konstruointi selitetään sivulla 20, rivit 27-37.

Keksintö käsittää myös vektorin, jolle on tunnusomaista se, että se sisältää keksinnön mukaisen yhdistelmä-DNA-sekvenssin.

Eräälle keksinnön mukaisen vektorin edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että promoottori on Aspergillus oryzae-taka-amylaasipromoottori ja/tai ksylanaasigeeni on eristetty EC 3-2:sta, ja/tai terminaattori on Aspergillus oryzae AMG-terminaattori, edullisesti pHD450. pHD450:n konstruointi selitetään sivulla 20, rivit 27-37.

Keksintö käsittää myös transformoidun isännän, jolle on tunnusomaista, että se sisältää keksinnön mukaisen vektorin.

Eräälle keksinnön mukaisen transformoidun isännän edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että se on Aspergillus-kanta.

Eräälle keksinnön mukaisen transformoidun isännän edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että se on kanta, joka kuuluu Aspergillus aculeatus-, Aspergillus niger-, Aspergillus oryzae- tai Aspergillus awamori-lajiin.

Eräälle keksinnön mukaisen transformoidun isännän edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että se on mikro-organismi, joka ei transformoimattomassa tilassaan tuota ksylanaasia tai tuottaa vain merkityksettömiä ksylanaasimääriä, edullisesti Bacillus sp., E. coli tai S. cerevisiae.

Keksintö käsittää myös menetelmän ksylanaasin tuottamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että käytetään keksinnön mukaista transformoitua isäntää.

Keksintö käsittää myös ksylanaasin, joka on tuotettu keksinnön mukaisella menetelmällä.

Keksintö käsittää myös aineen, joka sisältää keksinnön mukaista ksylanaasia, edullisesti pölyämättömän granulaatin, stabiloidun nesteen tai suojatun entsyymin muodossa, jolloin ksylanaasi käsittää ainakin 10 %, edullisesti ainakin 30 % koko entsyymiproteiinista.

Eräälle keksinnön mukaisen aineen edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että ksylanaasiaktiivisuuden ja sellulaasiaktiivisuuden välinen suhde, yksikössä EXU/g olevan ksylanaasiaktiivisuuden ja yksikössä ECU/g olevan sellulaasiaktiivisuuden välisenä suhteena ilmaistuna, on yli 10, edullisesti yli 30, edullisimmin yli 100. Sellulaasiaktiivisuusyksikkö määritellään julkaisussa AF 302-1.

Eräälle keksinnön mukaisen aineen edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että se sisältää ksylanaasiaktiivisuutta ainakin 10 EXU/mg entsyymiproteiinia, edullisesti ainakin 100 EXU/mg entsyymiproteiinia, edullisemmin ainakin 300 EXU/mg entsyymiproteiinia.

Keksintö käsittää myös keksinnön mukaisen yhdisteen käytön, jolle on tunnusomaista, että ainetta käytetään ksylaanin hajotukseen.

Eräälle keksinnön mukaisen käytön edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että käyttö liittyy kemialliseen massaan tai kierrätyspaperimassaan ennen valkaisua tai sen osana, edullisesti pH-arvossa yli 7.

Eräälle keksinnön mukaisen käytön edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että käyttö liittyy leivän valmistukseen, joka leipä sisältää vehnäjauhoja.

Eräälle keksinnön mukaisen käytön edulliselle suoritusmuodolle on tunnusomaista, että käyttö liittyy eläinrehuun.

Keksinnön mukainen ksylanaasi voidaan valmistaa seuraavalla tavalla.

Ksylanaasia tuotettiin kasvattamalla Humicola insolens DSM 1800:ta, joka kuvataan US-patenttijulkaisun 4435307 esimerkissä 6 sen alusta palstalle 11, rivi 29. Pakastekuivattu jauhe laimennettiin vedellä kuiva-ainepitoisuuteen 10 %, ja pH säädettiin 10-% HCl:llä happamaan pH-arvoon 2,3. Seos jätettiin yksin 22 °C:ssa 50 min ajaksi, ja seuraavaksi pH säädettiin NaOH:lla emäksiseen pH-arvoon 8,0. Sitten suoritettiin suolasaostaminen 250 g:lla Na_2SO_4/kg nestettä pH-arvossa 5,0. Suolakakku liuotettiin uudelleen ja konsentroitiin ja pestiin ultrasuodatuksella. Lopulta valmiste pakastettiin.

Ksylanaasivalmisteella oli kuiva-ainepitoisuuden 12 % omaavassa liuoksessa seuraavat entsyymiaktiivisuudet: 444 CSU/ml ja 144 EXU/ml. CSU on sellulaasiaktiivisuusuksikkö, katso AF 267.

Tätä valmistetta puhdistettiin edelleen eräioninvaihdolla DEAE Serphadex A-50:llä (Pharmacia), konsentroimalla AMICON-ultrasuodatuksella, geelisuodatuksella Sephacryl S-200:lla (Pharmacia) ja kationinvaihdolla suuren lisäysmäärän S-Sepharose:lla (Pharmacia)

Keksittiin, että ksylanaasilla ei ollut lainkaan havaittavaa sellulaasisivuaktiivisuutta. Siten puhdistetun ksylanaasituotteen sellulaasiaktiivisuus oli alle 0,1 CSU/mg proteiinia ja ksylanaasiaktiivisuus yli 350 EXU/mg proteiinia. Puhdistetulla ksylanaasituotteella nähdään vain yksi SDS-PAGE-vyöhyke molekyylipainolla 22 kD. pI-arvoksi määritettiin 8,5 isoelektrisellä fokusoinnilla.

Vasta-aine, joka on reaktiivinen tämän puhdistetun ksylanaasituotteen kanssa, tuotettiin seuraavalla tavalla. Antiseerumi puhdistettua ksylanaasia vastaan kohotettiin immunisoimalla kaneja menettelytavalla, joka kuvataan teoksessa N. Axelsen et al.: A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, luku 23. Puhdistettu immunoglubuliini saatiin antiseerumista suolasaostuksella ($(NH_4)_2SO_4$), minkä jälkeen seurasi dialyysi ja ioninvaihtokromatografia DEAE-Sephadex'illa. Puhdistetun ksylanaasin immmunokemiallinen karakterisointi suoritettiin raketti-immunoelektroforeesilla (N. Axelsen et al., luku 2). Puhdistetulla ksylanaasilla nähtiin edellä mainitulla vasta-aineella yksi ainoa kaari, joka liikkui raketti-immunoelektroforeesissa katodia kohden.

Ksylanaasin karakterisoimiseksi kemiallisesti määritettiin kokonaisaminohappokoostumus happohydrolyysillä menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa: Moore ja Stein; Methods Enzymol. 6 (1963) 819-831, ja määrittämällä aminohapot hydrolyy-

siseoksesta kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti tavalla, joka on kuvattu julkaisuissa: Heinrikson ja Meredith, Anal. Biochem. 136 (1984) 65-75 (derivatisointi; ja Edelhoch, Biochemistry 6 (1967) 1948-1954 (tryptofaanin määritys). Viimeksi mainitussa viitteessä kuvataan tryptofaanipitoisuuden spektrofotometrinen määritys. Havaittiin seuraava aminohappokoostumus.

	Koostumus (mol-%)	Keskihajonta	Likimääräinen molekyylimassan mukainen koostumus	Suurin aminohappotähteiden lukumäärä	Pienin aminohappotähteiden lukumäärä
Asx (B)	13,16	0,75	25	27	24
Glx (Z)	12,94	0,37	25	25	24
Ser (S)	6,07	0,16	12	12	11
Gly (G)	14,01	0,48	27	28	26
His (H)	2,49	0,10	5	5	5
Arg (R)	4,91	0,33	9	10	9
Thr (T)	7,19	0,09	14	14	14
Ala (A)	2,94	0,23	6	6	5
Pro (P)	4,16	0,13	8	8	8
Tyr (Y)	9,77	0,21	19	19	18
Val (V)	6,10	0,38	12	12	11
Met (M)	0,93	0,07	2	2	2
Cys (C)	0,00	0,00	0	0	0
Ile (I)	2,68	0,12	5	5	5
Leu (L)	2,15	0,05	4	4	4
Phe (F)	3,50	0,07	7	7	7
Lys (K)	2,09	0,05	4	4	4
Trp (W)	4,89	0,10	9	10	9
Yhteensä	99,98	193	198	186	

Puhdistetun ksylanaasin N-terminaaliseksi aminohapposekvenssiksi havaittiin

1 5 10 15

Gln-Val-Thr-Pro-Asn-Ala-Glu-Gly-Trp-His-Asn-Gly-Tyr-Phe-Tyr-

(SEKVENSSI NRO 6)

Kymotrypsiinillä tapahtuvan entsymaattisen hajotuksen jälkeen sekvensoidaan myös kolme peptidiä, jolloin yksi näistä määritetään toisen peptidin sekvensoinnin aikana sivusekvenssiksi (ss):

Kymo-22: Thr-Asn-Thr-Gly-Asn-Phe-Val-Gly-Gly-Lys-Trp-Asn-Pro-Gly-Thr-Gly-Arg-Thr-Lys-Asn-Tyr- (SEKVENSSI NRO 1)

Kymo-22: Thr-Ala-Asn-Pro-Leu-Val-Glu-Tyr-Tyr- (ss) (SEKVENSSI NRO 2)

Kymo-24: Ser-Trp-Trp-Ser-Asp-Gly-Gly-Gly-Gln-Val-Gln-Tyr- (SEKVENSSI NRO 3)

CNBr:llä tapahtuvan kemiallisen hajotuksen jälkeen, jota seuraa entsymaattinen hajotus pepsiinillä, sekvensoidaan kaksi peptidiä.

CNBr/Pep-16: Val-Ser-Thr-Arg-Tyr-Asn-Gln-Pro-Ser-Ile-Asp-Gly-Thr-Arg-Thr-Phe-Gln-Gln-Tyr-Trp-Ser-Ile-Arg-Lys- (SEKVENSSI NRO 4)

CNBr/Pep-23: Tyr-Val-Ile-Glu-Ser-Tyr-Gly-Thr-Tyr-Asn-Pro-Gly-Ser-Gln-Ala-Gln-Tyr-Lys-Gly-Thr-Phe-Tyr-Thr-Asp-Gly-Asp-Gln-Tyr-Asp-((SEKVENSSI NRO 5)

On keksitty, että keksinnön mukaisella ksylanaasilla on heikko homologia tekniikan tason ksylanaasien kanssa, esimerkiksi ksylanaasien, joita voidaan tuottaa Schizophyllum communue'sta, Bacillus pumilus'ista ja Bacillus subtiliksesta.

Esimerkissä 1 kuvataan ksylanaasia tuottavan geenin valinta ja ksylanaasin tuottaminen geneettisesti modifioidun isäntäorganismin avulla. Esimerkissä 2 kuvataan ksylanaasin tuotto koelaitoksessa ja ksylanaasin puhdistus. Esimerkissä 3 kuvataan ksylanaasin käyttö valkaisun tehostajana paperimassan tuotannon aikana, ja esimerkissä 4 kuvataan ksylanaasin käyttö leivonta-aineena.

Esimerkki 1

Väliaineet

YPD: 10 g hiivauutetta, 20 g peptonia, H_2O 810 ml:aan. Autoklavoitu, lisätty 90 ml 20-% glukoosia (steriilisuodatettu).

10 x perussuola: 66,8 g hiivatyppiperustaa, 100 g meripihkahappoa, 60 g NaOH:ta, H_2O 1000 ml:aan, steriilisuodatettu.

SC-URA: 90 ml 10 x perussuolaa, 22,5 ml 20-% kasaminohappoja, 9 ml 1-% tryptofaania, H_2O:ta 806 ml:aan, autoklavoitu, lisätty 3,6 ml 5-% treoniinia ja 90 ml 20-% glukoosia.

SC-H-agar: 7,5 g/l hiivatyppiperustaa ilman aminohappoja, 11,3 g/l meripihkahappoa, 6,8 g/l NaOH:ta, 5,6 g/l kasaminohappoja ilman vitamiineja, 0,1 g/l tryptofaania ja 20 g/l agaria (Bacto). Autoklavoitu 20 min 121 °C:ssa. Autoklavoinnin jälkeen lisättiin 55 ml 22-% galaktoosiliuosta ja 1,8 ml 5-% treoniiniliuosta/450 agaria.

YNB-1-agar: 3,3 g/l KH_2PO_4, 16,7 g/l agaria, pH-arvo säädetty 7:ään. Autoklavoitu 20 min ajan 121 °C:ssa. Autoklavoinnin jälkeen lisättiin 25 ml 13,6-% hiivatyppiperustaa ilman aminohappoja, 25 ml 40-% glukoosiliuosta, 1,5 ml 1-% L-leusiiniliuosta ja 1,5 ml 1-% histidiiniliuosta/450 ml agaria.

YNB-1-kasvatusliemi: Koostumus kuten YNB-1-agarilla, mutta ilman agaria.

Kauraspelttiksylaanipäällystysgeeli: 1 % agaroosia, 1 % kauraspelttiksylaania (Sigma Chemical Company) Tris-maleiini-

happo-puskurissa, pH 7. Geeli keitettiin ja jäähdytettiin sitten 55 °C:seen ennen päällysteen kaatamista agarlevyille.

FG-4: 35 g/l agaria, 30 g/l soijajauhoa, 15 g/l maltodekstriiniä (Glucidex 6), 5 g/l Bacto-peptonia, pH 7. Autoklavoitu 40 min 121 °C:ssa

FG-4-väliaine: 30 g/l soijajauhoa, 15 g/l maltodekstriiniä (Glucidex 6), 5 g/l Bacto-peptonia. Autoklavoitu 40 min 121 °C:ssa.

Hiivaekspressioplasmidin konstruointi

Kaupallisesti saatava plasmidi pYES II (Invitrogen) katkaistiin SpeI:llä, täytettiin Klenow-DNA-polymeraasilla + dNTP:llä ja katkaistiin ClaI:llä. DNA fraktioitiin koon mukaan agaroosigeelillä, ja puhdistettiin elektroeluoinnilla fragmentti, jonka koko oli noin 2 000 emäsparia. Sama plasmidi katkaistiin ClaI/PvuII:lla, ja puhdistettiin elektroeluoinnilla fragmentti, jonka koko oli noin 3 400 emäsparia. Nämä kaksi fragmenttia liitettiin tylppäpäiseksi tehtyyn SphI/EcoRI-fragmenttiin, joka sisälsi TPI-promoottoriin. Tämä fragmentti eristettiin plasmidista, jossa TPI-promoottoria S. cerevisiae'sta (katso T. Albers ja G. Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982) s. 419-434) oli lievästi modifioitu: sisäinen SphI-kohta poistettiin deletoimalla 4 emäsparia, joka muodosti tämän kohdan ytimen. Lisäksi turhat sekvenssit promoottorista ylävirtaan poistettiin Bal1-eksonukleaasikäsittelyllä, minkä jälkeen lisättiin SphI-linkkeri. Lopuksi lisättiin EcoRI-linkkeri asemaan -10. Näiden modifikaatioiden jälkeen promoottori sisällytetään SphI/EcoRI-fragmentissa. Modifikaatioilla ei vaikuta olevan vaikutusta sen tehokkuuteen alkuperäiseen promoottoriin verrattuna. Tulokseksi saatu plasmidi pYHD17 esitetään kuviossa 1.

Luovuttajaorganismi

H. insolens, DSM 1800, jota on kasvatettu selluloosarikkaassa fermentointiväliaineessa sekoittaen riittävän ilmastuksen varmistamiseksi.

mRNA:n eristäminen

Kokonais-RNA eristettiin noin 7 g:sta myseeliä. Myseeli pakastettiin nestetypessä ja jauhettiin huhmareessa 1 g:n kanssa kvartsihiekkaa jauhokonsistenssiin. RNA uutettiin guanidiniumtiosyanaatilla ja sentrifugoitiin CsCl:n läpi oleellisesti tavalla, joka kuvataan viitteessä Sambrook et al., 1989, edellä. Poly-A-RNA eristettiin kokonais-RNA:sta kromatografoimalla oligo-dT-selluloosalla.

cDNA-synteesi

cDNA-synteesi suoritettiin cDNA-synteesireagenssipakkauksen avulla, joka oli yhtiöstä Invitrogen valmistajan ohjeiden mukaan. DNA sovitettiin ekspressiovektoreihin lisäämällä BstxI-linkkerin (Invitrogen) ja fraktioimalla koon mukaan agaroosigeelillä. Vain DNA:ta, joka oli suurempi kuin 500 - 600 emäsparia, käytettiin kirjastokonstruktiossa. Sovitettu cDNA liitettiin sopivaan hiivaekspressiovektoriin, joka oli katkaistu BstxI:llä. Testiliittämisten jälkeen (kirjaston koon määrittämiseksi) kirjasto levitettiin 50 agarlevylle, joilla oli noin 5 000 transformanttia/levy. Kuhunkin levyyn, joka sisälsi noin 5 000 yksittäistä kloonia, lisättiin 3 ml väliainetta. Bakteerit kaavittiin pois, lisättiin 1 ml glyserolia ja varastoitiin -80 °C:ssa 50 poolina. Loput 2 ml käytettiin DNA:n eristykseen. Jos DNA:n määrä oli riittämätön antamaan riittävän määrän hiivatransformantteja (katso alla), niin valmistettiin DNA:ta suuressa mittakaavassa 500 ml:sta väliainetta (TB), joka oli siirrostettu 50 µl:lla -80 °C:ssa olevaa bakteerikantaa, jota oli kasvatettu yön yli. DNA eristettiin 20 yksittäisestä kloonista kirjastosta ja alistettiin tutkimukselle cDNA-insertion suhteen. Insertiotaajuuden havaittiin olevan >90 %, ja keskimääräinen insertion koko oli noin 1 400 emäsparia.

Hiivan transformointi

Käytetty hiivakanta oli yNG231. (MAT alfa, leu2, ura3-52, his4-539, pep4-delta 1, cir+). Yhtä koloniaa kasvatettiin 30 °C:ssa yön yli 10 ml:ssa YPD:tä. 10, 30 ja 60 µl tätä vil-

jelmää lisättiin 3 ravistelupulloon, jotka sisälsivät 100 ml YPD:tä, ja inkuboitiin ravistellen yön yli 30 °C:ssa. Valittiin viljelmä, jolla oli OD_{600} lähinnä arvoa 0,3-0,4. Solut kerättiin 50-ml putkissa Beckman-sentrifugissa (nopeus 6, 10 min), solut suspendoitiin uudelleen 2 x 5 ml:aan H_2O:ta, sentrifugoitiin edellä kuvatulla tavalla, suspendoitiin uudelleen 5 ml:aan puskuria, jossa oli 0,1 M LiAc, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5, ja sentrifugoitiin jälleen. Solut suspendoitiin uudelleen 500 µl:aan edellä mainittua puskuria, ja inkuboitiin 60 min ajan 30 °C:ssa. Lisättiin 250 µg kantaja-DNA:ta (steriili lohenmaiti-DNA 10 mg/ml, katso alla) ja valmistettiin 100-µl eriä. Transformoitava DNA (noin 5 µg) lisättiin 100-µl erään, sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin 30 min ajan 30 °C:ssa. Lisättiin 700 µl 40-% PEG 4000:ta, 0,1 M LiAc, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5, ja inkubointia jatkettiin 60 min ajan 30 °C:ssa. Transformointiseos alistettiin lämpöshokille 5 min ajaksi 42 °C:ssa, sentrifugoitiin lyhyesti mikrosentrifugissa, suspendoitiin uudelleen 100-200 µl:aan H_2O:ta ja levitettiin SC-levyille ilman urasiilia, minkä jälkeen inkuboitiin 3 päivää 30 °C:ssa.

Kantaja-DNA:n valmistus

Punnittiin 100 mg lohenmaiti-DNA:ta ja liuotettiin yön aikana 10 ml:aan 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5 (TE). Sitten liuosta sonikoitiin muoviastiassa jäävedessä, kunnes se ei enää ollut viskoosia. Sitten liuos uutettiin fenolilla ja saostettiin EtOH:lla, ja pelletti pestiin ja suspendoitiin uudelleen 5 ml:aan TE:tä. Mitattiin OD_{260}, ja suspensio laimennettiin TE:llä 10 mg:aan/ml.

Hiivan seulonta

DNA:ta Humicola-kirjastosta, poolit 1-10, transformoitiin edellä kuvatulla tavalla hiivaan, ja kustakin poolista saatiin levyt, jotka sisälsivät 20 000 - 25 000 koloniaa. Koloniat kaavittiin pois ja varastoitiin glyserolissa -80 °C:ssa.

Hiivasolut kirjastosta levitettiin YNB-agarille yhteensä noin 40 000 koloniaan. Kolonioiden lukumäärä levyä kohden vaihteli

välillä 50-500. 4 tai 5 päivän kasvatuksen jälkeen agarlevyt replikasiirrostettiin sarjalle SC-H-agarlevyjä. Sitten näitä levyjä inkuboitiin 2-4 päivää 30 °C:ssa ennen agarlevyjen päällystämistä kauraspelttiksylaanipäällystysgeeniä ksylanaasin havaitsemista varten. Kun oli inkuboitu yön yli 40 °C:ssa, entsyymireaktiot visualisoitiin kongonpunaisella. 10-15 ml kongonpunaisen 0,1 % liuosta kaadettiin päällysteelle ja poistettiin 10-20 min kuluttua. Sitten levyt pestiin kerran tai kahdesti kaatamalla levyille 10-15 ml 2 M NaCl:ää. NaCl-liuos poistettiin 15-25 min kuluttua. Ksylanaasipositiiviset koloniat tunnistettiin levyjen päällyksillä värittöminä tai vaaleanpunaisina aukeavyöhykkeinä punaista taustaa vasten.

Entsyymipositiivisista kolonioista olevat solut levitettiin yksikoloniaeristystä varten agarille, ja valittiin entsyymiä tuottava yksi ainoa kolonia kustakin tunnistetusta ksylanaasia tuottavasta koloniasta.

Ksylanaasipositiivisten kolonioiden karakterisointi

Kukin 147 ksylanaasia tuottavasta koloniasta eristettiin. Jotkin näistä kolonioista siirrostettiin 20 ml:aan YNB-1-kasvatuslientä 50-ml lasisessa koeputkessa. Putkea ravisteltiin 2 päivää 30 °C:ssa. Solut kerättiin sentrifugoimalla 10 min ajan nopeudella 3 000 r/min.

Solut suspendoitiin uudelleen 1 ml:aan 0,9 M sorbitolia, 0,1 N EDTA, pH 7,5. Pelletti siirrettiin Eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin 30 s ajan täydellä nopeudella. Solut suspendoitiin uudelleen 0,4 ml:aan 0,9 M sorbitolia, 0,1 M EDTA, 14 mM β-merkaptoetanolia. Lisättiin 100 µl 2 mg/ml Zymolase'a, ja suspensiota inkuboitiin 30 min ajan 37 °C:ssa ja sentrifugoitiin 30 min ajan. Pelletti (sferoplastit) suspendoitiin uudelleen 0,4 ml:aan TE:tä. Lisättiin 90 µl seosta (1,5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, 0,6 ml 2 M Tris-Cl pH 8,0, 0,6 ml 10-% SDS), ja suspensiota inkuboitiin 65 °C:ssa 30 min ajan. Lisättiin 80 µl 5 M KOAc, ja suspensiota inkuboitiin jäässä ainakin 60 min ajan ja sentrifugoitiin 15 min ajan täydellä

nopeudella. Supernatantti siirrettiin tuoreeseen putkeen ja täytettiin EtOH:lla (huoneenlämpötila), minkä jälkeen sekoitettiin varovasti läpikotaisin ja sentrifugoitiin 30 s ajan. Pelletti pestiin kylmällä 70-% EtOH:lla, sentrifugoitiin 30 s ajan ja kuivattiin huoneenlämpötilassa. Pelletti suspendoitiin uudelleen 50 µl:aan TE:tä ja sentrifugoitiin 15 min ajan. Supernatantti siirrettiin tuoreeseen putkeen. Lisättiin 2,5 µl 10-mh/ml RNAasia, minkä jälkeen inkuboitiin 37 °C:ssa 30 min ajan ja lisättiin 500 µl isopropanolia varovasti sekoittaen. Seosta sentrifugoitiin 30 s ajan, ja supernatantti poistettiin. Pelletti huuhdottiin kylmällä 96-% EtOH:lla ja kuivattiin huoneenlämpötilassa. DNA liuotettiin 50 µl:aan vettä lopulliseen konsentraatioon noin 100 µl/ml.

DNA transformoitiin E. coliin vakiomenettelytavoilla. Kustakin transformoinnista eristettiin kaksi E. coli-koloniaa ja analysoitiin restriktioentsyymeillä HindIII ja XbaI, jotka katkaisivat DNA-insertion. DNA yhdestä näistä klooneista transformoitiin uudelleen hiivaan ja seulottiin uudelleen entsyymiaktiivisuuden suhteen.

Useiden positiivisten kloonien DNA-sekvenssit määriteltiin osittain. DNA-sekvenssin perusteella 15 kloonia luokiteltiin samaksi perheeksi, tämän ksylanaasiperheen sekvenssillä nähtiin täysi homologia keksinnön mukaisen puhdistetun ksylanaasin aminohapposekvenssin kanssa. Osittainen sekvenssi esitetään patenttivaatimuksessa 1.

E. coli-kanta, joka sisältää ksylanaasin HindIII/XbaI-cDNA-fragmentin pYES2:ssa, talletettiin kansainväliseen talletuslaitokseen DSM 18.03.1992, tulonumerolla DSM 6995. Ksylanaasi-cDNA-fragmentti eristettiin yhdestä klooneista katkaisemalla HindIII/XbaI:llä. HindIII/XbaI-fragmentti puhdistettiin agaroosigeelielektroforeesilla, elektroeluoitiin ja tehtiin valmiiksi liittämisreaktioita varten. cDNA-fragmentti liitetään HindIII/XbaI:llä sulatettuun pHD414:ään (katso alla) pHD450:n muodostamiseksi, jossa cDNA on Aspergillus

oryzae'sta olevan TAKA-promoottorin ja Aspergillus niger'istä olevan AMG-terminaattorin transkriptiokontrollin alainen.

Kun DNA oli monistettu E. coli'ssa, plasmidi transformoitiin Aspergillus oryzae'en seuraavaksi kuvatulla tavalla.

Aspergillus-ekspressiovektorin konstruointi

Vektori pHD414 (kuvio 2) on johdannainen plasmidista p775 (kuvattu julkaisussa EP 238 023). Vastakohtana tälle pHD414:ssä on promoottorin ja terminaattorin välissä ainutlaatuisten restriktiokohtien ketju. Plasmidi konstruoitiin poistamalla noin 200 emäsparia pitkä fragmentti (joka sisältää ei-toivotut RE-kohdat) terminaattorin 3'-päässä, ja poistamalla seuraavaksi noin 250 emäsparia pitkän fragmentin promoottorin 5'-päästä, joka myös sisältää ei-toivottuja kohtia. 200 emäsparin alue poistettiin katkaisemalla NarI:llä (sijaitsee pUC-vektorissa) ja XbaI:ssä (juuri 3'-päähän terminaattorista), täyttämällä muodostuneet päät Klenow-DNA-polymeraasilla + dNTP:llä, puhdistamalla vektorifragmentin geelillä ja liittämällä vektorifragmentti uudelleen. Tämä plasmidi sai nimen pHD413. pHD413 katkaistiin StuI:llä (sijaitsee promoottorin 5'-päässä) ja PvuII:lla (pUC-vektorissa), fraktioitiin geelillä ja liitettiin uudelleen, mistä oli tuloksena pHD414. Kuvio 2 on plasmidin pHD414 kartta, jossa "AMG-terminaattori" ilmaisee A. niger-glukoamylaasiterminaattorin, ja "TAKA-promoottori" ilmaisee A. oryzae-TAKA-amylaasipromoottorin.

Aspergillus oryzaen transformointi

100 ml YPD:tä (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) siirrostetaan A. oryzae-itiöillä tai ja inkuboidaan ravistellen 37 °C:ssa noin 2 päivän ajan. Myseeli kerätään suodattamalla "miracloth"-kankaan läpi ja pestään 200 ml:lla 0,6 M $MgSO_4$. Myseeli suspendoidaan 15 ml:aan 1,2 M $MgSO_4$, 10 mM NaH_2PO_4, pH = 5,8. Suspensio jäähdytetään jäällä, ja lisätään 1 ml puskuria, joka sisältää 120 mg Novozym® 234:ää. 5 min kuluttua lisätään 1 ml 12 mg/ml BSA:ta (sigma tyyppi H25), ja inkubointia

jatketaan varovaisesti sekoittaen 1,5-2,5 tunnin ajan 37 °C:ssa, kunnes suuri joukko protoplasteja on näkyvissä mikroskoopin alla tarkastetussa näytteessä.

Suspensio suodatetaan "miracloth"-kankaan läpi, suodos siirretään steriiliin putkeen ja päällystetään 5 ml:lla 0,6 M sorbitolia, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,0. Sentrifugoidaan 15 min ajan 100 g:llä, ja protoplastit kerätään $MgSO_4$-kerroksen päältä. Protoplastisuspensioon lisätään 2 tilavuutta STC:tä (1,2 M sorbitolia, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5. 10 mM $CaCl_2$), ja seosta sentrifugoidaan 5 min ajan 1 000 g:llä. Protoplastipelletti suspendoidaan uudelleen 3 ml:aan STC:tä ja pelletöidään uudelleen. Tämä toistetaan. Lopulta protoplastit suspendoidaan uudelleen 0,2-1 ml:aan STC:tä.

100 µl protoplastisuspensiota sekoitetaan 5-25 µg:n kanssa sopivaa DNA:ta 10 µl:ssa STC:tä. Protoplastit sekoitetaan p3SR2:n kanssa, plasmidi, joka sisältää A. nidulans'in amdS-geenin). Seos jätetään huoneenlämpötilaan 25 minuutiksi. Lisätään 0,2 ml 60-% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM $CaCl_2$ ja 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5 ja sekoitetaan varovasti (kahdesti) ja lopuksi lisätään 0,85 ml samaa liuosta ja sekoitetaan varovasti. Seos jätetään huoneenlämpötilaan 25 minuutiksi, sentrifugoidaan nopeudella 2 500 r/min 15 min ajan, ja pelletti suspendoidaan uudelleen 2 ml:aan 1,2 M sorbitolia. Vielä yhden sedimentoinnin jälkeen protoplastit levitetään sopiville levyille. Protoplastit levitetään minimaalisille levyille (Cove, katso Biochem. Biopys. Acta 113 (1966) 51-56), jotka sisältävät 1,0 M sakkaroosia, pH = 7,0, 10 mM asetamidia typpilähteenä ja 20 mM CsCl taustakasvun estämiseksi. Kun on inkuboitu 4-7 päivää 37 °C:ssa, itiöt poimitaan ja levitetään yhdestä solusta olevia kolonioita varten. Tämä menettelytapa toistetaan, ja yksittäisen klonian itiöitä toisen uudelleen eristyksen jälkeen varastoidaan määriteltynä transformanttina.

Ksylanaasin ekspressio Aspergillus'issa

11 transformanttia saatiin ja siirrostettiin ja ylläpidettiin YPG-agarilla. Kukin 8 valitusta transformantista siirrostettiin YPG-agarvinopinnoilta 500-ml ravistelupulloon, jossa oli 150 ml FG-4-väliainetta. 4 päivän fermentoinnin jälkeen riittävällä sekoituksella hyvän ilmastuksen varmistamiseksi kasvatusliemiä saentrifugoitiin 10 min ajan 2 000 g:llä, ja supernatantit analysoitiin. Paras tuotti 72 EXU/ml. Transformoimattomasta isäntäkannasta ei ole taustaa. Tätä kantaa kutsutaan nimellä Axy40/8.

Esimerkki 2

Kantaa Axy40/8 fermentoitiin koelaitosmittakaavassa seuraavalla tavalla.

Agarsubstraatti, jolla oli seuraava koostumus, valmistettiin Fernbach-pullossa:

sakkaroosi	30 g/
KH_2PO_4	1 g/l
$NaNO_3$	3 g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g/l
$FeSO_4.7H_2O$	0,01 g/l
KCl	0,5 g/l
agar	25 g/l

pH-arvo säädettiin välille 6,4-6,5, autoklavoitiin 20 min ajan 121 °C:ssa.

Fernbach-pullo siirrostettiin itiösuspensiolla ja kasvatettiin 5 päivää 30 °C:ssa.

Substraatti, jolla oli seuraava koostumus, valmistettiin 500-l siemenfermenttorissa:

Hiivauute, 50-%	6 kg
perunatärkkelys	9 kg
$CaCO_3$	0,15 kg
Pluronic L61	150 ml
Termamyl® 60(L)*)	9 g

*) Termamyl on α-amylaasia yhtiöstä Novo Nordisk A/S
Lisättiin vesijohtovettä kokonaistilavuuteen noin 225 l. pH säädettiin H_3PO_4:llä pH-arvoon noin 6,5.

Lämpötila kohotettiin 60 °C:sta 90 °C:seen 30 minuutissa, pidettiin 30 min ajan 90 °C:ssa, ennen kuin substraattia steriloitiin siemenfermenttorissa 1,5 tunnin ajan 121 °C:ssa. Lopullinen tilavuus ennen siirrostusta oli noin 300 l.

Fernbach-pullon itiösuspensio siirrettiin siemenfermenttoriin. Siemenfermentointiolosuhteet olivat:

Fermenttorityyppi: Tavanomainen ilmastus- ja sekoitusfermenttori, jonka korkeus/halkaisija-suhde oli noin 2,3.

Sekoitus:	250 r/min
Ilmastus:	300 normaalia litraa ilmaa/min
Lämpötila:	34 °C
Aika:	noin 24 tuntia

Noin 35 tuntia siirrostuksen jälkeen 150 l siirrettiin siemenfermenttorista pääfermenttoriin.

Substraatti, jolla oli seuraavanlainen koostumus, valmistettiin 2 500-l pääfermenttorissa:

$MgSO_4.7H_2O$	2,6 kg
KH_2PO_4	2,6 kg
K_2SO_4	3,9 kg
Hivenmetalliliuos	650 ml
Perunatärkkelys	39,0 kg
Hiivauute, 50-%	28,6 kg
Urea	5,2 kg
Sitruunahappo	1,053 kg
Pluronic K61	650 ml
Termamyl® 60 L	39 g

Hivenmetalliliuoksella oli seuraava koostumus:

$ZnSO_4.7H_2O$	14,3 g/l
$CuSO_4.7H_2O$	2,5 g/l
$NiCl_2.6H_2O$	0,5 g/l
$FeSO_4.7H_2O$	13,5 g/l
$MnSO_4.H_2O$	8,5 g/l
Sitruunahappo, monohydraatti	3,0 g/l

Lisättiin vesijohtovettä kokonaistilavuuteen noin 900 l. pH säädettiin H_3PO_4 pH-arvoon 6,5. Lämpötila kohotettiin 60 °C:sta 90 °C:seen 30 minuutissa, pidettiin 30 min ajan 90 °C:ssa. Sitten pH säädettiin pH-arvoon 4,5 ennen kuin substraattia sterilointiin pääfermenttorissa 1,5 tunnin ajan 123 °C:ssa. Lopullinen tilavuus ennen siirrostusta oli noin 1 300 l.

Sitten lisättiin 150 l siemenviljelmää.

Fermentointiolosuhteet olivat:

Fermenttorityyppi: Tavanomainen ilmastus- ja sekoitusfermenttori, jonka korkeus/halkaisija-suhde oli noin 2,7.

Sekoitus:	250 r/min (kaksi turpiinisiipipyörää)
Ilmastus:	1 500 normaalia litraa ilmaa/min, nostaen 1 700 Nl:ään/min kohdalla 130 tuntia.
Lämpötila:	34 °C
Aika:	noin 130 tuntia

25 tunnin kuluttua fementointiin lisättiin aseptisesti maltodekstriiniä pääfermenttoriin nopeudella, joka kasvoin 1 l:sta/tunti 4 l:aan/tunti 12 tunnin aikana. Dekstriiniliuos valmistettiin seuraavalla koostumuksella 550-l siementankissa:

Perunatärkkelys	184 kg
Biotiini	0,04 g
Tiamiini	0,4 g
Sitruunahappo	0,2 kg
Pluronic L61	200 ml
Termamyl® 60L	360 ml

Lisättiin vesijohtovettä kokonaistilavuuteen noin 300 l. Lämpötila pidettiin 90 °C:ssa 60 min ajan ennen kuin substraattia steriloitiin annostelutankissa 1,5 tunnin ajan 123 °C:ssa. Lopullinen tilavuus ennen annostelun aloitusta oli noin 400 l.

25 tunnin fermentoinnin jälkeen pH kontrolloitiin NH_3:lla pH-arvoon 7,3-7,4.

Noin 130 fermentointitunnin jälkeen fermentointiprosessi pysäytettiin. Noin 1850 l kasvatuslientä jäähdytettiin noin 5 °C:seen, ja entsyymit kerättiin talteen seuraavalla menetelmällä.

Kasvatusliemi sentrifugoitiin pH-arvossa 7, ja sentrifugaatti suodatettiin Seitz-suodatinarkilla (tyyppi Supra EKS Neu) käyttäen suodatusapuaineena Hyflo Super-Cell-piimaata. Suodoksen pH-arvo säädettiin 4,7:ään, ja suodos konsentroitiin ultrasuodatusta käyttämällä kuiva-ainepitoisuuteen 5 %. Edelleen konsentrointi kuiva-ainepitoisuuteen 30 % suoritettiin haihduttamalla. Konsentraatin pH-arvo säädettiin 6,5:een, ja konsentraatti suodatettiin kehyssuodattimella käyttäen suodatusapuaineena Hyflo Super-Cell'iä, ja itiösuodatettiin Seitz-suodatusarkilla (tyyppi Supra EKS Neu).

Tämä konsentraatti tunnistetaan myöhemmin tässä selityksessä valmisteena 1. Valmisteen 1 ksylanaasiaktiivisuus on 533 EXU/g.

Valmiste 1 puhdistettiin seuraavalla tavalla.

Yhteensä 200 000 EXU saostettiin 25-%:sella ammoniumsulfaatilla. Sakka liuotettiin 500 ml:aan vettä ja pestiin Amicon-ultrasuodatussolulla membraanilla GR90PP yhtiöstä Dow Danmark A/S. Johtokyky aleni 1,7 mS:ään. Saanto oli 150 000 EXU. Näyte käsiteltiin kationinvaihtokromatografialla 200-ml S-Sepharose "fast flow"-kolonnikromatografialla ja puskurilla, joka sisälsi 20 mM natriumasetaattia, pH 5,0. Ksylanaasi sitoutui kolonniin tässä pH-arvossa. Ksylanaasi eluoitiin käyttämällä lineaarista gradienttia, joka sisälsi 1 M natriumkloridia samassa puskurissa. Yhteensä 75 000 EXU saatiin talteen 160 ml:ssa, E_{280}:llä 4,1, joka vastaa 114 EXU/E_{280}.

Peptidin kartoitusta ja spesifisen aktiivisuuden mittausta ja karakterisointia varten ksylanaasi saadaan suurella puhtaudella lopullisessa puhdistusvaiheessa. Pieni osa ksylanaasista on puhdistettu hyvin puhtaaksi kokokromatografian Superdex 75 avulla. Puhdistetulla ksylanaasilla on yksi ainoa vyöhyke SDS-PAGE:ssa, molekyylipainolla 22 kD, ja Pharmacia IEF-geeleillä suoritetussa isoelektrisessä fokusoinnissa yksi ainoa vyöhyke pI-arvolla 8,2.

Natiivi ja keksinnön mukainen kloonattu ksylanaasi, joka on puhdistettu edellä kuvatulla tavalla, reagoivat samanarvoisesti kanin seerumin kanssa, joka on kohotettu puhdistettua natiivia ksylanaasia vastaan. Raketti-immunoelektroforeesia käytettäessä molemmat entsyymit yhtäsuurella EXU-perustalla aiheuttavat saman immuunisaostuman.

EXU-menetelmää käytettäessä puhdistetun ksylanaasin aktiivisuus värillisellä ksylaanilla on 130 EXU/E_{280} tai 450 EXU/mg proteiinia. Ekstinktiokerroin on 3,5 E_{280}.

Esimerkki 3

Tässä esimerkissä on verrattu tekniikan tason B. pumilus-ksylanaasia keksinnön mukaisen ksylanaasin kanssa. Vertailuun käytettiin esimerkissä 2 kuvattua valmistetta 1. Havupuulla nähtiin, että keksinnön mukainen ksylanaasi tuotti merkittävästi paremman valkaisuntehostusvaikutuksen.

Keksinnön mukainen ksylanaasi: H. insolens-ksylanaasi, nestemäinen valmiste, 533 EXU/g
Tekniikan tason ksylanaasi B. pumilus-ksylanaasi, nestemäinen valmiste, 1070 EXU/g

Massa
Valkaisematon havupuu ruotsalaisesta paperitehtaasta. Massa oli pesty, kuivattu ilmassa ja varastoitiin <5 °C:ssa viileässä huoneessa.

Massaa liotettiin > 12 tunnin ajan vedessä, minkä jälkeen se kuidutettiin laboratoriokuiduttimessa tasolla 1 % DS, 10 000 kierrosta.

Taulukko 1
Varastoinnin jälkeen mitatut massan tiedot

Mitatut massan tiedot	Havupuu
Kappaluku	25,8
pH	7,35
Kuiva-ainepitoisuus (%)	97,0
ISO-vaaleus (%)	28,3

Suoritettiin kaksi valkaisukoetta, jotka molemmat koostuivat seuraavista kahdesta vaiheesta:
1) Entsyymikäsittely
2) (D50C50)E-ligniininpoisto

Laboratoriovalkaisuolosuhteet
Entsyymi
50 °C, pH 8,0 (Britton-Robinson-puskuri). Käsittelyaika ja annostelu kuvataan myöhemmin otsikolla "Entsyymikäsittely".

(D50C50)
45 min, 40 °C, 5 % DS, lopullinen pH-arvo: 1,9-2,9.
aCL-multippelit: 0,15, 0,19, 0,23, 0,27

E
60 min, 60 °C, 12 % DS, lopullinen pH-arvo: 10,6-12,2.

NaOH-annostelu lasketaan delignifiointivaiheeseen lisätyistä kloorikemikaaleista kaavalla

[0,5 . /kg Cl_2/1 000 kg + ClO_2/1 000 kg + 3] kg/1 000 kg

Valkaisuvaiheet suoritettiin muovipusseissa, joita kuumennettiin vesihauteissa. Pusseja vaivattiin käsin säännöllisin aikavälein.

Entsyymikäsittely
Kaksi massanäytettä käsiteltiin samassa entsyymivaiheessa: toinen keksinnön mukaisella ksylanaasilla, ja toinen tekniikan tason ksylanaasilla. Käsittelyaika oli 3 tuntia, ja annostelu oli 1 000 EXU/kg. Jälkeen päin massa pestiin läpikotaisin kylmällä vedellä. Kolmas näyte - kontrolli - sai saman kohtelun, mutta ilman entsyymilisäystä.

Tässä kokeessa nähdään näiden kahden entsyymin välillä merkittävä ero.

Taulukossa 2 esitetään kappaluvut ja entsyymikäsittelyn jälkeen mitatut absorbanssit.

Taulukko 2

Entsyymivaiheen jälkeen mitatut arvot

	Kontrolli	Keksinnön mukainen ksylanaasi	Tekniikan tason ksylanaasi
Kappaluku	24,3	23,0	23,7
Abs. 280 nm	0,31	1,36	1,32

(D50C50)E-ligniininpoisto

Kolmesta näytteestä kustakin ligniininpoistokäsiteltiin eri aktiivisen kloorin annosteluilla neljä osaa, joista kussakin oli noin 17 g massaa. Jälkeen päin mitattiin kappaluvut ja ISO-vaaleusarvot. Tulokset esitetään taulukossa 3.

Taulukosta 3 ilmenee, että keksinnön mukainen H. insolens-ksylanaasi aikaansaa merkittävästi alhaisemman kappaluvun ja paremman vaaleuden kuin tekniikan tason ksylanaasi. Vaikka taulukosta 3 ilmenee, että kappaluku suhteessa keksinnön mukaiseen ksylanaasiin on vain hieman pienempi kuin kappaluku suhteessa tekniikan tason ksylanaasilla, tämä vähäinen erotus vastaa paljon suurempaa ja merkittävää käytetyn aktiivisen kloorin säästöä.

Taulukko 3
Kappaluvut ja vaaleus massan enz(D50C50)E-ligniininpoiston jälkeen

aCL-multippeli*		0,15	0,19	0,23	0,27
kg aCl/1 000 kg		36,5	46,2	56,0	65,7
Kontrolli	Kappaluku	8,48	6,33	4,55	3,89
	% ISO	36,1	40,8	45,0	47,5
Keksinnön mukainen ksylanaasi	Kappaluku	7,22	4,92	3,88	3,03
	% ISO	39,1	44,0	47,9	51,5
Tekniikan tason ksylanaasi	Kappaluku	7,54	5,66	4,07	3,28
	% ISO	38,7	42,0	46,5	51,1

* Multippeli kontrollin kappaluvulla

Tässä kokeessa käytetylle massalle voidaan vetää johtopäätös, että keksinnön mukainen ksylanaasi aikaansaa suuremman valkaisuntehostusvaikutuksen kuin tekniikan tason ksylanaasi.

Esimerkki 4
Tässä esimerkissä kuvataan keksinnön mukaisen ksylanaasin käyttö leivonta-aineena.

Ksylanaasia (leipomoteollisuudessa käytetään tavallisesti nimeä pentosanaasi) käytetään vehnäleivän leivonta-aineena useisiin tarkoituksiin:

- taikinan kehittäminen
- taikinan elastisuuden ja stabiilisuuden parantaminen
- leivän tilavuuden lisääminen
- leivän sisuksen rakenteen parantaminen
- homehtumisenesto

Valmiste 1 on testattu vehnäleivässä, ja sillä on erittäin hyvä vaikutus leivän laatuun. Tällä entsyymillä on riittävä taikinaa pehmittävä vaikutus. Kun lisätään 43-150 FXU valmistetta 1, sämpylöiden tilavuus kasvaa 5-20 %:lla ja rakenne on pehmeämpi kuin leivällä, jossa ei ole entsyymiä. Sillä on parempi vaikutus kaupallisiin tuotteisiin verrattuna. Ksylanaasin aktiivisuusyksikkö XFU määritellään julkaisussa AF 293.6.

Tekniikan tason ksylanaasileivonta-aine käsittää useita entsymaattisia aktiivisuuksia, kun taas keksinnön mukaista leivonta-ainetta voidaan tuottaa helposti hyvin alhaisella entsyymiaktiivisuuksien pitoisuudella, muiden kuin ksylanaasiaktiivisuuden. Siten keksinnön mukaista leivonta-ainetta käyttämällä voidaan saada leipomotuotteita, joilla on vakiommat ominaispiirteet leivontaoperaatiosta seuraavaan leivontaoperaatioon.

Resepti ja leivontaprosessi

Perusresepti tässä esimerkissä on:

- vehnäjauhot 1 000 g
- suola 16 g
- sokeri 16 g
- hiiva 50 g
- vesi 590 g
- entsyymi

Valmistusaineet sekoitettiin spiraalitaikinanvaivauskoneella. Sitten taikinaa vaivattiin alhaisella nopeudella 2 min ajan, ja 5 min ajan suurella nopeudella. Taikinan lämpötila oli noin 26-28 °C. 10 min levossa olon jälkeen taikina jaettiin ja muodostettiin 30 sämpyläksi ja yhdeksi limpuksi. 45 min nostatusajan jälkeen sämpylöillä ja 40 min nostatusajan jälkeen limpulla 33 °C:ssa, 80-% RH, sämpylät ja limppu paistettiin 220 °C:ssa 15 min ja 30 min ajan, vastaavasti.

Tulokset

	FXU/kg jauhoa	Taikinan kehitty-minen	Tilavuus - sämpylät indeksi	Tilavuus - limppu indeksi	Leivän sisuksen rakenne	Pehmeys	
Vertailu	0	+	100	100	+	100	100
Valmiste 1	43 130	++ ++	106 115	105 106	++ +	87 85	66 69
Valmiste 1 ilman amylaasiaktiivisuutta	75 151	++ ++	108 116	103 104	++ +(+)	79 94	88 83
Pentopan	122 427	++ ++	108 111	101 105	++ +	82 96	94 82

Valmisteessa 1 ilman amylaasiaktiivisuutta isäntäorganismin tuottama amylaasiaktiivisuus erotetaan ksylanaasista tavanomaisten kromatografisten tekniikkojen avulla.

Sämpylä- ja limpputilavuudet mitataan perinteistä rapsinsiemenmenetelmää käyttämällä. Mitatut arvot lasketaan sitten uudelleen suhteelliseksi indeksiksi.

Leivän sisuksen pehmeys mitataan SMS-rakenteenanalysointilaitteella. Työntötanko, jonka halkaisija on 25 mm, painetaan 11 mm paksun leivän keskikohtaan, rekisteröidään voima, joka tarvitaan, jotta työntövarsi puristaisi leivän sisusta 3 mm nopeudella 3,3 mm/s, ja ilmaistaan leivän pehmeytenä. Sitten arvo lasketaan uudelleen suhteelliseksi indeksiksi suhteessa vertailunäytteeseen, jolla on määritelmän mukaan indeksi 100. Mitä alhaisempi leivän sisuksen pehmeyden indeksi on, sitä pehmeämpi leivän sisus on.

Taikinan kehittymisen ja leivän sisuksen rakenteen ominaispiirteet esitetään näköhavainnon mukaan: + tarkoittaa, että taikina on normaalia, ja että leivän sisus on myös normaalia karkealla rakenteella, ja ++ tarkoittaa, että taikina on pehmeämpää kuin vertailu, ja joustavampaa, ja että leivän sisuksen rakenne on tasaisempi ja silkkimäinen.

Pentopan™, kaupallinen valmiste, joka on saatavissa yhtiöstä Novo Nordisk A/S, on tekniikan leivonta-aine, joka sisältää eri ksylanaaseja H. insolens'ista ja jossa on myös muita H. insolens-entsyymiaktiivisuuksia. Edellä olevasta ilmenee, että keksinnön mukaisella ksylanaasilla on parempi suorituskyky kuin tekniikan tason leivonta-aineella, koska se antaa suuremman tilavuuden ja leivän pehmeämmän sisuksen. Tärkein leivontaetu suhteessa keksinnön mukaiseen ksylanaasiin, verrattuna tekniikan tason ksylanaasiin, on se seikka, että keksinnön mukaista ksylanaasia voidaan käyttää leivonta-aineena, jolla ei ole käytännössä lainkaan sivuaktiivisuuksia, ja voi siten luoda leipää, jolla on hyvin tasaiset ominaisuudet erästä toiseen.

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISTÄ TIETOA:

(i) HAKIJA: NOVO NORDISK A/S

(ii) KEKSINNÖN NIMITYYS: KSYLANAASI, VASTAAVA YHDISTELMÄ-DNA-SEKVENSSI, KSYLANAASIA SISÄLTÄVÄ AINE JA AINEEN KÄYTTÖ

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 7

(iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:

(A) VASTAANOTTAJA: NOVO NORDISK A/S

(B) KATU: Novo Allé

(C) KAUPUNKI: DK-2880 Bagsvaerd

(E) MAA: Denmark

(v) TIETOKONEELLA LUETTAVISSA OLEVA MUOTO:

(A) VÄLINEEN TYYPPI: disketti

(B) TIETOKONE: IBM-yhteensopiva

(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS

(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Versio #1.25

(viii) ASIAMIEHEN/EDUSTAJAN TIEDOT:

(A) NINI: BACH, Niels et al.

(B) REKISTERÖINTINUMERO: GA 24307

(C) VIITE/ASIAREKISTERINUMERO: 3588.204-WO

(ix) ASIAMIEHEN/EDUSTAJAN TELELIIKENNETIEDOT:

(A) PUHELIN: +45 4444 8888

(B) TELEFAX: +45 4449 3256

(C) TELEX: 37304

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:

(A) PITUUS: 21 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:

(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSM 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 1:

Thr Asn Thr Gly Asn Phe Val Gly Gly Lys Trp Asn Pro Gly Thr Gly
1 5 10 15

Arg Thr Lys Asn Tyr
20

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 2 TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:
(A) PITUUS: 9 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSM 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 2:

Thr Ala Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
1 5

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 3 TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSM 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 3:

Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Gly Gln Val Gln Tyr
1 5 10

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 4 TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:
(A) PITUUS: 24 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSM 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 4:

Val Ser Thr Arg Tyr Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Thr Arg Thr Phe
1 5 10 15

Gln Gln Tyr Trp Ser Ile Arg Lys
20

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 5 TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:
(A) PITUUS: 29 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSN 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 5:

Tyr Val Ile Glu Ser Tyr Gly Thr Tyr Asn Pro Gly Ser Gln Ala Gln
1 5 10 15

Tyr Lys Gly Thr Phe Tyr Thr Asp Gly Asp Gln Tyr Asp
20 25

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 6 TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:
(A) PITUUS: 15 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo, N-terminaalinen
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi
(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSM 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 6:

Gln Val Thr Pro Asn Ala Glu Gly Trp His Asn Gly Tyr Phe Tyr
1 5 10 15

(2) SEKVENSSIN ID.NRO 7 TIEDOT:
(i) SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:
(A) PITUUS: 516 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: rDNA
(vi) ALKUPERÄINEN LÄHDE:
(A) ORGANISMI: Humicola insolens
(B) KANTA: DSM 1800

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID.NRO 7:

ATGGTCTCGC TCAAGTCTGT CCTCGCGGCC GCCACGGCTG TGAGCTCTGC CATTGCTGCC 60

CCTTTTGACT TCGTTCCTCG GGACAACTCG ACGGCCCTTC AGGCTCGCCA GGTGACCCCC 120

AACGCCGAGG GCTGGCACAA CGGCTACTTC TACTCGTGGT GGTCCGACGG CGGAGGCCAG 180

GTTCAGTACA CCAACCTCGA GGGCAGCCGC TACCAGGTCA GATGGNNNAA CACCGGCAAC 240

TTCGTCGGTG GTAAGGGTTG GAACCCGGGA ACCGGCCCCA CGATCAACTA CGGCGGCTAC 300

TTCAACCCCC AGGGCAACGG CTACCTGGCC GTCTACGGCT GGACCNNNAA CCCGCTCGTC 360

GAGTACTATG TCATCGAGTC GTACGGCACG TACAATCCCG GCAGCCAGGC TCAGTACAAG 420

GGCACATTCT ATACCGACGG CGATCAGTAT GACATCTTTG TGAGCACCCG TNNNAACCAG 480

CCCAGCATCA CGGCACCCGG ACGTCCAGCT AGTACT 516

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 18, line 4 of the description [1]

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT [2]

Further deposits are identified on an additional sheet ☐ [3]

Name of depositary institution [4]

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELL-KULTUREN GmbH

Address of depositary institution (including postal code and country) [5]

Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, Federal Republic of Germany

Date of deposit [6]	Accession Number [7]
18 March 1992	DSM 6995

B. ADDITIONAL INDICATIONS [8] (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet ☐

In respect of those designations in which a European and/or Australian patent is sought, during the pendency of the patent application a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC / Regulation 3.25 of Australia Statutory Rules 1991 No 71).

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE [9] (if the indications are not for all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS [10] (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later [11] (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

E. ☑ This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)

Anne Rylling
(Authorized Officer)

☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau [12]

was

(Authorized Officer)

Form PCT/RO/134 (January 1981)

Patenttivaatimukset

1. Rekombinanttinen DNA-sekvenssi, joka koodaa ksylanaasia, joka kykenee hybridisoitumaan seuraavaan osittaiseen DNA-sekvenssiin

ATG GTC TCG CTC AAG TCT GTC CTC GCG GCC GCC ACG GCT GTG AGC
TCT GCC ATT GCT GCC CCT TTT GAC TTC GTT CCT CGG GAC AAC TCG
ACG GCC CTT CAG GCT CGC CAG GTG ACC CCC AAC GCC GAG GGC TGG
CAC AAC GGC TAC TTC TAC TCG TGG TGG TCC GAC GGC GGA GGC CAG
GTT CAG TAC ACC AAC CTC GAG GGC AGC CGC TAC CAG GTC AGA TGG
NNN AAC ACC GGC AAC TTC GTC GGT GGT AAG GGT TGG AAC CCG GGA
ACC GGC CCC ACG ATC AAC TAC GGC GGC TAC TTC AAC CCC CAG GGC
AAC GGC TAC CTG GCC GTC TAC GGC TGG ACC NNN AAC CCG CTC GTC
GAG TAC TAT GTC ATC GAG TCG TAC GGC ACG TAC AAT CCC GGC AGC
CAG GCT CAG TAC AAG GGC ACA TTC TAT ACC GAC GGC GAT CAG TAT
GAC ATC TTT GTG AGC ACC CGT NNN AAC CAG CCC AGC ATC ACG GCA
CCC GGA CGT CCA GCT AGT ACT (SEKVENSSI ID. NRO 7)

suhteellisen ankarissa olosuhteissa (1,0 x SSC, 0,1 % SDS, 65 °C).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen rekombinanttinen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se on johdettu Humicola insolens DSM 1800 -ksylanaasin Hind III / Xba I DNA -fragmentista.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen rekombinanttinen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se koodaa ksylanaasia, jolla on osittaiset aminohapposekvenssit SEKVENSSI ID. NRO 1-6.

4. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen 1-3 mukainen rekombinanttinen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se koodaa ksylanaasia, jonka isoelektrinen piste on 7,5-9,5, edullisesti 8,0-8,5, tai pH-optimi on 5,5-7,5.

5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen 1-4 mukainen rekombinanttinen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se koodaa

ksylanaasia, jolla on spesifinen aktiivisuus yli 330 EXU/mg proteiinia, edullisesti yli 400 EXU/mg, proteiinia.

6. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen 1-5 mukainen rekombinanttinen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se edelleen käsittää promoottorin, koodausalueen signaalipeptidille ja transkriptionaalisen terminaattorin.

7. Vektori, **tunnettu** siitä, että siinä on jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen rekombinanttinen DNA-sekvenssi.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että promoottori on Aspergillus oryzae-taka-amylaasipromoottori ja/tai terminaattori on Aspergillus oryzae AMG-terminaattori.

9. Transformoitu isäntä, joka ei ole ihminen, **tunnettu** siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukaisen vektorin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen transformoitu isäntä, **tunnettu** siitä, että transformoitu isäntä on Aspergillus-kanta.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen transformoitu isäntä, **tunnettu** siitä, että transformoitu isäntä on kanta, joka kuuluu Aspergillus aculeatus-, Aspergillus niger-, Aspergillus oryzae- tai Aspergillus awamori -lajiin.

12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen transformoitu isäntä, **tunnettu** siitä, että transformoitu isäntä on mikro-organismi, joka transformoimattomassa tilassaan ei tuota ksylanaasia tai tuottaa vain merkityksettömiä ksylanaasimääriä, edullisesti Bacillus sp., E. coli tai S. cerevisiae.

13. Menetelmä ksylanaasin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että viljellään jonkin patenttivaatimuksen 9-12 mukaista

transformoitua isäntäsolua ja otetaan talteen tuotettu ksylanaasi saadusta viljelyalustasta.

14. Ksylanaasi, **tunnettu** siitä, että sitä koodaa jonkin patenttivaatimuksen 1-6 mukainen DNA-sekvenssi.

15. Aine, **tunnettu** siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 14 mukaista tai patenttivaatimuksen 13 mukaisella menetelmällä tuotettua ksylanaasia, edullisesti pölyämättömän granulaatin, stabiloidun nesteen tai suojatun entsyymin muodossa, jolloin ksylanaasi käsittää ainakin 10 %, edullisesti ainakin 30 % koko entsyymiproteiinista.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen aine, **tunnettu** siitä, että ksylanaasiaktiivisuuden ja sellulaasiaktiivisuuden suhde, yksikössä EXU/g olevan ksylanaasiaktiivisuuden ja yksikössä ECU/g olevan sellulaasiaktiivisuuden välisenä suhteena ilmaistuna, on yli 10, edullisesti yli 30, edullisimmin yli 100.

17. Patenttivaatimusten 15 tai 16 mukainen aine, **tunnettu** siitä, että se sisältää ksylanaasiaktiivisuuden ainakin 10 EXU/mg entsyymiproteiinia, edullisesti ainakin 100 EXU/mg entsyymiproteiinia, edullisemmin ainakin 300 EXU/mg entsyymiproteiinia.

18. Leivonta-aine, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 14 mukaista tai patenttivaatimuksen 13 mukaisella menetelmällä tuotettua ksylanaasia.

19. Jonkin patenttivaatimuksen 15-17 mukaisen aineen käyttö, **tunnettu** siitä, että ainetta käytetään ksylaanin hajotukseen.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että käyttö liittyy kemialliseen massaan tai kierrätyspaperiin ennen valkaisua tai sen osana, edullisesti pH-arvossa yli 7.

21. Jonkin patenttivaatimuksen 15-18 mukaisen aineen käyttö, **tunnettu** siitä, että ainetta käytetään ksylaanin hajottamiseen liittyen vehnäjauhoja sisältävän leivän tuotantoon.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että käyttö liittyy eläinrehuun.

Patentkrav

1. Rekombinant DNA-sekvens, som kodar xylanas, vilken förmår hybridiseras med följande partiella DNA-sekvens

ATG GTC TCG CTC AAG TCT GTC CTC GCG GCC GCC ACG GCT GTG AGC
TCT GCC ATT GCT GCC CCT TTT GAC TTC GTT CCT CGG GAC AAC TCG
ACG GCC CTT CAG GCT CGC CAG GTG ACC CCC AAC GCC GAG GGC TGG
CAC AAC GGC TAC TTC TAC TCG TGG TGG TCC GAC GGC GGA GGC CAG
GTT CAG TAC ACC AAC CTC GAG GGC AGC CGC TAC CAG GTC AGA TGG
NNN AAC ACC GGC AAC TTC GTC GGT GGT AAG GGT TGG AAC CCG GGA
ACC GGC CCC ACG ATC AAC TAC GGC GGC TAC TTC AAC CCC CAG GGC
AAC GGC TAC CTG GCC GTC TAC GGC TGG ACC NNN AAC CCG CTC GTC
GAG TAC TAT GTC ATC GAG TCG TAC GGC ACG TAC AAT CCC GGC AGC
CAG GCT CAG TAC AAG GGC ACA TTC TAT ACC GAC GGC GAT CAG TAT
GAC ATC TTT GTG AGC ACC CGT NNN AAC CAG CCC AGC ATC ACG GCA
CCC GGA CGT CCA GCT AGT ACT (SEKVENS ID. NR 7)

under relativt kärva förhållanden (1,0 x SSC, 0,1 % SDS, 65 °C).

2. Rekombinant DNA-sekvens enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att den är härledd ur ett Humicola insolens DSM 1800 - xylanas Hind III / Xba I DNA -fragment.

3. Rekombinant DNA-sekvens enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att den kodar xylanas, innefattande de partiella aminosyrasekvenserna SEKVENS ID. NR 1-6.

4. Rekombinant DNA-sekvens enligt något av föregående patentkrav 1-3, **kännetecknad** av att den kodar xylanas, vars

isoelektriska punkt är 7,5-9,5, företrädesvis 8,0-8,5, eller pH-optimum 5,5-7,5.

5. Rekombinant DNA-sekvens enligt något av föregående patentkrav 1-4, **kännetecknad** av att den kodar xylanas med en specifik aktivitet med över 330 EXU/mg protein, företrädesvis över 400 EXU/mg protein.

6. Rekombinant DNA-sekvens enligt något av föregående patentkrav 1-5, **kännetecknad** av att den vidare innefattar en promotor, ett kodningsområde för signalpeptid och en transkriptionsterminator.

7. Vektor, **kännetecknad** av att den innefattar en rekombinant DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1-6.

8. Vektor enligt patentkrav 7, **kännetecknad** av att promotorn är en Aspergillus oryzae-taka-amylaspromotor och/eller terminatorn är en Aspergillus oryzae AMG-terminator.

9. Transformerad värd, som inte är en människa, **kännetecknad** av att den innehåller en vektor enligt patentkrav 7 eller 8.

10. Transformerad värd enligt patentkrav 9, **kännetecknad** av att den transformerade värden är en Aspergillus-stam.

11. Transformerad värd enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att den transformerade värden är en stam som tillhör arten Aspergillus aculeatus, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae eller Aspergillus awamori.

12. Transformerad värd enligt patentkrav 9, **kännetecknad** av att den transformerade värden är en mikroorganism, som i otransformerat tillstånd inte producerar xylanas eller producerar endast obetydliga xylanasmängder, företrädesvis Bacillus sp., E. coli eller S. cerevisiae.

13. Förfarande för att framställa xylanas, **kännetecknat** av att man odlar en transformerad värdcell enligt något av patentkraven 9-12 och det framställda xylanaset tas till vara från det erhållna odlingsunderlaget.

14. Xylanas, **kännetecknat** av att det kodas av en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1-6.

15. Ämne, **kännetecknat** av att det innehåller xylanas framställt enligt ett förfarande enligt patentkrav 14 eller patentkrav 13, företrädesvis i form av odammat granulat, stabiliserad vätska eller ett skyddat enzym, varvid xylanasen innefattar åtminstone 10 %, företrädesvis åtminstone 30 % av hela enzymproteinet.

16. Ämne enligt patentkrav 15, **kännetecknat** av att förhållandet mellan xylanasaktivitet och cellulasaktivitet, uttryckt som förhållandet mellan xylanasaktivitet i enhet EXU/g och cellulasaktivitet i enhet ECU/g, är över 10, företrädesvis över 30, helst över 100.

17. Ämne enligt patentkrav 15 eller 16, **kännetecknat** av att det har en xylanasaktivitet med åtminstone 10 EXU/mg enzymprotein, företrädesvis åtminstone 100 EXU/mg enzymprotein, helst åtminstone 300 EXU/mg enzymprotein.

18. Bakmedel, **kännetecknat** av att det innefattar xylanas enligt patentkrav 14 eller xylanas framställt med ett förfarande enligt patentkrav 13.

19. Användning av ett medel enligt något av patentkraven 15-17, **kännetecknad** av att medlet används för nedbrytning av xylan.

20. Användning enligt patentkrav 19, **kännetecknad** av att användningen ansluts till en kemisk massa eller återvinningspapper före blekning eller som en del av den, företrädesvis vid ett pH-värde som överstiger 7.

21. Användning av ett ämne enligt något av patentkraven 15-18, **kännetecknad** av att ämnet används vid produktion av bröd som innehåller vetemjöl till nedbrytning av xylan.

22. Användning enligt patentkrav 19, **kännetecknad** av att användningen ansluter sig till djurfoder.