



SUOMI – FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN



FI000120697B

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 120697 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

29.01.2010

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

C12N 9/24 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

20022120

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag

02.12.2002

(24) Alkupaivä - Löpdag

31.05.2001

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

29.01.2003

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/CA2001/000769

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

31.05.2000 US 213803 P

(73) Haltija - Innehavare

1 • National Research Council of Canada, Intellectual Property Office, Building M-58, EG-10, 1200 Montreal Road, Ottawa, Ontario K1J 6A4, KANADA, (CA)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Sung, Wing L., Gloucester, Ontario K1J 6A4, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Kohonneen termofiilisyyden ja alkalofiilisyyden sisältävät modifioidut ryhmä 11 -ksylanaasit

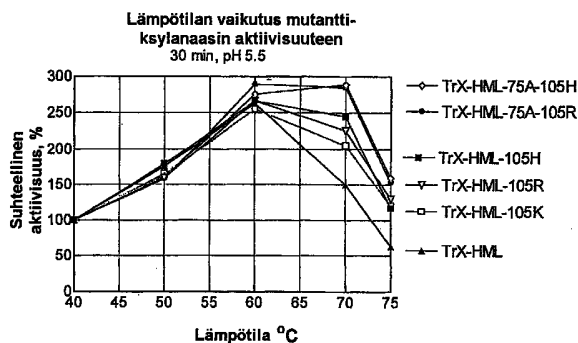
Modifierade grupp 11 -xylanaser uppvisande förhöjd termofilicitet och alkalofilicitet

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 5866408 A, US 5916795 A, WO 94/24270 A2, WO 00/29587 A1, Törrönen, A. et al. Journal of Biotechnology. 1997, vol. 57, nro 1-3, p. 137-149, Törrönen, A. et al. Embo. 1994, vol. 13, nro 11, p. 2493-2501, Proteins: Structure, Function, and Genetics. June 1, 1998, nro 4, p. 434-444, Biochemistry. 1995, vol. 34, nro 3, p. 847-856, Protein Science. March 2000, vol. 9, nro 3, p. 466-475: Abstract Biosis AN: PREV200000233478, Biochemistry. Sept. 29 1998, vol. 37, nro 39, p. 13475-13485

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esillä oleva keksintö koskee modifioituja ksylanaasientsyymejä, joilla on kohennut termotabiilius ja alkalofiilisyyttä verrattaessa niitä niiden natiiveihin vastineisiin. Tässä on kuvattu useita modifioituja ksylanaaseja, joilla on sellaiset ominaisuudet, sisältäen ksylanaasit, joissa on ainakin yksi modifikaatio aminohappokohdassa 10, 27, 29, 75, 104, 105, 125, 129, 132, 135, 144, 157, 161, 162, 165 tai niiden yhdistelmä. Esillä oleva keksintö sisältää myös modifioidun ksylanaasin, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen ja jota voidaan luonnehtia sillä, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C, jossa modifioitu ksylanaasi on ryhmä 11 -ksylanaasi, joka saadaan *Trichoderma* sp:stä. Esillä oleva keksintö sisältää myös *Trichoderma* sp:stä saadun modifioidun ryhmä 11 -ksylanaasin, jolle on ominaista, että sen maksimitehokkuuden pH (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. On myös kuvattu modifioidut ksylanaasit, joille on ominaista, että niiden MET on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C, ja MEP on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6.



Föreliggande uppfinning avser modifierade xylanasenzymer vilka uppvisar förhöjd termostabilitet och alkalofilitet vid jämförelse med nativa motsvarigheter. Här beskrivs flera modifierade xylanaser vilka har dessa egenskaper, inklusive xylanaser med åtminstone en modifiering vid aminosyraposition 10, 27, 29, 75, 104, 105, 125, 129, 132, 135, 144, 157, 161, 162, 165 eller kombinationer av dessa. Föreliggande uppfinning innefattar även ett modifierat xylanas som har åtminstone en substituerad aminosyrarest och som karaktäriseras av att den har en maximal effektiv temperatur (MET) mellan ca 69 °C och ca 78 °C, och i vilket det modifierade xylanaset är ett xylanas i familj 11 som erhållits ur en *Trichoderma* sp. Föreliggande uppfinning avser även ett modifierat i familj 11 ingående xylanas som erhållits ur en *Trichoderma* sp. och som karaktäriseras av att den har ett maximalt effektivt pH (MEP) mellan ca 5,8 och ca 7,6. Modifierade xylanaser vilka kan karaktäriseras av att de har ett MET mellan ca 69 °C och ca 78 °C och ett MEP mellan ca 5,8 och ca 7,6 beskrivs även.

Kohonneen termofiilisyyden ja alkalofiilisyyden sisältävät modifioidut ryhmä 11 -ksylanaasit – Modifierade grupp 11 -xylanaser uppvisande förhöjd termofilicitet och alkalofilicitet

- 5 Esillä oleva keksintö koskee modifioituja ksylanaaseja. Erikoisemmin keksintö koskee modifioituja ksylanaaseja, joiden suorituskyky on parantunut korkeassa lämpötilassa ja pH:ssa.

Keksinnön tausta

- 10 Ksylanaasit ovat ryhmä entsyymejä, joilla on laajaa kaupallista käyttöä. Ksylanaasi-
en pääasiallinen sovellus on sellun biovalkaisu paperin tuotossa. Lisäksi ksylanaase-
ja on käytetty kirkastusaineina mehuissa ja viineissä, entsyymaattisina aineina tark-
kuuslaitteiden ja puolijohteiden puhdistuksessa (esim. US-patentti nro 5 078 802) ja
niitä käytetään myös siipikarjan ja sian rehun sulamisen parantamiseksi.

- 15 Valmistettaessa sellua paperin tuottoa varten kuitumateriaali altistetaan korkeille
lämpötiloille ja paineille kemikaalien läsnä ollessa. Tämä käsittely muuttaa kuidut
selluksi ja se tunnetaan nimellä kuidutus. Kuidutuksen jälkeen sellu valkaistaan.
Ksylanaasientsyymejä käytetään sellun valkaisun tehostamiseksi. Ksylanaasikäsitte-
ly sallii sen, että seuraavaksi käytettävät valkaisukemikaalit, kuten kloori, klooridi-
oksidi, vetyperoksidi tai näiden kemikaalien yhdistelmät, valkaisevat sellua tehok-
20 kaammin. Sellun esikäsitteily ksylanaasilla parantaa lopullisen paperituotteen val-
koisuutta ja laatua ja vähentää sitä kloorikemikaalien määrää, jota käytetään sellun
valkaisuun. Tämä puolestaan alentaa sellaisissa prosesseissa tuotetun kloorijäte-
veden määrää.

- 25 Tärkein selluntuottoprosessi on sulfaattiselluloosan tuotto. Sulfaattiselluloosan ta-
pauksessa kuidutuksen jälkeen ja ennen sellun käsittelyä ksylanaasilla sellun lämpö-
tila on noin 55 – 70 °C ja sen pH on erittäin emäksinen (esim. Nissen et al., 1992).
Huono puoli monilla kaupallisesti saatavilla villityypin ksylanaaseilla on se, että
näillä entsyymeillä on hapan pH-optimi ja lämpötilaoptimi on noin 55 °C. Jotta ksy-
lanaaseja voidaan käyttää tehokkaasti hyväksi valkaisu-sovelluksissa, täytyy sellu
30 sen vuoksi tehdä happamaksi sellaiseen pH-arvoon, joka on suunnilleen käytetyn
spesifisen ksylanaasin optimaalinen pH. Lisäksi kuuma sellu täytyy jäähdyttää läm-
pötilaan, joka on lähellä valitun ksylanaasin entsyymaattisen aktiivisuuden optimi-
lämpötilaa. Sellun lämpötilojen alentaminen ksylanaasikäsitteilyä varten alentaa seu-
raavan kemiallisen valkaisun tehokkuutta. Sellun happamoittaminen vaatii suurten

happomäärien käyttöä. Lisäksi, happojen lisäys johtaa korroosioon, joka vähentää prosessilaitteiston elinikää. Näin ollen ksylanaasit, jotka ovat optimaalisesti aktiivisia sellaisissa lämpötiloissa ja pH-olosuhteissa, jotka ovat suunnilleen sellun olosuhteita vastaavia, olisivat käyttökelpoisia ja hyödyllisiä sellun valmistuksessa.

- 5 Ksylanaaseja, joilla on suurempi aktiivisuus korkeammissa lämpötiloissa, voitaisiin käyttää sellun käsittelyyn heti kuidutusprosessin jälkeen ilman tarvetta jäähdyttää sellua. Samalla tavalla sellaisten ksylanaasien kanssa, joilla on suurempi aktiivisuus korkeammissa pH-olosuhteissa, sellun neutraloimiseksi ei tarvittaisi ollenkaan happoa tai sitä tarvittaisiin ainoastaan vähän. Sellaisten ksylanaasien eristys tai geeni-
- 10 manipulaatio saisi aikaan useita etuja ja taloudellisia hyötyjä erilaisissa teollisuusprosesseissa.

- Useat alalla aiemmin käytetyt lähestymistavat, jotka koskevat ksylanaasin parantamista sellun valkaisuun käytettäväksi, sisältävät termostabiilien ksylanaasien eristuksen ääritermofiileistä, jotka kasvavat 80 – 100 °C:ssa, kuten *Caldocellum sac-*
- 15 *charolyticumista*, *Thermatoga maritima*sta ja *Thermatoga sp.* FJSS-B.1 -kannasta (Lüthi et al., 1990; Winterhalter et al., 1995; Simpson et al., 1991). Nämä termostabiilit ksylanaasientsyymit ovat kuitenkin suuria niiden molekyylimassojen vaihdellessa välillä 35 – 120 kDa (320 – 1100 jäännöstä) ja niillä on alentunut kyky tunkeutua sellumassaan verrattuna muihin pienempiin ksylanaaseihin, jotka pääsevät
 - 20 paremmin sellumassakuituihin. Lisäksi jotkin ääritermofiilisistä ksylanaaseista, kuten *Caldocellum saccharolyticum* -ksylanaasi A, sisältävät sekä ksylanaasi- että sellulaasiaktiivisuutta (Lüthi et al., 1990). Tämä sellulolyyttinen lisääktiivisuus ei ole toivottava sellun valkaisussa johtuen sen tuhoisasta vaikutuksesta selluloosaan, joka on paperin päämateriaali. Lisäksi, hypertermostabiileilla ksylanaasientsyymeillä,
 - 25 jotka toimivat normaalisti erittäin korkeissa lämpötiloissa, on matalat spesifiset aktiivisuudet lämpötiloissa, jotka ovat sellun optimaalisen valkaisun rajoissa (Simpson et al., 1991).

- Useita ksylanaaseja on modifioitu proteiiniuokkauksella niiden ominaisuuksien parantamiseksi teollisuussovelluksiin. Esimerkiksi julkaisut US 5 759 840 (Sung et
- 30 al.) ja US 5 866 408 (Sung et al.) kuvaavat mutaatiot *Trichoderma reesei* ksylanaasi II:n (TrX) N-pään alueella (jäännökset 1 – 29). Kolmen mutaation TrX-entsyymissä, jäännöksissä 10, 27 ja 29, havaittiin kohottavan ksylanaasientsyymien entsymaattista aktiivisuutta kohotetuissa lämpötiloissa ja emäksisissä pH-olosuhteissa.

- Julkaisu 5 405 769 (Campbell et al.) kuvaa *Bacillus circulans* -ksylanaasin (BcX)
- 35 modifikaation käyttäen kohdennettua mutageneesia entsyymien termostabiiliuden pa-

rantamiseksi. Kohdennetut mutaatiot sisältävät kahden aminohapon korvaamisen Cys-jäännöksillä molekyylin sisäisten disulfididisidosten muodostamiseksi. Lisäksi mutatoitiin entsyymien N-päässä spesifiset jäännökset, joiden havaittiin myöskin edelleen parantavan entsyymien termostabiilisuutta. *In vitro* -testeissä disulfidimuta-

5 tantit olivat termostabiileja 62 °C:ssa, jossa oli 7 °C parantuminen natiivin BcX-ksylanaasientsyymien termostabiilisuuteen. Nämä termostabiilit disulfidimutantit eivät kuitenkaan osoittaneet mitään lisäystä termofiilisyydessä laboratoriotesteissä myöhemmissä tutkimuksissa (Wakarchuck et al., 1994). Mutaatiot T3G (se on, treoniini kohdassa 3 on korvattu Gly:llä; BcX-ksylanaasin aminohapponumerointi), D4Y(F)

10 ja N8Y(F) lähellä BcX-ksylanaasientsyymien N-päätä saivat aikaan termostabiiliuden 57 °C:ssa, jossa oli 2 °C:n kohoaminen natiiviin BcX:ään verrattuna (US 5 405 769). Näiden entsyymien käyttö teollisuussovelluksissa vaatii kuitenkin vielä sellun jäähdytyksen ja happamoittamisen esikäsittelyn jälkeen ennen entsyymien lisäystä. Sen vuoksi on tarve saada aikaan vielä suurempi kohoaminen termostabiiliudessa, termofiilisyydessä ja pH-optimissa.

15

Alalla on olemassa tarve saada aikaan uusia teollisuuskäyttöön sopivia ksylanaaseja, joilla on kohonnut entsyymaattinen aktiivisuus kohotetuissa lämpötiloissa ja pH-olosuhteissa. Tämän keksinnön aiheena on ratkaista alan aiemmat ongelmat.

Yllä oleva aihe tyydytetään päävaatimuksen ominaisuuksien yhdistämisellä, jatko-

20 vaatimukset kuvaavat keksinnön edullisia lisäsuoritusmuotoja.

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö koskee modifioituja ksylanaaseja. Erikoisemmin keksintö koskee modifioituja ksylanaaseja, joilla on parantunut suorituskky korkeassa lämpötilassa ja pH:ssa.

25 Tämä keksintö koskee modifioitua ryhmä 11 -ksylanaasia, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen kohdassa, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu aminohapoista 75, 104, 105, 125, 129, 132, 135, 144, 157, 161, 162 ja 165, kohdan ollessa määritetty modifioitua ksylanaasin sekvenssivertailulla *Trichoderma reesei* ksylanaasi II:n aminohapposekvenssiin, joka on määritelty sekvenssissä

30 nro 16. Modifioitua ksylanaasilla on edullisesti parantunut termofiilisyys, alkalofiilisyys tai niiden yhdistelmä verrattuna vastaavaan natiiviin ksylanaasiin. Täsmällisemmin sanoen keksinnön kohteena on itsenäisen patenttivaatimuksen 1 mukainen ryhmä 11 -ksylanaasi.

Esillä oleva keksintö saa myös aikaan yllä määritellyn modifioidun ksylanaasin, jossa ainakin yksi substituoitu aminohappojäännös on kohdassa 75. Substituoitu aminohappo on edullisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat Ala, Cys, Gly ja Thr.

- 5 Esillä oleva keksintö käsittää myös yllä määritellyn modifioidun ksylanaasin, joka edelleen käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27 ja Leu:n kohdassa 29.

- Esillä olevan keksinnön mukaisesti on myös saatu aikaan modifioitu ksylanaasi, joka käsittää substituoitua aminohappojäännöksen kohdassa 105, kohdan ollessa määritetty sekvenssivertailulla *Trichoderma reesei* ksylanaasi II:n aminohapposekvenssiin, joka on määritelty sekvenssissä nro 16. Substituoitu aminohappo on edullisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat His, Lys ja Arg. Esillä oleva keksintö koskee myös juuri määriteltyä modifioitua ksylanaasia, joka edelleen käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27 ja Leu:n kohdassa 29. Keksintö sisältää myös juuri määritellyn ksylanaasin, joka edelleen käsittää substituoitua aminohappojäännöksen kohdassa 75.
- 10
- 15

- Tämä keksintö sisältää myös modifioidun ksylanaasin, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29, ei-polaarisen aminohapon kohdissa 75 ja 125, ei-polaarisen aminohapon kohdassa 104, polaarisen aminohapon kohdassa 105 ja happaman aminohapon kohdassa 129. Aminohappo kohdassa 75 on edullisesti Ala, aminohappo kohdassa 125 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat Ala, Cys, Gly ja Thr, aminohappo kohdassa 125 on Glu. Aminohappo kohdassa 105 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat His, Lys ja Arg, ja aminohappojäännös kohdassa 104 on Pro.
- 20

- Tämä keksintö sisältää edelleen modifioidun ksylanaasin, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29, ei-polaarisen aminohapon kohdissa 75 ja 125, polaarisen aminohapon kohdissa 105, 132 ja 135 ja happaman aminohapon kohdassa 129. Lisäksi juuri määritelty modifioitu ksylanaasi voi sisältää polaarisen aminohapon kohdassa 144.
- 25

- Tämä keksintö sisältää modifioidun ksylanaasin, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29, ei-polaarisen aminohapon kohdissa 75 ja 125, polaarisen aminohapon kohdissa 105, 132, 135, 144, 157, 161, 162 ja 165 ja happaman aminohapon kohdassa 129.
- 30

Tämä keksintö pitää sisällään modifioidun ksylanaasin, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29, ei-polaarisen aminohapon kohdissa 75

ja 125, polaarisen aminohapon kohdissa 105, 132, 135, 157, 161, 162 ja 165 ja happaman aminohapon kohdassa 129.

Tämä keksintö koskee myös modifioitua ksylanaasia, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29, ei-polaarisen aminohapon kohdissa 75 ja 125 ja polaarisen aminohapon kohdissa 105, 135, 144, 157, 161, 162 ja 165.

Esillä oleva keksintö koskee myös yllä määriteltyjä modifioituja ksylanaaseja, joissa modifioidut ksylanaasit ovat peräisin ryhmä 11 -ksylanaasista, edullisesti *Trichoderma reesei* -ksylanaasista.

Esillä oleva keksintö koskee modifioitua ksylanaasia, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen, jossa modifioidulle ksylanaasille on ominaista, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C, ja jossa modifioitu ksylanaasi on ryhmä 11 -ksylanaasi, joka on peräisin *Trichoderma* sp:stä. MET on edullisesti välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C.

Tämä keksintö sisältää myös modifioidun ksylanaasin, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen, jossa modifioidulle ksylanaasille on ominaista, että sen maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6, ja jossa modifioitu ksylanaasi on ryhmä 11 -ksylanaasi, joka on peräisin *Trichoderma* sp:stä. MEP on edullisesti välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4.

Esillä oleva keksintö koskee modifioitua ksylanaasia, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen, jossa modifioidulle ksylanaasille on ominaista, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C, ja maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. MET on edullisesti välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C, ja MEP on edullisesti välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4.

Esillä oleva keksintö koskee myös modifioitua ksylanaasia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu entsyymeistä:

TrX-75A;

TrX-157D-161R-162H-165H;

TrX-HML-75A;

TrX-HML-105H;

TrX-HML-105R;

TrX-HML-105K;

TrX-HML-75A-105H;

- TrX-HML-75A-105R;
 TrX-HML-75C-105R;
 TrX-HML-75G-105R;
 TrX-HML-75T-105R;
 5 TrX-HML-125A;
 TrX-HML-125A-129E;
 TrX-HML-75G-105R-125A-129E (TrX-HML-GRAE);
 TrX-HML-75A-105H-125A-129E (TrX-HML-AHAE);
 TrX-HML-75G-105H-125A-129E (TrX-HML-GHAE);
 10 TrX-HML-75A-105R-125A-129E (TrX-HML-ARAE);
 TrX-HML-75G-104P-105R-125A-129E (TrX-HML-GPRAE);
 TrX-HML-75G-104P-105H-125A-129E (TrX-HML-GPHAE);
 TrX-HML-AHAE-RR;
 TrX-HML-AHAE-RRR;
 15 TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH;
 TrX-HML-AHA-RR-DRHH; ja
 TrX-HML-AHAE-RR-DRHH.

- Esillä olevan keksinnön mukaisesti on saatu aikaan modifioitu ksylanaasi, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen ja jolle on ominaista, että
 20 sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C, jossa modifioitu ksylanaasi on ryhmä 11 -ksylanaasi, joka on peräisin *Trichoderma* sp:stä. Lisäksi esillä oleva keksintö koskee *Trichoderma* sp:stä peräisin olevaa modifioitua ryhmä 11 -ksylanaasia, jolle on ominaista, että MET on välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C. Esillä oleva keksintö koskee myös *Trichoderma* sp:stä peräisin olevaa modifioitua ryhmä 11 -ksylanaasia, jolle on ominaista, että sen MET
 25 on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C, ja maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. Tämä keksintö koskee myös juuri määriteltä modifioitua ksylanaasia, jossa MEP on välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4.

- Esillä oleva keksintö koskee yllä määritellyn modifioitun ksylanaasin käyttöä teollisuusprosessissa. Myös sellainen teollisuusprosessi on sisällytetty, joka käsittää sel-
 30 lun valkaisun, tarkkuuslaitteiden prosessoinnin tai siipikarjan ja sian rehun sulavuuden parantamisen.

- Tämä keksinnön yhteenveto ei välttämättä kuvaa kaikkia keksinnön tarpeellisia ominaisuuksia vaan keksintö voi myös sisältyä kuvattujen ominaisuuksien muihin
 35 yhdistelmiin.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Nämä ja keksinnön muut ominaisuudet tulevat selvemmiiksi seuraavasta kuvauksesta, jossa viitataan lisättyihin piirustuksiin, joissa:

- Kuvio 1 esittää ryhmä 11 -ksylanaasien ryhmän aminohapposekvenssivertailun.
- 5 Aminohapponumerointia verrataan *Trichoderma reesei* ksylanaasi II:n (Tr2) numerointiin, joka on kuvattu sekvenssien yläpuolella. Jäännökset kohdilla 75 ja 105 (suhteessa Tr2-sekvenssiin) on merkitty kursivilla ja osoitettu tähdellä. Aminohapot, jotka ovat yhteisiä ainakin 75 prosentille luetelluista ryhmä 11 -ksylanaaseista, on osoitettu lihavoituina. Jäännökset, jotka ovat yhteisiä kaikille ryhmä 11 -ksylanaaseille, on alleviivattu. Ksylanaaseille, joilla on selluloosaa sitova domeeni, on esitetty ainoastaan katalyyttiset ydinsekvenssit.
- 10

Kuvio 2 esittää TrX-ksylanaasin nukleotidisekvenssin (sekvenssi nro 39) ja ne syntetisoidut oligonukleotidit, joita käytettiin rakennettaessa sekvenssi, joka koodittaa *Trichoderma reesei* ksylanaasi II -entsyymiä (TrX) plasmidissa pTrX.

- 15 Kuvio 3 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen TrX-75A-ksylanaasin entsymaattiseen aktiivisuuteen verrattuna TrX-entsyymiin pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

- 20 Kuvio 4 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen TrX-HML-, TrX-HML-75A-, TrX-HML-105H- ja TrX-HML-75A-105H-ksylanaasien entsymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

- 25 Kuvio 5 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen TrX-HML-, TrX-HML-105K-, TrX-HML-105R-, TrX-HML-105H-, TrX-HML-75A-105R- ja TrX-HML-75A-105H-ksylanaasien entsymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

- 30 Kuvio 6 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen TrX-HML-, TrX-HML-105R-, TrX-HML-75T-105R-, TrX-HML-75G-105R-, TrX-HML-75A-105R- ja TrX-HML-75C-105R-ksylanaasien entsymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

Kuvio 7 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen TrX-HML-, TrX-HML-125A-, TrX-HML-125A129E- ja TrX-HML-75G-105R-125A129E-ksylanaasien (TrX-HML-GRAE) entsymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

5

Kuvio 8 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen ksylanaasientsyymien

TrX-HML;

TrX-HML-105H;

TrX-HML-75A-105H-125A129E (TrX-HML-AHAE);

10 TrX-HML-75G-105H-125A129E (TrX-HML-GHAE); ja

TrX-HML-75A-105R-125A129E (TrX-HML-ARAE)

entsymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

Kuvio 9 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen ksylanaasientsyymien

15 TrX-HML-75G-104P-105R-125A129E (TrX-HML-GPRAE);

TrX-HML-75G-104P-105H-125A129E (TrX-HML-GPHARE); ja

TrX-HML-75G-105R-125A129E (TrX-HML-GRAE)

entsymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

20 Kuvio 10 esittää modifioitujen TrX-75A-ksylanaasientsyymien pH-profiilin verrattuna natiivin TrX-entsyymien vastaavaan pH:ssa 4,0 – 6,5 55 °C:ssa 30 minuutin inkubaation aikana. Tulokset on normalisoitu kullekin entsyymille sen pH:n suhteen, jossa sen aktiivisuus on optimaalinen.

25 Kuvio 11 esittää modifioitujen TrX-HML-, TrX-HML-75A-, TrX-HML-105H- ja TrX-HML-75A-105H-ksylanaasien pH-profiilit pH:ssa 4 – 7 65 °C:ssa 30 minuutin inkubaation aikana. Tulokset on normalisoitu kullekin entsyymille sen pH:n suhteen, jossa sen aktiivisuus on optimaalinen.

30 Kuvio 12 esittää modifioitujen TrX-HML-, TrX-HML-105K-, TrX-HML-105R-, TrX-HML-105H- ja TrX-HML-75A-105H-ksylanaasien pH-profiilin pH:ssa 4 – 7 65 °C:ssa 30 minuutin inkubaation aikana. Tulokset on normalisoitu kullekin entsyymille sen pH:n suhteen, jossa sen aktiivisuus on optimaalinen.

Kuvio 13 esittää modifioitujen ksylanaasien

TrX-HML;

TrX-HML-105R;

TrX-HML-75T-105R, TrX-HML-75G-105R;

5 TrX-HML-75A-105R; ja

TrX-HML-75C-105R

pH-profiilin pH:ssa 4 – 7 65 °C:ssa 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu kullekin entsyymille sen pH:n suhteen, jossa sen aktiivisuus on optimaalinen.

10 Kuvio 14 esittää modifioitujen ksylanaasien

TrX-HML;

TrX-HML-105H;

TrX-HML-75A-105H;

TrX-HML-75A-105H-125A129E (TrX-HML-AHAE); ja

15 TrX-HML-75G-105H-125A129E (TrX-HML-GHAE)

pH-profiilin pH:ssa 4 – 7 65 °C:ssa 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu kullekin entsyymille sen pH:n suhteen, jossa sen aktiivisuus on optimaalinen.

20 Kuvio 15 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen TrX-157D-161R-162H-165H-ksylanaasin entsyymaattiseen aktiivisuuteen verrattuna TrX:iin pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

25 Kuvio 16 esittää modifioitujen TrX-157D-161R-162H-165H-ksylanaasientsyymin pH-profiilin verrattuna natiivin TrX:n vastaavaan pH:ssa 4,0 – 6,5 55 °C:ssa 30 minuutin inkubaation aikana. Tulokset on normalisoitu kullekin entsyymille sen pH:n suhteen, jossa sen aktiivisuus on optimaalinen.

Kuvio 17 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen ksylanaasien

TrX-HML-AHAE-RR; ja

TrX-HML-AHAE-RRR

30 entsyymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

Kuvio 18 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen ksylanaasien

TrX-HML-AHA-RR-DRHH;
TrX-HML-AHAE-RR-DRHH; ja
TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH

- 5 entsyymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

Kuvio 19 esittää lämpötilan vaikutuksen modifioitujen ksylanaasien

- TrX;
TrX-HML;
10 TrX-HML-AHAE;
TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH;
TrX-HML-AHA-RR-DRHH; ja
TrX-HML-AHAE-RR-DRHH

- 15 entsyymaattiseen aktiivisuuteen pH:ssa 5,5 30 minuutin inkubaatioiden aikana. Tulokset on normalisoitu sen aktiivisuuden suhteen, joka havaitaan 40 °C:ssa.

- 20 Kuvio 20 esittää usean esillä olevan keksinnön mukaisen modifioituneen entsyymin maksimitehokkuuslämpötilan (MET) ja maksimitehokkuuden pH-arvon (MEP). MET ja MEP on se korkein lämpötila ja pH, vastaavasti, jossa ksylanaasilla on ainakin 80 % sen optimaalisesta aktiivisuudesta (käytettäessä ksylaania substraattina; katso kohta, jossa testimenetelmien yksityiskohdat kuvataan täydellisesti). Nämä tulospisteet saatiin tuloksista, jotka on esitetty kuvioissa 5 – 14.

Edullisen suoritusmuodon kuvaus

- 25 Esillä oleva keksintö koskee modifioituja ksylanaaseja. Erikoisemmin keksintö koskee modifioituja ksylanaaseja, joilla on parantunut suorituskyky korkeassa lämpötilassa ja pH:ssa.

Seuraava kuvaus edullisesta suoritusmuodosta on annettu ainoastaan esimerkin valossa eikä se rajoita niiden ominaisuuksien yhdistelmää, joka on tarpeen keksinnön suorittamiseksi.

- 30 Sitä mekanismia, jolla ksylanaasit tehostavat sellun valkaisua, ei ole täysin ymmärretty. On oletettu, että värillinen ligniini on sitoutunut kiteiseen selluloosaan ksylaanin välityksellä ja että ksylanaasientsyymit tehostavat sellun valkaisua hydrolysoi-

mallalla ksylaania vapauttaen värillisen ligniinin sellussa. Modifioituja ksylanaaseja, kuten tässä on kuvattu, voidaan käyttää sellun valkaisuun tai muihin sovelluksiin, joissa tarvitaan aktiivisuuksia sellaisissa lämpötiloissa ja pH:ssa, jotka ovat korkeampia kuin mitä villityypin entsyymi kestää. Sellun biovalkaisua varten edullinen

5 ksylanaasi on peräisin ksylanaasista, jonka luokitellaan kuuluvan ryhmä 11 -ksylanaaseihin (katso taulukko 1), tässä kuvattujen modifikaatioiden ei kuitenkaan tarvitse olla rajoittuneita ainoastaan ryhmä 11 -ksylanaaseihin ja ne voivat sisältää muitakin ksylanaasientsyymeitä.

Ryhmä 11 -ksylanaasientsyymit ovat ryhmä pieniä entsyymeitä, joiden molekyyli-

10 massa on suhteellisen matala (noin 20 kDa ja noin 200 aminohappojäännöstä. Ryhmä 11 -ksylanaasien pieni koko sallii niiden helpon tunkeutumisen sellumassaan. Lisäksi ryhmä 11 -ksylanaasit eivät sisällä sellulaasiaktiivisuutta.

Eräs esillä olevan keksinnön näkökohta koskee modifioitua ryhmä 11 -ksylanaasia, joka on peräisin *Trichoderma* sp:stä, joka entsyymi sisältää ainakin yhden substitu-

15 oidun aminohappojäännöksen ja jolle entsyymille on ominaista se, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C. Modifioidulle ksylanaasille on edullisesti ominaista se, että sen MET on välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C. Tämä keksintö sisältää myös sellaisen modifioidun ksylanaasin, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen ja jolle on ominaista se, että sen maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. MEP on edullisesti välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4.

Tämä keksintö koskee myös sellaista *Trichoderma*:sta peräisin olevaa modifioitua ksylanaasia, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohapon ja jolle on ominaista, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C –

25 noin 78 °C, ja maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. MET on edullisesti välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C, ja MEP on edullisesti välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4.

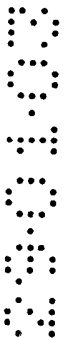
Termillä “maksimitehokkuuslämpötila” tai “MET” tarkoitetaan sitä korkeinta lämpötilaa, jossa ksylanaasilla on ainakin 80 % sen optimiaktiivisuudesta. Tämä testi

30 suoritetaan tyypillisesti käyttäen ksylaania substraattina pH:ssa 5,5 30 minuutin ajan. Tulokset testeistä, joissa karakterisoitiin modifioituja ksylanaaseja, on esitetty kuvioissa 3 – 9, ja niissä käytettiin inkubaatiota pH:ssa 5,5 30 minuutin ajan. Yhteenveto useiden esillä olevan keksinnön entsyymien MET-arvoista, jotka on määritetty kuvioista 3 – 9, on esitetty kuviossa 20. Kokeet osoittavat, että ksylanaasin

35 MET-arvo eroaa eri substraateilla. Sen vuoksi on ymmärrettävä, että eri substra-

teilla saadaan erilaiset MET-arvot (tuloksia ei esitetty). Esillä olevan keksinnön ksylanaasien arvioimiseksi on käytetty ksylaanisubstraattia (katso esimerkit 3 ja 4).

- Termillä “maksimitehokkuuden pH-arvo” tai “MEP” tarkoitetaan sitä korkeinta pH:ta, jossa ksylanaasilla on ainakin 80 % sen optimiaktiivisuudesta. Tämä testi
- 5 suoritetaan tyypillisesti käyttäen ksylaania substraattina 65 °C:ssa 30 minuutin ajan. Tulokset testeistä, joissa karakterisoitiin modifioituja ksylanaaseja, on esitetty kuvioissa 10 – 14 ja 16 – 19, ja niissä käytettiin inkubaatiota 65 °C:ssa 30 minuutin ajan. Yhteenveto useiden esillä olevan keksinnön entsyymien MEP-arvoista on esitetty kuviossa 20. Kokeet osoittavat, että ksylanaasin MEP-arvo eroaa eri substraateilla.
- 10 Esimerkiksi sulfaattiselluloosalla, joka on valmistettu pehmeästä puusta tai kovasta puusta, on havaittu MEP-arvo 8,5 (tuloksia ei esitetty). Sen vuoksi on ymmärrettävä, että eri substraateilla saadaan erilaiset MEP-arvot. Esillä olevan keksinnön ksylanaasien arvioimiseksi on käytetty ksylaanisubstraattia (katso esimerkit 4 ja 5).



Taulukko 1 Ryhmä 11 -ksylanaasientsyymit

Mikrobi	Ksylanaasi	Sekvenssi nro
<i>Aspergillus niger</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 1
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>kawachi</i>	Xyn B	Sekvenssi nro 19
<i>Aspergillus kawachii</i>	Xyn C	-
<i>Aspergillus tubigenensis</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 2
<i>Bacillus circulans</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 3
<i>Bacillus pumilus</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 4
<i>Bacillus subtilis</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 5
<i>Cellulomonas fim</i>	Xyn D	-
<i>Chainia</i> spp.	Xyn	-
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Xyn B	Sekvenssi nro 6
<i>Clostridium stercorarium</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 7
<i>Fibrobacter succinognees</i>	Xyn II	Sekvenssi nro 18
<i>Neocallimasterix patriciarum</i>	Xyn A	-
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Xyn II	-
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 8
<i>Schizophyllum cimmune</i>	Xyn	Sekvenssi nro 9
<i>Streptomyces lividans</i>	Xyn B	Sekvenssi nro 10
<i>Streptomyces lividans</i>	Xyn C	Sekvenssi nro 11
<i>Streptomyces</i> sp. No 36a	Xyn	Sekvenssi nro 12
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Xyn II	-
<i>Thermomonospora fusca</i>	Xyn A	Sekvenssi nro 13
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xyn	Sekvenssi nro 20
<i>Trichoderma harzianum</i>	Xyn	Sekvenssi nro 14
<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn I	Sekvenssi nro 15
<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn II	Sekvenssi nro 16
<i>Trichoderma viride</i>	Xyn	Sekvenssi nro 17

Ryhmä 11 -ksylanaasit ovat aminohapposekvenssiltään hyvin samankaltaisia (kuvio 1). Useiden ryhmä 11 -ksylanaasien rakennetutkimukset osoittavat, että bakteereista ja sienistä peräisin olevilla ryhmä 11 -ksylanaaseilla on samanlainen yleinen molekyylirakenne (US 5 405 769; Arase et al., 1993). Lisäksi, useilla tähän asti tunnistetuilla ryhmä 11 -ksylanaaseilla on kolme sekundaarirakennetyyppiä, jotka sisältävät beetalaskoksia, käännöksiä ja yksittäisen alfa-heliksien. *Trichoderma reesei* ksylanaa-

si II -entsyymin heliksi käsittää alueen aminohaposta 151 aminohappoon 162 (Torronen et al., 1995).

Ksylanaasi luokitellaan kuuluvan ryhmä 11 -ksylanaasiksi, jos se käsittää aminohappoja, jotka ovat yhteisiä muille ryhmä 11 -ksylanaaseille sisältäen kaksi glutamiinihappojäännöstä (E), jotka voivat toimia katalyyttisinä jäännöksinä. Glutamiinihappojäännökset ovat kohdissa 86 ja 177 [katso kuvio 1; perustuen Tr2:n (*Trichoderma reesei* ksylanaasi II -entsyymi) aminohapposekvenssin numerointiin].

Useimmat tähän asti tunnistetut ryhmä 11 -ksylanaasit ovat mesofiilisiä ja niillä on pieni molekyylimassa (20 kDa). Tämä ryhmä sisältää kuitenkin myös ainakin kaksi termostabiilia ksylanaasia, joilla on suurempi molekyylimassa, *Thermomonospora fusca* ksylanaasi A:n (TfX-A), joka on pituudeltaan 296 aminohappoa ja molekyylimassaltaan noin 32 kDa [(Irwin et al., 1994); Wilson et al., 1994, WO 95/12668] ja *Clostridium stercoarium* ksylanaasi A:n, joka on pituudeltaan 511 aminohappoa ja molekyylimassaltaan noin 56 kDa. *Clostridium stercoarium* ksylanaasi A -entsyymin maksimiaktiivisuus on lämpötilassa 70 °C (Sakka et al., 1993).

Suuret termostabiilit ryhmä 11 -ksylanaasit eroavat pienistä mesofiilisistä entsyymeistä niin, että niillä on hydrofobinen selluloosaa sitova domeeni (CBD) entsyymin pidentyneessä C-päässä. TfX-A-entsyymi koostuu katalyyttisestä 189 jäännöksen pituisesta ydinsekvenssistä, joka on yhteinen ryhmä 11 -ksylanaaseille, ja selluloosaa sitovasta 107 jäännöksen pituisesta domeenista. Pidemmällä *C. stercoarium* ksylanaasi A:lla on kaksi selluloosaa sitovan domeenin kopiota.

Kohdennettua mutageneesia on käytetty esillä olevassa keksinnössä muodostamaan sellaisia mutaatioita ksylanaaseihin, jotka tekevät entsyymin termofiilisemmäksi ja alkalofiilisemmäksi kuin natiivi entsyymi. Mutanttiksylanaasi on edullisesti sellainen, joka on peräisin ryhmä 11 -ksylanaasista. Esillä olevan keksinnön mutanttiksylanaasi käsittää edullisemmin *Trichoderma reesei* ksylanaasi II -mutanttientsyymin.

Sen vuoksi esillä olevan keksinnön piirissä on mietitty, että ksylanaaseja sisältäen ryhmä 11 -ksylanaasit, esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, *Trichoderma reesei* ksylanaasi II:n, *Trichoderma reesei* ksylanaasi I:n, *Trichoderma viride* -ksylanaasin, *Streptomyces lividans* ksylanaasi B:n ja *Streptomyces lividans* ksylanaasi C:n, voidaan modifioida tässä kuvatulla yleisellä lähestymistavalla ja menetelmällä. Esillä olevassa keksinnössä on myös mietitty, että muitakin kuin ryhmä 11 -ksylanaaseja voidaan modifioida tässä kuvattujen yleisten periaatteiden mukaisesti sellaisen ksylanaasientsyymin aikaan saamiseksi, joka on termofiilinen ja alkalofiilinen.

Termillä “termofiilisyyys” tarkoitetaan, että entsyymi on aktiivinen tai aktiivisempi korkeammassa lämpötilassa verrattuna toisen entsyymin aktiivisuuteen silloin, kun kaikki muut olosuhteet ovat vakioita. Esimerkiksi ksylanaasi 1:llä on kohonnut termofiilisyyys verrattuna ksylanaasi 2:een, jos ksylanaasi 1 kykenee, tai on aktiivisempi, hydrolysoimaan ksylaania korkeammassa lämpötilassa kuin ksylanaasi 2 identtissä olosuhteissa samaa substraattia käyttäen. Koska useimmat ksylanaasit ovat tehokkaita korkeammassa lämpötilassa hydrolysoidessaan puhdasta ksylaania kuin sellua, on vertailuanalyysi tehtävä käyttäen samaa substraattia. Tässä viitatuissa termofiilisuuden kvantitatiivisissa mittauksissa käytetään puhtaita ksylaanisubstraatteja jollei toisin ole osoitettu.

Termillä “termostabiilius” tarkoitetaan, että entsyymiä kyetään säilyttämään tai inkuboimaan korkeissa lämpötilaolosuhteissa tyypillisesti substraatin poissa ollessa ja että on sitten aktiivinen, kun se palautetaan standarditestiolosuhteisiin. Esimerkiksi ksylanaasi 1:llä sanotaan olevan kohonnut termostabiilius verrattuna ksylanaasi 2:een, jos ksylanaasi 1:llä säilyy korkeampi aktiivisuus kuin ksylanaasi 2:lla sen jälkeen, kun niitä on pidetty tietyssä lämpötilassa (tyypillisesti korkeammassa lämpötilassa), esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, 70 °C:ssa 24 tuntia, jonka jälkeen testi suoritetaan matalammassa lämpötilassa. Päinvastoin kuin termofiilisyudessa, termostabiilius koskee jäljellä olevaa entsyymiaktiivisuutta sen jälkeen, kun on inkuboitu substraatin poissa ollessa.

Näiden kahden termin (termofiilisyyys ja termostabiilius) mainittuja käyttöjä on sekoittanut alalla aiemmin se, että niitä on käytetty vaihtovuoroisesti. Kuitenkin, termin käyttö tässä määritellyllä tavalla on yhdenmukaista termien käytölle alalla (Mathrani ja Ahring, 1992).

Termillä “alkalofiilisyyys” tarkoitetaan, että entsyymi on aktiivinen tai aktiivisempi korkeammassa pH:ssa verrattuna toisen entsyymin aktiivisuuteen silloin, kun kaikki muut olosuhteet ovat vakioita. Esimerkiksi ksylanaasi 1:llä on kohonnut alkalofiilisyyys verrattuna ksylanaasi 2:een, jos ksylanaasi 1 kykenee hydrolysoimaan ksylaania korkeammassa pH:ssa kuin ksylanaasi 2. Alkalofiilisyyys koskee tyypillisesti entsyymiaktiivisuutta ksylaanisubstraatin läsnä ollessa.

Termillä “TrX-numerointi” tarkoitetaan sitä numerointia, joka liittyy aminohappokohtiin perustuen TrX:n aminohapposekvenssiin (Xyn II – taulukko 1; Tr2 – kuvio 1; sekvenssi nro 16). Kuten alla on kuvattu ja kuviosta 1 ilmenee, ryhmä 11 -ksylanaaseilla on huomattava sekvenssien samankaltaisuustaso. Sen vuoksi, vertaamalla aminohappoja alekkain ksylanaasientsyymien välisen sekvenssien samankaltaisuutta

den optimoimiseksi ja käyttämällä TrX:n aminohapponumerointia numeroinnin perustana, voidaan muiden ksylanaasientsyymien aminohappokohdat määrittää suhteessa TrX:ään.

5 Modifioidulla ksylanaasilla tarkoitetaan ksylanaasimolekyylin muuttamista käyttäen menetelmiä, jotka ovat alan ammattimiehen tuntemia. Nämä menetelmät sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, kohdennetun mutageneesin, kasettimutageneesin, satunnaismutageneesin, synteettisten oligonukleotidien rakentamisen, kloonauksen menetelmät ja muut geenitekniset menetelmät.

10 Kuten tässä on kuvattu yksityiskohtaisemmin, on valmistettu useita mutanttiksylanaaseja, joilla on kohonnut termofiilisyyttä, alkalofiilisyyttä ja termostabiilius verrattuna natiiviin ksylanaasiin. Luettelo useista mutanteista, jota ei tule pitää millään tavoin rajoittavana, on esitetty taulukossa 2.

15 Lisäksi esillä oleva keksintö koskee modifioitua ryhmä 11 -ksylanaasia, joka on peräisin *Trichoderma* sp:stä, joka entsyymi sisältää ainakin yhden substituoidun aminohappojäännöksen ja jolle entsyymille on ominaista se, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 69 °C – noin 78 °C. Modifioidulle ksylanaasille on edullisesti ominaista se, että sen MET on välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C. Tämä keksintö koskee myös sellaista *Trichoderma*stä peräisin olevaa modifioitua ksylanaasia, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohapon ja jolle on ominaista se, että sen maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. MEP on edullisesti välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4. Tämä keksintö koskee myös sellaista *Trichoderma*stä peräisin olevaa modifioitua ksylanaasia, joka käsittää ainakin yhden substituoidun aminohapon ja jolle on ominaista, että sen maksimitehokkuuslämpötila (MET) on välillä, joka on noin 25 69 °C – noin 78 °C, ja maksimitehokkuuden pH-arvo (MEP) on välillä, joka on noin 5,8 – noin 7,6. MET on edullisesti välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C, ja MEP on edullisesti välillä, joka on noin 6,5 – noin 7,4.

Ksylanaasin MET- ja MEP-arvojen määrittäminen voidaan suorittaa seuraavasti:

30 i) mitataan ksylanaasin lämpötilaprofiili, kuten on kuvattu esimerkissä 3. Määritetään lämpötilat, joissa saadaan ainakin 80 % optimaalisesta (maksimaalisesta) aktiivisuudesta, ja korkein lämpötila on MET;

ii) mitataan ksylanaasin pH-profiili, kuten on kuvattu esimerkissä 4. Määritetään pH, jossa saadaan ainakin 80 % optimaalisesta (maksimaalisesta) aktiivisuudesta, ja korkein pH on MEP;

Nämä arvot voidaan sitten esittää graafisesti, kuten on esitetty kuviossa 20.

Taulukko 2 Modifioidut ksylanaasit

Ksylanaasi	Kuvaus
TrX-75A	TrX, jossa Ser kohdassa 75 on korvattu Ala:lla (S75A)
Trx-105H	TrX, jossa Leu kohdassa 105 on korvattu His:llä (L105H)
TrX-HML	TrX, jossa on N10H, Y27M ja N29L (katso US 5 759 840)
TrX-HML-105H	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L ja L105H
TrX-HML-105K	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L ja L105K
TrX-HML-105R	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L ja L105R
TrX-HML-75A	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L ja S75A
TrX-HML-75A-105H	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A ja L105H
TrX-HML-75A-105R	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A ja L105R
TrX-HML-75C-105R	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75C ja L105R
TrX-HML-75G-105R	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G ja L105R
TrX-HML-75T-105R	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75T ja L105R
TrX-HML-125A	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L ja Q125A
TrX-HML-125A129E	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, Q125A ja I129E
TrX-HML-GRAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, L105R, Q125A ja I129E
TrX-HML-AHAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A ja I129E
TrX-HML-GHAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, L105H, Q125A ja I129E
TrX-HML-ARAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105R, Q125A ja I129E
TrX-HML-GPRAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, K104P, L105R, Q125A ja I129E
TrX-HML-GPHAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, K104P, L105H, Q125A ja I129E
TrX-HML-AHAE-RR	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, A132R ja Y135R

Taulukko 2 (jatkuu) Modifioidut ksylanaasit

Ksylanaasi	Kuvaus
TrX-HML-GRAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, L105R, Q125A ja I129E
TrX-HML-AHAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A ja I129E
TrX-HML-GHAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, L105H, Q125A ja I129E
TrX-HML-ARAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105R, Q125A ja I129E
TrX-HML-GPRAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, K104P, L105R, Q125A ja I129E
TrX-HML-GPHAE	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75G, K104P, L105H, Q125A ja I129E
TrX-HML-AHAE-RR	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, A132R ja Y135R
TrX-HML-AHAE-RRR	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, A132R, Y135R ja H144R
TrX-157D-161R-162H-165H	TrX, jossa on N157D, Q161R, Q162H ja T165H
TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, A132R, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H ja T165H
TrX-HML-AHA-RR-DRHH	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H ja T165H
TrX-HML-AHAE-RR-DRHH	TrX, jossa on N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H ja T165H

Substituutio kohdassa 75 tai 105 ei muuta ksylanaasientsyymin spesifistä aktiivisuutta verrattuna natiivin ksylanaasin vastaavaan (katso taulukko 4, esimerkki 3).

- 5 Samalla tavalla mutaatiot kohdissa 157, 161, 162 ja 165 eivät muuta modifioidun ksylanaasin spesifistä aktiivisuutta.

Ksylanaasin termofiilisyyden kohottaminen

Mutantti TrX-75A, jossa on yksi S75A-mutaatio, osoitti suuremman entsymaattisen aktiivisuuden kuin natiivi TrX-ksylanaasi 50, 55, 60 ja 65 °C:ssa (kuvio 3). Lisäksi, S75A-mutaatio TrX-HML-75A-mutanttiksylanaasissa osoitti suuremman entsy-

5 maattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-emoksylanaasi 70 °C:ssa ja 75 °C:ssa (kuvio 4). Nämä tulokset vihjaavat, että S75A-mutaatio parantaa TrX- ja TrX-HML-ksylanaasien termofiilisyyttä.

Ser → Ala -mutaatio kohdassa 75 (S75A) parantaa sekä TrX-75A- että TrX-HML-75A-ksylanaasien termofiilisyyttä verrattuna niiden natiiveihin vastineisiin. S75A-

10 mutaatio edustaa muutosta Ser-aminohaposta, jossa on suhteellisen polaarinen ja hydrofiilinen sivuketju, Ala-jäännökseksi, jossa on pieni ja suhteellisen ei-polaarinen sivuketju. Teoriaan sitoutumatta on mahdollista, että polaarisen seriiniami-

15 nohapon korvaaminen pienemmällä ei-polaarisella Ala-jäännöksellä tehostaa ksylanaasin molekyyllinsisäistä pakkautumista. Ksylanaasin tertiaarirakenteen tehostunut molekyyllinsisäinen pakkautuminen voi puolestaan parantaa van der Waals -inter-

aktioita lähekkäin sijaitsevien apolaaristen substituenttien välillä. Tulos sellaisesta parantuneesta molekyyllinsisäisestä pakkautumisesta on entsyymin termofiilisyyden kohoaminen. Sellaisissa tapauksissa tarvitaan korkeampia lämpötiloja mutantti-

ksylanaasin denaturoimiseksi ja inaktivoimiseksi.

20 Substituoimalla kohta 157 happamalla aminohapolla ja kohdat 161, 162 ja 165 emäksisellä aminohapolla, esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, korvaamalla Asn kohdassa 157 Asp:lla (N157D), Ala kohdassa 161 Arg:lla (A161R), Gln kohdassa 162 His:llä (Q162H) ja Thr kohdassa 165 His:llä (T165H) TrX-157D-161R-162H-165H:n tuottamiseksi, voi johtaa pieneen kohoamiseen tämän entsyymin termofiilisyydessä verrattuna TrX-emoentsyymiin (kuvio 15).

25

Samalla tavalla Leu 105:n mutaatio His:ksi (L105H) TrX-HML-ksylanaasissa TrX-HML-105H-mutanttiksylanaasin tuottamiseksi sisältää kohonneen entsymaattisen aktiivisuuden verrattuna TrX-HML-emoksylanaasiin 70 ja 75 °C:ssa (kuvio 4).

30 Leu → His -mutaatio kohdassa 105 (L105H) parantaa TrX-HML-105H:n termofiilisyyttä verrattuna TrX-HML-ksylanaasiin. L105H-mutaatio edustaa muutosta Leu:sta, joka on hydrofobinen haarautuneen ketjun sisältävä aminohappo, His:ksi, jossa on suhteellisen tilaa vievä polaarinen imidatsolisivuketju. Teoriaan sitoutumatta, L105H-mutaatio lisää suhteellisesti tilaa vievän planaarisien aminohapon, joka kykenee sitoutumaan vetysidoksin molekyylin lähiympäristössä olevien muiden

aminohappojen kanssa, joka mahdollisesti tehostaa entsyymin atomien molekyylinsisäistä pakkautumista ja näin stabiloi entsyymin tertiaarista rakennetta. Lisäksi, imidatsolisivuketju voi olla protonoitu testiolosuhteissa, joka saa aikaan imidatsoli-konjugaattihapon. Protonoitu imidatsoliryhmä voi ottaa osaa attraktiivisiin elektro-
 5 staattisiin interaktioihin ksylanaasin kolmiulotteisessa tertiaarirakenteessa ja näin stabiloida sen tertiaarirakennetta.

Ksylanaasin yhdistelmämutantti TrX-HML-75A-105H sisälsi maksimaalisen entsyymaattisen aktiivisuuden 70 °C:ssa ja osoitti lisäksi suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin kumpikaan ksylanaasin yksittäismutantti TrX-HML-75A- tai TrX-HML-105H 70 °C:ssa (kuvio 4). Nämä tulokset osoittavat, että S75A- ja L105H-mutaatioiden vaikutukset mutanttiksylanaasin termofiilisyyteen ovat additiivisia tai täydentäviä.

Rakennettiin sarja TrX-HML-ksylanaaseja, joissa oli mutaatiot kohdassa 105 niiden aminohappojäännösten määrittämiseksi, jotka tehostavat TrX-HML-emoentsyymin termofiilisyyttä (kuvio 5). Kolme kohdan 105 suhteen mutatoitua entsyymiä, TrX-HML-105H, TrX-HML-105R ja TrX-HML-105K, osoittivat suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-esiaste-entsyymi lämpötilassa, joka oli noin 60 °C tai korkeampi. Natiivi ksylanaasi käsittää kohdassa 105 Leu:n, joka on suhteellisen hydrofobinen haarautuneen ketjun sisältävä aminohappo. Mutanttiksylanaasit, joissa kohta 105 on substituoitu hydrofiilisellä positiivisesti varatulla tai emäksisellä aminohapolla, esimerkiksi His:llä, Arg:lla tai Lys:llä, sisälsivät tehostuneen termofiilisyyden.

TrX-HML-75A-105R-yhdistelmämutanttiksylanaasi osoitti samanlaisen lämpötila-aktiivisuusprofiilin kuin TrX-HML-75A-105H-ksylanaasi, joka vihjaa, että S75A- ja L105R-mutaatiot, kuten S75A- ja L105H-mutaatioiden tapauksessa, ovat additiivisia tai täydentäviä. Nämä tulokset vihjaavat lisäksi, että emäksiset jäännökset kohdassa 105 tehostavat ksylanaasien termofiilisyyttä.

Johtuen kohdan 75 mutaatioihin liittyvästä havaitusta termofiilisyyden kohoamisesta tutkittiin myös yhdistelmämutaatioita, joissa oli erilaiset substituutit kohdassa 75 yhdessä L105R-mutaation kanssa. Kolme geneettisesti modifioitua ksylanaasimutanttia, TrX-HML-75C-105R, TrX-HML-75A-105R ja TrX-HML-75G-105R, osoittivat suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin esiasteksylanaasi TrX-HML-105R tai TrX-HML-ksylanaasi lämpötiloissa, jotka olivat korkeampia kuin noin 60 °C (kuvio 6). Neljäs mutantti, TrX-HML-75T-105R-ksylanaasi, ei sisältänyt mitään termofiilisyyden tehostumista verrattuna TrX-HML-105R-esiasteksylanaa-

siin, jossa on luonnollinen Ser-jäännös kohdassa 75. Mutanttitreoniinijäännös kohdassa 75 on, kuten TrX- ja TrX-HML-emoksyylanaaseissa oleva luonnollinen Ser 75-jäännöskin, hydrofiilinen aminohappo. Yhteenvedona mutaatiot, joissa suoritetaan kohdassa 75 olevan Ser:n korvaaminen pienillä ei-polaarisilla aminohapoilla, kuten, mutta ei rajoittuen, Ala:lla, Gly:llä tai Cys:llä, johtavat ksylanaasin termofiilisyyden kohoamiseen.

Rakennettiin myös sarja mutanttiksyylanaaseja, joissa oli mutaatiot Gln-125 → Ala ja Ile-129 → Glu. Näillä uusilla mutanteilla entsyymiaktiivisuus oli kohonnut korkeammassa lämpötiloissa verrattuna niiden esiasteksyylanaaseihin (katso kuviot 7 – 9). Nämä sisältävät entsyymit (katso taulukko 2 modifioitujen entsyymien täydellisen kuvauksen suhteen):

TrX-HML-125A;
TrX-HML-125A129E;
TrX-HML-GRAE;
15 TrX-HML-AHAE;
TrX-HML-GHAE;
TrX-HML-ARAE;
TrX-HML-GPHAE; ja
TrX-HML-GPRAE

20 Joissain organismeissa näiden modifioitujen ksylanaasien ekspressio ja saanto voi alentua tai ei ole ollenkaan mahdollista johtuen sellaisten proteiineissa olevien kohtien syntymisestä, jotka alentavat modifioitujen ksylanaasin ekspressiota tai saantoa. Tämä alentunut saanto voi vaihdella riippuen isännästä, jossa modifioitua entsyymiä ekspressoidaan. Esimerkiksi, mutta ei rajoittaen, muutokset aminohapposekvenssissä 25 voivat tuottaa proteolyttisen katkaisukohdan, jonka proteaasi tunnistaa tietyissä, mutta ei kaikissa isännissä. Tämän ongelman ratkaisemiseksi vierekkäiset aminohapot halutun mutaatiokohdan toisella tai molemmilla puolilla voidaan modifioida modifioitujen ksylanaasin minkä tahansa isäntäspesifisen ekspressiovaikeuden ja saantovaikeuden hoitamiseksi. Ne lisäaminohapot, joita muutetaan, eivät edullisesti kumoa alunperin substituoidun aminohapon vaikutusta entsyymien termofiilisyyden tai alkalofiilisyyden tai sekä termofiilisyyden että alkalofiilisyyden kohoamiseen. 30 Esimerkiksi, mutta ei rajoittaen millään tavalla, substituution L105R käsittävä modifioitu ksylanaasi voidaan tuottaa *E. colissa*, tämän entsyymien saanto on kuitenkin alentunut *Trichodermassa* ja *Aspergillusissa* johtuen endogeenisestä KEX-proteasiaktiivisuudesta, joka tunnistaa aminohappoyhdistelmän “Lys-Arg” kohdissa 104 ja 105, vastaavasti. Tässä tapauksessa aminohappo kohdassa 104 voidaan substi-

5 tuoida vaihtoehtoisella aminohapolla, esimerkiksi ei-polaarisella aminohapolla, kuten modifioituissa TrX-HML-GPHAE- tai TrX-HML-GPRAE-ksylanaaseissa. Kuten kuviossa 14 on esitetty, kohdan 104 Lys:n substituuutio Pro:lla ei vaikuta näiden modifioitujen ksylanaasien termofiilisyyteen tai alkalofiilisyyteen. On ymmärrettävä, että muut proteaasit voivat tunnistaa muita aminohappoyhdistelmiä, joita voidaan tuottaa, kun valmistetaan tässä kuvattuja modifioituja ksylanaaseja. Sen vuoksi esillä oleva keksintö koskee myös modifioitua ksylanaasia, joka käsittää yhden tai useamman substituoitun aminohapon tässä kuvattujen aminohappojen vieressä.

10 Sen vuoksi tämä keksintö sisältää modifioitun ksylanaasin, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29 ja ainakin yhden seuraavista:

ei-polaarisen aminohapon kohdassa 75, 104 tai 125 tai niiden yhdistelmän;
polaarisen aminohapon kohdassa 105; ja
happaman aminohapon kohdassa 129.

15 Edullisesti, aminohappo kohdassa 75 on Ala, aminohappo kohdassa 125 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat Ala, Cys, Gly ja Thr, aminohappo kohdassa 125 on Glu, aminohappo kohdassa 105 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat His, Lys ja Arg ja aminohappojäännös kohdassa 104 on Pro.

Ksylanaasin alkalofiilisyyden kohottaminen

20 Kuviossa 10 on esitetty pH-olosuhteiden vaikutus TrX-75A-yksittäismutantti-ksylanaasin entsymaattiseen aktiivisuuteen. TrX-75A-mutanttiksylanaasi sisältää 55 °C:ssa kohoneen aktiivisuuden pH:ssa, joka on yli 5,5 verrattuna natiiviin TrX-entsyymiin samoilla pH-alueilla. Samanlainen parantunut vaikutus alkalofiilisyyteen havaittiin myös TrX-HML-75A:lla, jossa Ser-jäännös kohdassa 75 oli substituoitu Ala-jäännöksellä (TrX-75A), verrattuna TrX-HML-emoksylanaasiin pH-olosuhteissa välillä 6,5 ja 7 (kuvio 11).

25 Alkalofiilisyyden kohoaminen yhdessä aktiivisuuden kohoamisen kanssa pH:ssa, joka oli noin 5,2 – noin 6,5, havaittiin myös TrX-157D-161R-162H-165H:lla, kun sitä verrattiin natiivin TrX:n vastaavaan samalla pH-alueella (kuvio 16).

30 L105H-mutaatio TrX-HML-105H-mutanttiksylanaasissa kohotti myös entsymaattisen aktiivisuuden suuremmaksi kuin TrX-HML-emoksylanaasin vastaava pH:ssa 6,5 ja 7,0 (kuvio 11). Mielenkiintoista on, että TrX-HML-75A-105H-yhdistelmä-mutanttiksylanaasi osoitti suuremman entsymaattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-75A- tai TrX-HML-105H-yksittäismutanttiksylanaasit pH:ssa 6,5 ja 7,0 (ku-

vio 11), joka vihjaa, että S75A-mutaation ja L105H-mutaation vaikutukset ksylanaasin alkalofiilisyyteen ovat additiivisia tai täydentäviä.

Rakennettiin geneettisesti sarja kohtaan 105 modifioituja ksylanaaseja niiden aminohappojäännösten määrittämiseksi, jotka edistävät modifioitujen ksylanaasien alkalofiilisyyden kohoamista (kuvio 12). Kolme kohdan 75 suhteen mutatoitua ksylanaasia, TrX-HML-105H, TrX-HML-105R ja TrX-HML-105K, osoittivat suuremman entsymaattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-esiasteksylanaasi pH-olosuhteissa 6,5 – 7,0. Yhteenvetona mutaatiot, jotka johtavat alkalofiilisyyden kohoamiseen, edustavat muutosta haarautuneen ketjun sisältävästä suhteellisen hydrofobisesta Leu-jäännöksestä jäännökseksi, joka on hydrofiilinen, positiivisesti varattu tai emäksinen.

Sitoutumatta teoriaan, hydrofiiliset, positiivisesti varatut tai emäksiset jäännökset voivat tehostaa molekyylinsisäistä pakkautumista muiden atomien kanssa, jotka sijaitsevat vierekkäin samalla alueella ksylanaasin tertiaarirakenteessa. Nämä jäännökset voivat stabiloida entsyymien kolmiulotteista rakennetta sellaisia rakenteellisia häiriöitä vastaan, jotka voivat syntyä molekyylissä molekyylin muiden alueiden useiden aminohappojen ionisoituvien sivuketjujen titrauksen välityksellä. Jälleen sitoutumatta teoriaan, sivuketjun emäksinen ionisoitunut muoto voi olla tärkeä muutettaessa entsyymien pH-aktiivisuusprofiilia, koska pH:ssa välillä 6 – 7 Arg- ja Lys-jäännöksillä on sivuketjut, jotka todennäköisesti jäävät protonoituneiksi. Tälle päinvastaisesti His-jäännökset, joiden pKa-arvo imidatsoliryhmän suhteen on liuoksessa noin 6, voivat olla läsnä joko protonoituneena tai protonoitumattomana muotona. Alan ammattimiehet kuitenkin tietävät, että aminohapposivuketjua ympäröivien substituenttien polaarisuus voi vaikuttaa sen pKa-arvoon. Esimerkiksi His-jäännöksen sivuketjun pKa-arvo voi proteiinin polaarisisella tai hydrofobisella alueella olla 6, kun taas saman sivuketjun pKa-arvo voi hydrofobisessa tai apolaarisessa ympäristössä olla 7 tai suurempi.

Toisessa tutkimuksessa rakennettiin mutaatiot TrX-HML:n kohtaan 75 sen määrittämiseksi, mitkä jäännökset edistävät alkalofiilisyyden kohoamista modifioiduissa ksylanaaseissa (kuvio 13). Neljä ksylanaasia, joissa oli mutaatiot kohdassa 75, TrX-HML-75C-105R, TrX-HML-75A-105R, TrX-HML-75G-105R ja TrX-HML-75T-105R, osoittivat suuremman entsymaattisen aktiivisuuden pH-olosuhteissa 6,0, 6,5 ja 7,0 kuin TrX-HML- ja TrX-HML-105R-esiasteksylanaasit.

Mutaatiot Q125A ja I29E, jotka tehostivat ksylanaasien termofiilisyyttä, ovat yhteen sopivia yllä kuvattujen kohtien 75 ja 105 mutaatioiden kanssa, koska yhdistelmä-

mutantit, kuten TrX-HML-75G-105H-125A129E, joka sisältää nämä kaksi mutaatiota, säilyttivät yleensä TrX-HML-75G-105H-esiasteksylynaasin pH/aktiivisuusprofiilin (kuvio 14).

- 5 Rakennettiin myös sarja mutanttiksylynaaseja, joissa oli mutaatiot Gln-125 → Ala ja Ile-129 → Glu. Näillä uusilla mutanteilla entsyymiaktiivisuus oli kohonnut korkeammassa pH:ssa verrattuna niiden esiasteksylynaaseihin (katso kuviot 11 – 14 ja 17 – 19). Nämä sisältävät entsyymit (katso taulukko 2 modifioitujen entsyymien täydellisen kuvauksen suhteen):

- TrX-HML-125A;
 10 TrX-HML-125A129E;
 TrX-HML-GRAE;
 TrX-HML-AHAE;
 TrX-HML-GHAE;
 TrX-HML-ARAE;
 15 TrX-HML-GPHAE;
 TrX-HML-GPRAE;
 TrX-HML-AHAE-RR;
 TrX-HML-AHAE-RRR;
 TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH;
 20 TrX-HML-AHA-RR-DRHH; ja
 TrX-HML-AHAE-RR-DRHH

- 25 Mutanttiksylynaasit, jotka käsittävät emäksisen aminohapon kohdassa 132 ja 135 yllä kuvattujen substitutioiden lisäksi, sisältäen HML-75A-105H-125A-129E:n, osoittivat kohoamisen alkalofiilisyydessä. Samalla tavalla mutantti, joka käsittää emäksisen aminohapon kohdissa 132, 135 ja 144, osoitti myös kohoamisen alkalofiilisyydessä. Esimerkit modifioiduista ksylynaaseista, joissa on nämä mutaatiot, sisältävät TrX-HML-AHAE-RR:n ja TrX-HML-AHAE-RRR:n (kuvio 17).

- 30 Ksylynaaseihin tehtiin lisämodifikaatioita entsyymin alkalofiilisyyden kohottamiseksi. Esimerkiksi happaman aminohapon substitutio kohdassa 157, emäksisen aminohapon substitutio kohdissa 161, 162 ja 165 niin, että läsnä oli emäksiset aminohapposubstitutiot kohdissa 132, 135 ja 144 tai ilman niitä, kohotti myös alkalofiilisyyttä. Esimerkiksi TrX-HML-AHAE-RR-DRHH tai TrX-HML-AHAE-RRR-DRRH kumpikin osoitti alkalofiilisyyden kohoamisen (kuviot 18, 19) ja niiden MEP oli noin 7,0 (kuvio 20), kun niitä verrattiin TrX-HML-AHAE:hen, jonka
 35 MEP on noin 6,5, tai TrX:ään, jonka MEP on noin 5,6.

Lisäkohoaminen alkalofiilisyyteen verrattuna yllä kuvattuihin saatiin myös substituoimalla hapan aminohappo kohdassa 157 ja substituoimalla emäksinen aminohappo kohdissa 135, 144, 161, 162, 165, ja jättämällä aminohapot kohdissa 129 ja 132 niiden luonnollisiksi aminohapoiksi, esimerkkinä TrX-HML-AHA-RR-DRHH (kuviot 18 ja 19). Tämän entsyymin MEP on noin 7,4.

TrX-HML-AHAE:n pH-optimin laajuus on paljon suurempi kuin TrX:n pH-profiili (katso esim. kuvio 19). Useiden esillä olevan keksinnön mukaisten modifioitujen ksylanaasien pH-optimin laajuus on sellainen, joka lähentelee natiivin TrX:n pH-optimin laajuutta, näiden modifioitujen ksylanaasien pH-optimi on kuitenkin siirtynyt niin, että kohoaminen on ainakin noin yksi pH-yksikkö (kuvio 19) verrattuna TrX:n vastaavaan. TrX:llä on 80 % sen optimaalisesta aktiivisuudesta pH:ssa, joka on noin 4,8 – noin 5,6 (pH-optimi 80 % aktiivisuudella 0,8 pH-yksikön alueella). TrX-HML-AHAE:llä pH-alue, jossa sillä on 80 % sen optimaalisesta aktiivisuudesta, on paljon leveämpi sen ollessa noin 4,8 – noin 6,5 (noin 1,7 pH-yksikköä). TrX-HML-AHAE-RR:n ja TrX-HML-AHAE-RRR:n pH-alue, jossa niillä on 80 % optimaalisesta aktiivisuudesta, on noin 5,4 – noin 6,6 (noin 1,2 pH-yksikköä, kuvio 17), TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH:lla ja TrX-HML-AHAE-RR-DRHH:lla tämä pH-alue on noin 5,8 – 7,0 (noin 1,2 pH-yksikköä) ja TrX-HML-AHA-RR-DRHH:lla se on noin 5,9 – noin 7,4 (noin 1,5 pH-yksikköä; katso kuviot 18 ja 19).

Sen vuoksi tämä keksintö koskee myös modifioitua ksylanaasia, joka käsittää His:n kohdassa 10, Met:n kohdassa 27, Leu:n kohdassa 29 ja ainakin yhden seuraavista:

ei-polaarisen aminohapon kohdassa 75, 104 tai 125 tai niiden yhdistelmän; polaarisen aminohapon kohdassa 105; happaman aminohapon kohdissa 129 ja 157; ja emäksisen aminohapon kohdissa 132, 135, 144, 161, 162 tai 165 tai niiden yhdistelmän.

Edullisesti, aminohappo kohdassa 75 on Ala, aminohappo kohdassa 125 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat Ala, Cys, Gly ja Thr, aminohappo kohdassa 125 on Glu. Aminohappo kohdassa 105 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat His, Lys ja Arg, aminohappojäännös kohdassa 104 on Pro, aminohappo kohdassa 132, 135, 144 ja 161 on Arg, aminohappo kohdassa 157 on Asp ja aminohappo kohdassa 162 ja 165 on His.

Yhteenvetona, TrX-mutanttiksylanaasit, joilla on parantunut alkalofiilisyyttä, voidaan rakentaa:

- i) mutatoimalla Ser75 pieneksi ei-polaariseksi jäännökseksi, esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, Ala:ksi. Lisäksi, kohta 75 voidaan substituoida polaarisilla jäännöksillä, esimerkiksi, mutta ei niihin rajoittuen, Gly:llä, Cys:llä ja Thr:llä;
- ii) mutatoimalla Leu105 emäksiseksi jäännökseksi, kuten, mutta ei niihin rajoittuen,
5 Arg:ksi, Lys:ksi tai His:ksi;
- iii) mutatoimalla Gln125 Ala:ksi;
- iv) mutatoimalla Ile129 Glu:ksi;
- v) mutatoimalla Ala132, Tyr135, His144, Gln161, Gln162, Thr165 tai niiden yhdistelmä emäksiseksi aminohapoksi, esimerkiksi Arg:ksi, Lys:ksi tai His:ksi;
- 10 vi) mutatoimalla Asn157 happamaksi aminohapoksi, esimerkiksi Asp:ksi tai Glu:ksi;
- vii) yhdistämällä kohdassa i) kuvatut mutaatiot kohdassa ii) mainittujen kanssa kohdan iii) mukaisen entsyymin muodostamiseksi termofiilisyyden ja alkalofiilisyyden parantamiseksi; tai
- 15 viii) yhdistämällä yllä olevissa kohdissa i) – vi) kuvatut mutaatiot HML-sarjan mutaatioiden kanssa, kuten yllä on kuvattu (katso myös US 5 759 840).

Edellä olevan kuvauksen ei ole tarkoitettu rajoittavan vaadittua keksintöä millään tavalla, lisäksi, keskustellut ominaisuuksien yhdistelmät eivät välttämättä ole täysin tarpeellisia keksinnön suorittamiseksi.

20 **Esimerkit**

Esillä olevaa keksintöä kuvataan edelleen seuraavissa esimerkeissä. On kuitenkin ymmärrettävä, että nämä esimerkit on annettu ainoastaan kuvaavia tarkoituksia varten eikä niitä tule pitää millään tavalla esillä olevan keksinnön piiriä rajoittavina.

Esimerkki 1 *Trichoderma reesei* -mutanttiksylanaasien rakentaminen

- 25 Yhdistelmä-DNA-perusmenetelmät, kuten plasmidin valmistus, restriktioentsyymidigestio, polymeraasiketjureaktio, oligonukleotidifosforylaatio, ligaatio, transformatio ja DNA-hybridisaatio, suoritettiin alan ammattimiesten hyvin tuntemien menetelmien mukaisesti (esim. Sung et al., 1986) tai entsyymien ja käyttöpakkausten valmistajan ohjeiden mukaisesti. Monien entsyymien puskurit hankittiin käyttöpak-
- 30 kausten mukana tai ne valmistettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Restriktioent-

- syymit, T4 polynukleotidikinaasi ja T4 DNA ligaasi hankittiin New England Bio-Labs Ltd. -valmistajalta, Mississauga, Ont. GeneAmp PCR -reagenssikäyttöpakkaus hankittiin Perkin-Elmer-valmistajalta. Esiasteplasmidi pXYbc, joka on pUC-tyypin plasmidi, johon on insertoitu *Bacillus circulans* -ksylanaasigeeni, on valmistettu ja
- 5 julkaistu aiemmin (Sung et al., 1993; Campbell et al., US-patentti nro 5 405 769). Yleisesti käytettyä *E. coli* -kantaa HB101 (Clonetech Lab, Palo Alto, CA) käytettiin kaikkien geenirakenteiden transformaatio- ja ekspressioisäntänä. Koivun ksylaani ja Remazol Brilliant Blue R-D -ksylaani hankittiin Sigma-valmistajalta (St. Louis, Mo). Hydroksibentsoehappohydratsidi (HBAH) hankittiin Aldrich-valmistajalta.
- 10 Oligonukleotidit valmistettiin APPLIED BIOSYSTEM DNA -syntetisaattorilla (malli 380B). Kaikki ksylanaasin entsymaattiset testit suoritettiin peitetyssä kierto-vesihauteessa (Haake tyyppi F4391) ja sen lämpötilat pidettiin rajoissa $\pm 0,1$ °C.

1 – 1: Synteettisen TrX-sekvenssin (sekvenssi nro 39) sisältävän esiasteplasmidin pTrX rakentaminen

- 15 Esiasteplasmidi pTrX, jossa on alla kuvatut mutaatiot, on julkaistu aiemmin (Sung et al., 1995). Tämä plasmidi on peräisin pUC119-plasmidista, jossa on synteettinen nukleotidisekvenssi, joka koodittaa *Trichoderma reesei* -ksylanaasia (TrX; kuvio 2). Tämän ksylanaasin ja muiden seuraavaksi kuvattujen mutanttiksylanaasien ekspres-
- 20 sio on pUC-plasmidin *lac Z* -promoottorin säätelyn alaisuudessa. *Trichoderma*-ksylanaasigeenin täydellinen rakentaminen vaati kaksi vaihetta, ensin alueen (92 – 190; Tr2-numerointi) lisäyksen, sitten alueen (1 – 92; Tr2-numerointi) lisäyksen. Menetelmä tämän geenin rakentamiseksi on rutiinia ja identtinen monien muiden geenien rakentamiseksi julkaistun standardimenetelmän kanssa. Menetelmässä tarvitaan päällekkäin menevien ksylanaasia koodittavien synteettisten oligonukleotidien ent-
- 25 symaattinen fosforylaatio. Tämän jälkeen suoritetaan niiden ligoiminen sopivasti katkaistuun plasmidiin.

TrX (92 – 190) -aluetta varten suunniteltiin kymmenen päällekkäin menevää oligonukleotidia (katso kuvio 2):

- 30 XyTv-101, sekvenssi nro 29;
 XyTv-102, sekvenssi nro 30;
 TrX-103, sekvenssi nro 31;
 XyTv-104, sekvenssi nro 32;
 XyTv-105, sekvenssi nro 33;
 XyTv-106, sekvenssi nro 38;
 35 XyTv-107, sekvenssi nro 37;

TrX-108, sekvenssi nro 36;
 XyTv-109, sekvenssi nro 35; ja
 XyTv-110, sekvenssi nro 34

niin, että niiden kodonikäyttöfrekvenssi matki *E. coli*n vastaavaa. Kahden päissä sijaitsevan oligonukleotidin kohesiiviset SallI- ja BglII-päät sallivat näiden kymmenen fragmentin entsyymaattisen ligoimisen linearisoituun plasmidiin pXYbc. Nämä kymmenen oligonukleotidia (50 pmol, 1 µl kutakin), jotka koodittivat *Trichoderma*-ksylanaasin aluetta TrX (92 – 190), fosforyloitiin seoksessa, joka sisälsi 10X kinaasistandardipuskuria (0,4 µl), 1 mM ATP:tä (4 µl), T4 DNA -kinaasia (5 yksikköä) ja vettä (3 µl). Fosforylaatioreaktiot suoritettiin yhden tunnin ajan 37 °C:ssa. Sitten liuokset yhdistettiin ja kuumennettiin 70 °C:seen 10 minuutiksi. Kun yhdistettyjen liuosten oli annettu hitaasti jäähtyä huoneenlämpötilaan, ne lisättiin seokseen, jossa oli 4 mM ATP:tä (3,5 µl), EcoRI-HindIII-linearisoitua plasmidia pUC119 (0,1 pmol) ja T4 DNA -ligaasia (3,5 µl), ja niitä inkuboitii 12 °C:ssa 20 tuntia. Pienet määrät ligaatioseosta käytettiin transformoimaan *E. coli* HB101 YT-maljoilla (8 g hiivauutetta, 5 g bacto-tryptonia, 5 g NaCl:ia, 15 g agaria 1 litrassa vettä), joka sisälsi ampisilliinia (100 mg/l).

Hybridisaatiokoettimen valmistamiseksi yksi oligonukleotideista, esimerkiksi XyTv-110 (10 pmol, 1 µl), fosforyloitiin ³²P-ATP:llä (10 pmol, 3 µl) käyttäen T4 DNA -kinaasia (1 µl), 10X kinaasipuskuria (1 µl) ja vettä (4 µl), 37 °C:ssa yhden tunnin ajan.

Transformantit valittiin satunnaisesti hybridisaatioanalyysiin. Pesäkkeet kasvatettiin YT-maljoilla ampisilliinin kanssa yli yön ja ne siirrettiin nailonfilttereille. Sitten ne denaturoitiin 0,5 N NaOH – 1,5 M NaCl -liuoksella (10 min) ja neutraloitiin 0,5 N Tris-HCl (pH 7,0) – 1,5 M NaCl -liuoksella (10 min). Kun oli suoritettu ultraviolettisäteilytys 254 nm:ssa kahdeksan minuuttia, filtit pestiin 6X SSC – 0,05 % Triton X-100 -liuoksella 30 minuutin ajan. Soluroskat pyyhittiin pois täydellisesti. Kun oli pidetty toiset 30 minuuttia tuoreessa liuoksessa, rinnakkaisfiltit siirrettiin erikseen eri seoksiin, jotka olivat 6X SSC – 1 % dekstraanisulfaatti – 0,05 % Triton X-100 – 1X Denhardt-hybridisaatioliuos. Filtille lisättiin ³²P-leimattu koetin. Kun oli pidetty 16 tuntia 45 °C:ssa, filtti pestiin kaksi kertaa viisi minuuttia 6X SSC – 0,05 % Triton X-100 -liuoksella huoneenlämpötilassa ja sitten 65 °C:ssa 30 minuuttia. Välimuotoplasmidin pBcX-TrX positiivisesti hybridisoituvat kloonit tunnistettiin autoradiografialla.

Edellä olevaa menetelmää, joka sisältää synteettisten päällekkäin menevien oligonukleotidien fosforylaation ja niiden ligoimisen linearisoituun plasmidiin, käytettiin TrX (1 – 92) -alueen kokoamiseksi ja sen jälkeen kasettimutageneesissa, jolla muodostettiin tämän keksinnön muut mutanttiksylanaasit.

- 5 Alueen TrX (1 – 92; Tr2-numerointi) kokoamiseksi täyspitkän *Trichoderma reesei* -ksylanaasi II -geenin (TrX) valmistamiseksi välimuotoplasmidi pBcX-TrX linearisoitiin NheI- ja KpnI-endonukleaaseilla BcX (1 – 83) -DNA-insertin vapauttamiseksi. Kohesiivisten NheI- ja KpnI-päiden avulla ligoitiin kahdeksan päällekkäin menevää oligonukleotidia:

- 10 TrX-1, sekvenssi nro 21;
 XyTv-2, sekvenssi nro 22;
 TrX-3, sekvenssi nro 23;
 XyTv-4, sekvenssi nro 24;
 XyTv-5, sekvenssi nro 28;
 15 TrX-6, sekvenssi nro 27;
 XyTv-7, sekvenssi nro 26; ja
 TrX-8, sekvenssi nro 25

jotka koodittavat sekvenssiä TrX (1 – 92), linearisoituun plasmidiin pBcX-TrX (ku-
 20 vio 2) yllä kuvatulla menetelmällä. Uusi plasmidi pTrX sisälsi näin ollen synteettisen TrX-geenin (sekvenssi nro 39).

Kaikki alla kuvatut mutanttiksylanaasigeenit on rakennettu kasettimutageneesimenetelmällä. Kasettimutageneesimenetelmä oli identtinen yllä kuvatun geenikokoa-
 25 mismenetelmän kanssa. Yleisesti, kasettimutageneesi sisälsi vaiheet, joissa (i) fosforyloitiin päällekkäin menevät synteettiset oligonukleotidit entsymaattisesti, (ii) ligoitiin synteettiset oligonukleotidit linearisoidun plasmidin kanssa, (iii) transformoitiin plasmidi kompetentteihin *E. coli* HB101 -soluihin, (iv) tunnistettiin mutanttitransformantit hybridisoiden leimatulla oligonukleotidilla ja (v) varmistettiin mutaatio dideoksinukleotidisekvensoinnilla.

1 – 2: Esiasteplasmidin pTrX-HML rakentaminen

- 30 Esiasteplasmidin pTrX-HML rakentaminen on kuvattu yksityiskohtaisesti US-patentissa nro 5 759 840 (katso esimerkki 1N, johon tässä viitataan; plasmidin nimi pN1-TX13). TrX-HML käsittää natiivin TrX-ksylanaasin, jossa on kolme mutaatiota, N10H (Asn kohdassa 10 on korvattu His:llä), Y27M ja N29L. Ensimmäiset 30 aminohappoa, jotka käsittävät mutaatiot N10H, Y27M ja N29L, on esitetty alla.

TrX		1	2	3	4	5	6	7	8
aminohappo		Q	T	I	Q	P	G	T	G

5'-CT AGC TAA GGA GG CTG CAG ATG CAA ACA ATA CAA CCA GGA ACC GGT
3'-G ATT CCT CC GAC GTC TAC GTT TGT TAT GTT GGT CCT TGG CCA
 NheI PinAI

9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Y	H	N	G	Y	F	Y	S	Y	W	N	D	G	H	G	G

TAC CAC AAC GGT TAC TTT TAC AGC TAT TGG AAC GAT GGC CAT GGA GGC
 ATG GTG TTG CCA ATG AAA ATG TCG ATA ACC TTG CTA CCG GTA CCT CCG

25	26	27	28	29	30
V	T	M	T	L	G

GTC ACA ATG ACT CTG GGG
 CAG TGT TAC TGA GAC CCC

1 – 3: Deleetioplasmidin pTrX (1 – 113) rakentaminen

- Plasmidi pTrX (1 – 113) käsittää sekvenssin nro 39 nukleotidit 1 – 113 (TrX-sekvenssin nukleotidit 1 – 113) eikä pysty ekspressoimaan aktiivista ksylanaasia. Sel-
- 5 laiset transformantit varmistetaan sillä, että niiltä puuttuu kirkas vyöhyke tai kehä transformanttipesäkkeiden ympäriltä Blue-ksylaanimarjoilla.

- Uusi plasmidi pTrX (1 – 113) rakennettiin (i) poistamalla pTrX-plasmidin koodittava TrX (114 – 190) -sekvenssi katkaisemalla BamHI- ja BglII-restriktioentsyymeillä, (ii) ligoimalla linearisoidun plasmidin identtiset kohesiiviset päät yhteen,
- 10 (iii) transformoimalla kompetentteihin *E. coli* HB101 -soluihin maljaamalla sen jälkeen YT-maljalle (joka sisälsi 5 g hiivauutetta, 3 g bacto-tryptonia, 5 g NaCl:ia, 15 g agaria 1 litrassa vettä, 1 g Remazol Brilliant Blue R-D -ksylaania ja ampisilliinia 100 mg/l), (iv) tunnistamalla mutanttitransformantit ksylanaasiaktiivisuuden häviämisen avulla (pesäkkeiden ympärillä ei ollut kirkasta vyöhykettä tai kehää Blue-
- 15 ksylaanimarjalla, kun oli kasvatettu yli yön 40 °C:ssa) ja (v) varmistamalla mutaatioidideoksinukleotidisekvensoinnilla. Menetelmä näille kullekin vaiheelle oli samanlainen kuin yllä kuvatulle geenikokoamiselle.

1 – 4: Deleetioplasmidin pTrX-HML (1 – 113) rakentaminen

- Plasmidi pTrX-HML (1 – 113) on samanlainen kuin plasmidi pTrX (1 – 113), mutta
- 20 se sisältää kolme mutaatiota kohdilla 10, 27 ja 29 (Tr2-numerointi), jotka ovat N10H, Y27M ja N29L (kuten yllä on kuvattu). Plasmidi rakennettiin samalla menetelmällä kuin on kuvattu plasmidin pTrX (1 – 113) rakentamiseksi (katso yllä) niin,

että aluetta TrX (114 – 190) koodittava sekvenssi deletoititiin. Plasmidi pTrX-HML (1 – 113) ei ekspressoisi aktiivista ksylanaasia.

1 – 5: Plasmidien pTrX-75A ja pTrX-105H rakentaminen

5 Kaikki seuraavat mutanttiksylanaasigeenit, jotka perustuvat pTrX-plasmidista peräisin oleviin plasmideihin pTrX (1 – 113)(katso esimerkki 1-3) ja pTrX-HML (1 – 113) (katso esimerkki 1-4), rakennettiin käyttäen kasettimutageneesia. Spesifisiä mutaatioita sisältäviä PCR-alukkeita käytettiin PCR-tuotteiden muodostamiseksi. Näitä PCR-tuotteita käytettiin täyspitkien ksylanaasigeenien C-pään sekvenssin valmistamiseksi (jäännökset 114 – 190; Tr2-numerointi). Kirkkaiden vyöhykkeiden tai kehien ilmestyminen Blue-ksylaania sisältäville maljoille maljattujen transformanttipesäkkeiden ympärillä osoitti, että nämä pesäkkeet ekspressoivat natiivia ksylanaasia ja näin se muodostaa markkerin klooneille, jotka ekspressoivat toimivaa TrX-mutantientsyymiä.

15 Menetelmä näiden plasmidien rakentamiseksi on samanlainen kuin aiemmin kuvattu menetelmä geeninkokoamiselle (yllä). Menetelmä sisälsi vaiheet, joissa:

i) suoritettiin PCR-reaktio alukeoligonukleotideilla, joissa oli spesifiset mutaatiot kohdassa 75 (plasmidin pTrX-75A tapauksessa) tai kohdassa 105 (plasmidin pTrX-105H tapauksessa),

20 ii) katkaistiin PCR-tuote toisesta päästä HindIII-restriktioentsyymillä ja toisesta päästä KasI- tai EcoRI-restriktioentsyymillä,

iii) ligoitiin restriktiofragmentit HindIII/KasI- tai EcoRI-linearisoituun deletioplasmidiin,

iv) transformoitiin kompetentteihin *E. coli* HB101 -soluihin,

25 v) tunnistettiin ksylanaasiaktiivisuutta ekspressoivat mutanttitransformantit (jonka osoitti kirkkaan vyöhykkeen tai kehän ilmestyminen sellaisten pesäkkeiden ympärille, jotka oli maljattu Blue-ksylaania sisältävälle ravintoalustalle), ja

vi) varmistettiin mutaatio dideoksinukleotidisekvenssoinnilla.

30 Nämä kaksi ksylanaasimutanttia, TrX-75A ja TrX-105H, käsittävät TrX-sekvenssin sillä poikkeuksella, että Ser kohdassa 75 korvattiin Ala-jäännöksellä (S75A) plasmidissa TrX-75A ja Leu kohdassa 105 korvattiin His-jäännöksellä (L105H) plasmidissa TrX-105H.

PCR-alukkeet, joita käytettiin näiden geneettisesti modifioitujen ksylanaasien muodostamiseksi (spesifinen mutaatio on esitetty lihavoituna), ovat:

PCR-oligonukleotidialukkeet:

TX-75A-1 (sekvenssi nro 40)

```

69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
  N  G  N  S  Y  L  A  V  Y  G  W  S  R
5' -T GGG AAT TCA TAC TTA GCC GTC TAT GGC TGG TCT AG
          EcoRI

```

TX-105H-1 (sekvenssi nro 41)

```

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
  T  G  A  T  K  H  G  E  V  T  S  D  G  S  5'-ACC
GGC GCC ACA AAA CAC GGC GAA GTC ACT AGT GAT GGA TCC
          KasI

```

5 PCR-käänteisaluke TX-C1 oli:

TX-C1 (sekvenssi nro 42)

```

183 184 185 186 187 188 189 190  ter
  G  S  A  S  I  T  V  S
CCA AGG CGA TCA TAA TGT CAC TCG ATT TCT AGA ACT TCG AAC CC-5'
                                BglI   HindIII

```

Sopiva PCR-templaatti, sopivat oligonukleotidialukkeet ja PCR-tuotteiden päät katkaisevat restriktioentsyymit on lueteltu alla olevassa taulukossa 3 – 1.

Taulukko 3 – 1

PCR-tuote	Ylävirran PCR-aluke	PCR-käänteisaluke	PCR-templaatti	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(a)	TX-75A-1	TX-C1	pTrX	EcoRI/HindIII
(b)	TX-105H-1	TX-C1	pTrX	KasI/HindIII

10

PCR-tuotteen (a) valmistamiseksi plasmidia pTrX käytettiin PCR-templaattina. Reaktioliuos sisälsi plasmidin pTrX DNA:ta (50 ng, 15 µl), 5 µl 10X puskuria (100 mM KCl, 100 mM ammoniumsulfaatti, 200 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM magnesiumsulfaatti, 1 % Triton X-100, 100 mg/ml BSA), 5 µl 5 mM dNTP-nukleotideja,

PCR-aluketta TX-75A (25 pmol, 2,5 µl) ja PCR-käänteisaluketta TX-C1 (25 pmol, 2,5 µl) ja vettä (19 µl).

- 5 Reaktio peitettiin paraffiiniöljyllä (50 µl) haihtumisen estämiseksi. Reaktioseos esilämmitettiin 94 °C:seen ilman entsyymiä 5 minuutiksi, sitten reaktioseos jäädytettiin 72 °C:seen. Sen jälkeen reaktioseokseen lisättiin DNA-polymeraasia (1 µl, 1 U). Reaktioseosta inkuboitiin PCR-laitteessa 30 sykliä, jotka olivat 94 °C, 1 minuutti, 55 °C, 2 minuuttia ja sitten 72 °C, 2 minuuttia. PCR-tuotteen saanto oli noin 1 µg 400 bp pituista fragmenttia. Tämä fragmentti puhdistettiin agarosegeelistä.

- 10 EcoRI/HindIII-linearisoitu PCR-tuote (a) (taulukko 3-1) ligoitiin EcoRI/HindIII-linearisoituun pTrX-plasmidiin muodostaen plasmidi pTrX-75A, joka käsittää täyspitkän ksylanaasin, jossa Ser kohdassa 75 on korvattu Ala:lla (S75A).

- 15 Samalla tavalla valmistettiin PCR-tuote (b) (taulukko 3-1) ja se linearisoitiin KasI- ja HindIII-restriktionukleaaseilla. Linearisoitu tuote (b) ligoitiin KasI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX plasmidin pTrX-105H muodostamiseksi, joka plasmidi käsittää täyspitkän ksylanaasin, jossa Leu kohdassa 105 on korvattu His:llä (L105H).

1 – 6: pTrX-HML-105H:n, pTrX-HML-105K:n ja pTrX-HML-105R:n rakentaminen

- 20 Kolme mutanttiksylanaasia, TrX-HML-105H, pTrX-HML-105K ja pTrX-HML-105R, ovat samanlaisia kuin TrX-HML paitsi, että niissä Leu kohdassa 105 on korvattu His:llä (L105H), Lys:llä (L105K) ja Arg:lla (L105R), vastaavasti. Kuten aiemmin on osoitettu, TrX-HML-ksylanaasi on samanlainen kuin TrX-ksylanaasi paitsi, että Asn kohdassa 10 on korvattu His:llä (N10H), Tyr kohdassa 27 on korvattu Met:llä (Y27M) ja Asn kohdassa 29 on korvattu Leu:lla (N29L).

- 25 Plasmidin pTrX-HML-105H rakentamiseksi käytettiin samanlaista PCR-tuotetta (b) kuin käytettiin plasmidin pTrX-105H syntetisoimiseksi. Plasmidien pTrX-HML-105K ja pTrX-HML-105R rakentamiseksi käytetyt mutaation (lihavoituna) sisältävät PCR-alukkeet on esitetty alla.

PCR-mutaatio-oligonukleotidialukkeet:

TX-105K-1 (sekvenssi nro 43)

```

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
   T   G   A   T   K   K   G   E   V   T   S   D   G   S
5' -ACC GGC GCC ACA AAA AAA GGC GAA GTC ACT AGT GAT GGA TCC
           KasI

```

TX-105R-1 (sekvenssi nro 44)

```

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
   T   G   A   T   K   R   G   E   V   T   S   D   G   S
5' -ACC GGC GCC ACA AAA AGA GGC GAA GTC ACT AGT GAT GGA TCC
           KasI

```

Sopiva PCR-templaatti ja sopivat alukkeet ja PCR-tuotteiden päät katkaisevat restriktioentsyymit on lueteltu alla (taulukko 3 – 2).

5 Taulukko 3 – 2

PCR-tuote	Ylävirran PCR-aluke	PCR-käänteisaluke	PCR-templaatti	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(c)	TX-105K-1	TX-C1	pTrX	KasI/HindIII
(d)	TX-105R-1	TX-C1	pTrX	KasI/HindIII

PCR-tuotteet (b) (taulukko 3 – 1), (c) ja (d) (taulukko 3 – 2) valmistettiin ja katkaistiin KasI- ja HindIII-restriktionukleaaseilla. Restriktiodigestioiden (b), (c) ja (d) tuotteet ligoitiin KasI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX-HML (1 – 113) plasmidien pTrX-HML-105H, pTrX-HML-105K ja pTrX-HML-105R muodostamiseksi, vastaavasti.

1 – 7: Plasmidien pTrX-HML-75A ja pTrX-HML-75A-105H rakentaminen

Kaksi mutanttiksylanaasia, TrX-HML-75A ja TrX-HML-75A-105H, ovat samanlaisia kuin TrX-HML paitsi, että niissä Ser kohdassa 75 on korvattu Ala:lla (S75A) rakenteessa TrX-HML-75A ja rakenteessa TrX-HML-75A-105H Ser kohdassa 75 on korvattu Ala:lla (S75A) ja Leu kohdassa 105 on korvattu His:llä (L105H).

Sopiva PCR-templaatti ja sopivat alukkeet ja PCR-tuotteiden päät katkaisevat restriktioentsyymit on lueteltu alla (taulukko 3 – 3).

Taulukko 3 – 3

PCR-tuote	Ylävirran PCR-aluke	PCR- käänteisaluke	PCR- templaatti	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(e)	TX-75A-1	TX-C1	pTrX-105H	EcoRI/HindIII

EcoRI/HindIII-katkaistut PCR-tuotteet (a) ja (e) (taulukot 3 – 1 ja 3 – 3, vastaavasti) valmistettiin ja ligoitiin KasI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX-HML (1 – 113) plasmidien pTrX-HML-75A ja pTrX-HML-75A-105H muodostamiseksi, vastaavasti.

1 – 8: pTrX-HML-75A-105R:n, pTrX-HML-75C-105R:n, pTrX-HML-75G-105R:n ja pTrX-HML-75T-105R:n rakentaminen

Ksylanaasimutantit TrX-HML-75A-105R, TrX-HML-75C-105R, TrX-HML-75G-105R ja TrX-HML-75T-105R ovat samanlaisia kuin TrX-HML-105R (joka käsittää mutaatiot N10H, Y27M, N29L ja L105R) paitsi, että niissä kussakin on lisäksi yksittäismutaatio S75A, S75C, S75G ja S75T, vastaavasti.

PCR-alukkeet, joissa on mutaatiot S75C (TX-75C-1; sekvenssi nro 45), S75G (TX-75G-1; sekvenssi nro 46) ja S75T (TX-75T-1; sekvenssi nro 47), on esitetty alla.

15 PCR-mutaatio-oligonukleotidialukkeet:

TX-75C-1 (sekvenssi nro 45)

```

69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
  N  G  N  S  Y  L  C  V  Y  G  W  S  R
5' -T GGG AAT TCA TAC TTA TGC GTC TAT GGC TGG TCT AG
      EcoRI

```

TX-75G-1 (sekvenssi nro 46)

```

69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
  N  G  N  S  Y  L  G  V  Y  G  W  S  R
5' -T GGG AAT TCA TAC TTA GGC GTC TAT GGC TGG TCT AG
      EcoRI

```

TX-75T-1 (sekvenssi nro 47)

```

69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
  N  G  N  S  Y  L  T  V  Y  G  W  S  R
5' -T GGG AAT TCA TAC TTA ACC GTC TAT GGC TGG TCT AG
      EcoRI

```

Sopiva PCR-templaatti ja sopivat alukkeet ja PCR-tuotteiden päät katkaisevat restriktioentsyymit on lueteltu alla (taulukko 3 – 4).

Taulukko 3 – 4

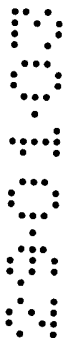
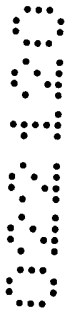
PCR-tuote	Ylävirran PCR-alue	PCR-käänteisalue	PCR-templaatti	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(f)	TX-75A-1	TX-C1	pTrX-HML-105R	EcoRI/HindIII
(g)	TX-75C-1	TX-C1	pTrX-HML-105R	EcoRI/HindIII
(h)	TX-75G-1	TX-C1	pTrX-HML-105R	EcoRI/HindIII
(i)	TX-75T-1	TX-C1	pTrX-HML-105R	EcoRI/HindIII

- 5 EcoRI/HindIII-katkaistut PCR-tuotteet (f), (g), (h) ja (i) (katso taulukko 3 – 4) valmistettiin ja ligoitiin EcoRI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX-HML (1 – 113) plasmidien pTrX-HML-75A-105R, pTrX-HML-75C-105R, pTrX-HML-75G-105R ja pTrX-HML-75T-105R muodostamiseksi, vastaavasti.

1 – 9: Plasmidien pTrX-HML-125A ja pTrX-HML-125A129E rakentaminen

- 10 Mutantit TrX-HML-125A ja TrX-HML-125A129E olivat identtisiä rakenteen TrX-HML kanssa paitsi, että niissä oli ylimääräiset mutaatiot Q125A ja I129E.

- 15 Intaktit mutanttigeenit koottiin ligoimalla yhteen kaksi DNA-sekvenssiä, jotka koodittivat alueita 1 – 121 ja 122 – 190. Aluetta 1 – 121 koodittava DNA-sekvenssi muodostettiin deletoimalla plasmidi pTrX-HML NheI- ja MluI-nukleaaseilla. Aluetta 122 – 190 koodittava DNA-sekvenssi muodostettiin PCR-reaktiolla. PCR-alukkeet, joissa oli mutaatio Q125A tai Q125A/I129E (lihavoituna), on esitetty alla.



TX-125A-1 (sekvenssi nro 48)

120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133
 Q R V N A P S I I G T A T
 5'-C CAA CGC GTT AAT GCG CCA TCG ATC ATT GGA ACC GCC ACC
 MluI

TX-125A129E-1 (sekvenssi nro 49)

120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133
 Q R V N A P S I E G T A T
 5'-C CAA CGC GTT AAT GCG CCA TCG ATC GAG GGA ACC GCC ACC
 MluI

Sopiva PCR-templaatti ja sopivat alukkeet ja PCR-tuotteen, joka on sekvenssi 122 – 190, päät katkaisevat restriktioentsyymit on lueteltu alla (taulukko 3 – 5).

5 Taulukko 3 – 5

PCR-tuote	Ylävirran PCR-aluke	PCR-kään-teisaluke	PCR-templaatti	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(j)	TX-125A-1	TX-C1	pTrX	MluI/HindIII
(k)	TX-125A129E-1	TX-C1	pTrX	MluI/HindIII

Nämä kaksi katkaistua DNA-sekvenssiä, 1 – 121 ja 122 – 190, jotka yhdessä muodostavat intaktin ksylanaasisekvenssin, ligoitiin NheI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX (1 – 113) plasmidien pTrX-HML-125A ja pTrX-HML-125A129E muodostamiseksi.

1 – 10: Plasmidin pTrX-HML-75G-105R-125A129E rakentaminen

Mutantti TrX-HML-75G-105R-125A129E oli identtinen rakenteen TrX-HML-75G-105R kanssa paitsi, että siinä oli ylimääräiset mutaatiot Q125A ja I129E.

Intaktit mutanttigeenit koottiin ligoimalla yhteen kaksi DNA-sekvenssiä, jotka koodittivat alueita 1 – 121 ja 122 – 190. Aluetta 1 – 121 koodittava DNA-sekvenssi valmistettiin deletoimalla plasmidi pTrX-HML-75G-105R alla luetelluilla restriktionukleaaseilla (taulukko 3-6).

Taulukko 3 – 6

Deleetiosekvenssi	Esiasteplasmidi	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(A)	pTrX-HML-75G-105R	NheI/MluI

Aluetta 122 – 190 koodittava DNA-sekvenssi oli sama MluI/HindIII-katkaistu PCR-tuote (k) kuin esimerkissä 1.9 (yllä).

- 5 Katkaistu PCR-tuote (k) ja deleetiosekvenssi (A) ligoitiin yhteen NheI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX (1 – 113) uusien alla lueteltujen plasmidien muodostamiseksi (taulukko 3 – 7).

Taulukko 3 – 7

Deleetiotuote	PCR-tuote	Uusi plasmidi
(A)	(k)	pTrX-HML-75G-105R-125A129E

- 10 1.11: Plasmidien pTrX-HML-75G-105H-125A129E, pTrX-HML-75A-105H-125A129E ja pTrX-HML-75A-105R-125A129E rakentaminen

Mutantit TrX-HML-75G-105H-125A129E, pTrX-HML-75A-105H-125A129E ja pTrX-HML-75A-105R-125A129E olivat identtisiä rakenteen TrX-HML-75G-105R-125A129E kanssa paitsi, että niissä oli sopivat mutaatiot kohdissa 75 (S75A tai S75G) ja 105 (L105H tai L105R).

Intaktit mutanttigeenit koottiin ligoimalla yhteen kaksi DNA-sekvenssiä, jotka koodittivat alueita 1 – 101 ja 102 – 190.

Aluetta 1 – 101 koodittavan DNA-sekvenssin valmistamiseksi sopivan plasmidin deleetiossa käytetyt restriktionukleaasit on lueteltu alla (taulukko 3 – 8).

- 20 **Taulukko 3 – 8**

Deleetiosekvenssi	Esiasteplasmidi	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(B)	pTrX-HML-75G-105R	NheI/KasI
(C)	pTrX-HML-75A-105R	NheI/KasI

Aluetta 102 – 190 koodittavan DNA-sekvenssin valmistamiseksi käytettiin polymeeraasiketjureaktiota. Sopivat PCR-alukkeet, joissa oli mutaatiot kohdassa 105, ja PCR-tuotteen pään katkaisemiseen käytetyt restriktioentsyymit on lueteltu alla (taulukko 3-9).

5 Taulukko 3 – 9 Plasmidi pTrX-HML-75G-105R-125A129E PCR-templaattina

PCR-tuote	Ylävirran PCR-aluke	PCR-käänteisaluke	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(l)	TX-105H-1	TX-C1	KasI/HindIII
(m)	TX-105R-1	TX-C1	KasI/HindIII

Katkaistu PCR-tuote [(l) tai (m)] ja yksi deleetiosekvensseistä [(B) tai (C)] ligoitiin NheI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX (1 – 113) alla lueteltujen uusien plasmidien muodostamiseksi (taulukko 3-10).

Taulukko 3 – 10

Deleetiotuote	PCR-tuote	Uusi plasmidi
(B)	(l)	pTrX-HML-75G-105H-125A129E
(C)	(l)	pTrX-HML-75A-105H-125A129E
(C)	(m)	pTrX-HML-75A-105R-125A129E

1.12: Plasmidien pTrX-HML-75G-104P105H-125A129E ja pTrX-HML-75G-104P105R-125A129E rakentaminen

15 Mutantit TrX-HML-75G-104P105H-125A129E ja pTrX-HML-75G-104P105R-125A129E olivat identtisiä rakenteiden TrX-HML-75G-105H-125A129E ja TrX-HML-75G-105R-125A129E kanssa vastaavasti paitsi, että niissä oli lisämutaatio Lys-104 → proliini (K104P).

20 Intaktit mutanttigeenit koottiin ligoimalla yhteen kaksi DNA-sekvenssiä, jotka koodittivat alueita 1 – 101 ja 102 – 190.

Aluetta 1 – 101 koodittava DNA-sekvenssi näillä kolmella uudella mutantilla oli sama deleetiosekvenssi (B) kuin esimerkissä 1.11 käytetty (yllä), joka valmistettiin katkaisemalla plasmidi pTrX-HML-75G-105R NheI- ja KasI-nukleaaseilla.

Aluetta 102 – 190 koodittavan DNA-sekvenssin valmistamiseksi käytettiin polymeeraasiketjureaktiota. Syntetisoitiin PCR-alkukeet, joissa oli mutaatiot jäännöksissä 104 ja 105 (lihavoitu).

PCR-mutaatio-oligonukleotidialukkeet:

TX-104P-105H-1 (sekvenssi nro 50)

```

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112
  T   G   A   T   P   H   G   E   V   T   S   D
5' ACC GGC GGC ACA CCA CAC GGC GAA GTC ACT AGT GAT GG
      KasI

```

TX-104P-105R-1 (sekvenssi nro 51)

```

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112
  T   G   A   T   P   R   G   E   V   T   S   D
5' ACC GGC GGC ACA CCA AGA GGC GAA GTC ACT AGT GAT GG
      KasI

```

5

Suoritettiin polymeeraasiketjureaktio. Sopivat alukkeet ja PCR-tuotteen pään katkaisuun käytetyt restriktioentsyymit on lueteltu alla (taulukko 1-11).

Taulukko 1 – 11 Plasmidi pTrX-HML-75G-105R-125A129E PCR-templaattina

PCR-tuote	Ylävirran PCR-alue	PCR-käänteisalue	Restriktioentsyymit PCR-tuotteelle
(n)	TX-104P-105H-1	TX-C1	KasI/HindIII
(o)	TX-104P-105R-1	TX-C1	KasI/HindIII

- 10 Katkaistu PCR-tuote (n tai o) ja deleetiosekvenssi (B) ligoitiin NheI/HindIII-linearisoituun plasmidiin pTrX (1 – 113) alla lueteltujen uusien plasmidien muodostamiseksi (taulukko 3 – 12).

Taulukko 3 – 12

Deleetiotuote	PCR-tuote	Uusi plasmidi
(B)	(n)	pTrX-HML-75G-104P-105H-125A129E
(B)	(o)	pTrX-HML-75G-104P-105R-125A129E

1.13: Plasmidien pTrX-157D-161R-162H-165H, pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-132R-135R, pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-132R-135R-144R, pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-132R-135R-144R-157D-161R-162H-165H, pTrX-HML-75A-105H-125A-135R-144R-157D-161R-162H-165H ja pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-135R-144R-157D-161R-162H-165H rakentaminen

Mutantit pTrX-157D-161R-162H-165H, pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-132R-135R, pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-132R-135R-144R, pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-132R-135R-144R-157D-161R-162H-165H, pTrX-HML-75A-105H-125A-135R-144R-157D-161R-162H-165H ja pTrX-HML-75A-105H-125A-129E-135R-157D-144R-161R-162H-165H valmistettiin oleellisesti, kuten edellä on kuvattu, käyttäen sopivia alukkeita ja templaatteja. Intaktit mutanttigeenit koottiin ligoimalla yhteen kaksi DNA-sekvenssiä, jotka koodittavat alueita 1 – 101 ja 102 – 190.

Esimerkki 2 Mutanttiksylanaasien karakterisointi

2-1: Ksylanaasien tuotto

Viljelyssä käytettiin 5 ml viljelmäymppiä, jota oli kasvatettu yli yön 2YT-alustassa (16 g bacto-tryptonia, 10 g hiivauutetta, 5 g NaCl:ia 1 litrassa vettä), joka sisälsi ampisilliiniä (100 mg/l), joka ympi lisättiin 2YT-alustaan (1 l), jossa oli ampisilliiniä. Viljelmiä kasvatettiin ravistellen (200 kierrosta minuutissa) 37 °C:ssa. Kuuden-

2 – 2: Mutanttiksylanaasien puhdistus

Soluista valmistettiin proteiininäytteet tekemällä soluista ensin uute jauhamalla 10 g solutahnaa 25 g kanssa alumiinipulveria. Kun oli jauhettu tasaiseksi seokseksi, lisättiin pienet määrät (5 ml) jääkylmää puskuria A (10 mM natriumasetaatti, pH 5,5, BcX-mutanteille) tai puskuria B (10 mM natriumasetaatti, pH 4,6, TX-mutanteille) ja seosta jauhettiin voimakkaasti lisäysten välillä. Alumiini ja soluroskat poistettiin sentrifugoimalla seosta voimalla 8000 x g 30 minuuttia.

Ennen pylväskromatografiaa supernatantin pH-arvoksi säädettiin 4,6 etikkahapolla ja se sentrifugoitiin kaiken sakan poistamiseksi. Seuraava pylväskromatografiame-

netelmä oli identtinen kaikille mutanttiksylanaaseille.

Happamoittamisen ja sentrifugoinnin jälkeen ksylanaasinäyte lisättiin 50 ml resiini-

tilavuuden sisältävään CM-Sepharose Fast Flow -kationinvaihtopylvääseen (Phar-

macia Biotech, Uppsala), joka oli tasapainotettu 10 mM natriumasetaatilla (pH 4,6). Ksylanaasi eluoitiin 250 ml lineaarisella gradientilla (0 – 0,6 M NaCl 10 mM natriumasetaatissa, pH 4,6) virtausnopeudella 1 ml/min. Ksylanaasit eluoituivat gradientin kohdalla 150 – 200 ml. Kerättyjen fraktioiden näytteet tutkittiin SDS-PAGE:lla ja ne fraktiot, joissa oli suurin osa ksylanaasista, yhdistettiin. Puhdistettu ksylanaasi kvantitoitiin spektrofotometrillä 280 nm:ssa käyttäen ekstinktiokerrointa, joka oli $54\,600 - 53\,400\text{ M}^{-1}$ useimmille TrX-mutanttiksylanaaseille. Tyypillisessä puhdistuksessa 10 g:sta soluja saatiin 25 mg ksylanaasia.

2 – 3: Standarditesti entsymaattisen aktiivisuuden mittaamiseksi

- 10 Kvantitatiivisessa testissä mitattiin niiden pelkistyvien sokeripäiden määrää, joka muodostui liukoisesta ksylaanista. Tämän testin substraatti oli koivuksylaanin fraktio, joka liuotettiin veteen 5 % koivunksylaanin suspensiosta (Sigma Chemical Co.). Kun liukenematon fraktio oli poistettu, supernatantti jäädytyskuivattiin ja sitä säilytettiin desikkaattorissa. Spesifisen aktiivisuuden mittausta suoritettiin seuraavasti: reaktioseoksia, jotka sisälsivät 100 µl ksylaania, joka oli aiemmin laimennettu testipuskuriin (50 mM natriumsitraatti, pH 5,5, tai testatun ksylanaasin optimi-pH) konsentraatioksi 30 mg/ml, 150 µl testipuskuria ja 50 µl testipuskuriin laimennettua entsyymiä, inkuboitiin 40 °C:ssa. Eri aikapisteissä otettiin 50 µl näytteet ja reaktio lopetettiin laimentamalla se 1 ml:aan 5 mM NaOH:ia. Pelkistyvien sokereiden määrä määritettiin hydroksibentsoehappohydratsidireagenssilla (HBAH)(Lever, 1972, Analytical Biochem. 47: 273 – 279). Entsyymien yhden aktiivisuusyksikön määritettiin olevan se määrä, joka muodosti 1 µmol pelkistyvää sokeria yhdessä minuutissa 40 °C:ssa.

- 25 Jotta voitiin verrata spesifisiä aktiivisuuksia mutanttiksylanaasien ja natiivin ksylanaasin välillä, mutanttiksylanaasin spesifinen aktiivisuus muutettiin suhteelliseksi aktiivisuudeksi. Suhteellinen aktiivisuus lasketaan prosenttina jakamalla mutantientsyymien spesifinen aktiivisuus natiivin ksylanaasin spesifisellä aktiivisuudella.

Taulukko 4 TrX-ksylanaasin ja natiivin ksylanaasin suhteellinen aktiivisuus 40 °C:ssa

Ksylanaasi	Suhteellinen aktiivisuus (%)
Natiivi TrX	100*
TrX-105H	97
TrX-75A	95
TrX-HML-75A-105H	95
TrX-HML-75A-105R	93

* Natiivin ksylanaasin spesifisen aktiivisuuden määritettiin olevan 770 U/mg.

- 5 Taulukossa 4 kuvatut tulokset osoittavat, että mutanttiksylanaasien spesifiset entsymaattiset aktiivisuudet 40 °C:ssa eivät ole muuttuneet merkittävästi verrattuna natiiviin ksylanaasiin.

Esimerkki 3: Mutanttiksylanaasien termofiilisyyys

- 10 Termofiilisyyys tutkittiin sen testaamiseksi, miten eri lämpötilat vaikuttavat liukoisen ksylaanin entsymaattiseen hydrolyysiin eri mutanttiksylanaaseilla.

- 15 Testimenetelmä oli samanlainen kuin standarditesti niin, että muutoksia tehtiin inkubaatiolämpötilassa ja -ajassa. Ksylanaasit (15 µg/ml) ja liukoinen ksylaanisubstraatti sekoitettiin 50 mM natriumsitraattipuskurissa, pH 5,5, ja niitä inkuboitin kiertovesihauteessa eri lämpötiloissa. Kolmenkymmenen minuutin inkubaation jälkeen määritettiin ksylaanista vapautuneiden pelkistyvien sokereiden määrä HBAH-analyysillä ja laskettiin suhteellinen aktiivisuus niin, että arvo 40 °C:ssa edusti arvoa 100 %.

- 20 Lämpötilan vaikutus TrX- ja TrX-75A-ksylanaasien aiheuttamaan ksylaanin hydrolyysiin on esitetty kuviossa 3. TrX-75A-mutanttiksylanaasi, jossa on yksittäismutaatio S75A, osoitti suuremman entsymaattisen aktiivisuuden kuin luonnollinen TrX-ksylanaasi 50, 55, 60 ja 65 °C:ssa. Lisäksi, TrX-HML-75A-mutanttiksylanaasissa oleva S75A-mutaatio osoitti suuremman entsymaattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-emoksylanaasi 70 °C:ssa ja 75 °C:ssa (kuvio 4). Nämä tulokset vihjaavat, että S75A-mutaatio parantaa TrX- ja TrX-HML-ksylanaasien termofiilisyyttä.

- 25 TrX-HML-ksylanaasiin TrX-HML-105H-mutanttiksylanaasin tuottamiseksi tehty mutaatio Leu 105 → His (L105H) osoitti myös kohonneen entsymaattisen aktiivi-

suuden verrattuna TrX-HML-emoksyylanaasin vastaavaan 70 °C:ssa ja 75 °C:ssa (kuvio 4).

Huomionarvoista on, että TrX-HML-75A-105H-yhdistelmämutanttiksyylanaasilla oli maksimaalinen entsyymaattinen aktiivisuus 70 °C:ssa ja lisäksi se osoitti suuremman
 5 entsyymaattisen aktiivisuuden kuin kumpikaan yksittäismutanttiksyylanaasi TrX-HML-75A tai TrX-HML-105H 70 °C:ssa (kuvio 4). Nämä tulokset vihjaavat, että näiden kahden mutaation, S75A ja L105H, vaikutukset mutanttiksyylanaasin termofiilisyyteen ovat additiivisia tai täydentäviä.

Asn:n substituuutio kohdassa 157 Asp:lla, Ala:n substituuutio kohdassa 161 Arg:lla
 10 (A161R), Gln:n substituuutio kohdassa 162 His:llä (Q162H) ja Thr:n substituuutio kohdassa 165 His:llä (T165H) TrX-157D-161R-162H-165H:n tuottamiseksi olivat neutraaleja tai johtivat lievään kohoamiseen mitä tulee tämän entsyymin termofiilisyyteen verrattuna TrX-emoentsyymin vastaavaan (kuvio 15).

Rakennettiin sarja TrX-HML-ksyylanaaseja, joissa oli mutaatiot kohdassa 105, niiden aminohappojäännösten määrittämiseksi, jotka tehostavat TrX-HML-emoentsyymin termofiilisyyttä (kuvio 5). Kolme kohdan 105 suhteen olevaa mutanttia, TrX-HML-105H, TrX-HML-105R ja TrX-HML-105K, osoittivat suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-esiaste-entsyymi 70 °C:ssa tai korkeam-
 15 massa lämpötilassa. Nämä kolme mutanttia sisältävät Leu:n, joka on suhteellisen hydrofobinen haarautuneen ketjun sisältävä aminohappo, substituution kohdassa
 20 105 His:llä, Arg:lla ja Lys:llä, jotka ovat hydrofiilisiä tai positiivisesti varattuja tai emäksisiä aminohappojäännöksiä. Sellaiset mutaatiot tehostavat mutanttiksyylanaasien termofiilisyyttä.

TrX-HML-75A-105R-yhdistelmämutanttiksyylanaasi osoitti samanlaisen lämpötila-
 25 aktiivisuusprofiilin kuin TrX-HML-75A-105H-ksyylanaasi, joka vihjaa, että S75A- ja L105R-mutaatioiden, kuten S75A- ja L105H-mutaatioidenkin, vaikutukset ovat additiivisia tai täydentäviä. Nämä tulokset vihjaavat lisäksi, että emäksiset jäännökset kohdassa 105 tehostavat ksyylanaasien termofiilisyyttä.

Toisessa mutanttiksyylanaasisarjassa TrX-HML-105R-entsyymin kohta 75 mutatoitiin niiden jäännösten määrittämiseksi, jotka osoittivat tehostuneen termofiilisyyden
 30 (kuvio 6). Kolme geneettisesti modifioitua ksyylanaasimutanttia, TrX-HML-75C-105R, TrX-HML-75A-105R ja TrX-HML-75G-105R, osoittivat suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin kumpikaan esiasteksyylanaasi TrX-HML-105R tai TrX-HML lämpötiloissa, jotka olivat korkeampia kuin 60 °C. Mielenkiintoista on, että

neljäs mutanttiksylanaasi, TrX-HML-75T-105R, ei osoittanut tehostumista termofiilisydessä verrattuna TrX-HML-105R-esiasteksyylanaasiin, jossa on luonnollinen Ser-jäännös kohdassa 75. Mutantin treoniinijäännös kohdassa 75 on, kuten TrX- ja TrX-HML-emoksyylanaaseissa oleva luonnollinen Ser 75 -jäännöskin, hydrofiilinen aminohappo. Yhteenvedona mutaatiot, joissa korvataan polaarin Ser-aminohappo kohdassa 75 pienellä ei-polaarisella aminohapolla, kuten, mutta ei niihin rajoittuen, Ala:lla, Gly:llä tai Cys:llä, johtavat ksyylanaasin termofiilisuuden kohoamiseen.

Toisessa sarjassa TrX-HML-entsymin Gln-125-jäännöksen mutaatio Ala:ksi (Q125A) johti suurempaan aktiivisuuteen korkeammissa lämpötiloissa (kuvio 7). Toinen mutaatio, Ile-129 → Glu (I129E), johti myös kohtuulliseen parantumiseen ksyylanaasin termofiilisydessä. Sitten edulliset mutaatiot jäännöksissä 75, 105, 125 ja 129 yhdistettiin saaden TrX-HML-75G-105R-125A129E-mutantti ja se osoitti aktiivisuuden lisäparantumisen korkeammissa lämpötiloissa (kuvio 7). Muut yhdistelmämutantit, joissa oli mutaatiot jäännöksissä 75 (S75A tai S75G) ja 105 (L105H tai L105R), ovat myös osoittaneet saman parantumisen aktiivisuudessa korkeammassa lämpötilassa (kuvio 8).

Viimeisessä sarjassa kohdan Lys-104 mutaatio proliiniksi (K104P) tuotti myös ksyylanaasin, jolla oli suuresti parantunut termofiilisyys, joka oli samanlainen kuin edullisten S75G-, L105R- tai L105H-, Q125A- ja I129E-mutaatioiden vastaava (kuvio 9).

Esimerkki 4 Mutanttiksyylanaasien alkalofiilisyys

Geneettisesti modifioitujen ksyylanaasien alkalofiilisyys tutkittiin sen testaamiseksi, miten eri pH-olosuhteet vaikuttavat liukoisen ksyylaatin entsymaattiseen hydrolyysiin eri mutanttiksyylanaaseilla. Testimenetelmä oli samanlainen kuin standarditesti niin, että muutoksia tehtiin inkubaatiolämpötilassa ja -ajassa. Geneettisesti modifioitujen ksyylanaasien näytettä (15 µg/ml) ja liukoista ksyylaatin substraattia 50 mM natriumsitraattipuskurissa, jonka pH vaihteli välillä 4 – 7, inkuboitin yhdessä 65 °C:ssa. Kolmenkymmenen minuutin inkubaation jälkeen määritettiin ksyylaatin vapautuneiden pelkistävien sokereiden määrä HBAH-analyysillä ja laskettiin entsymaattinen aktiivisuus pH:n funktiona eri mutanttiksyylanaaseille niin, että maksimaalinen aktiivisuus oli 100 %.

Vaikutus, joka pH-olosuhteilla oli TrX-75A-yksittäismutanttiksyylanaasin entsymaattiseen aktiivisuuteen, on esitetty kuviossa 10. TrX-75A-mutanttiksyylanaasin maksimiaktiivisuus oli 55 °C:ssa pH:ssa, joka oli korkeampi (pH 5,5) kuin se pH,

jossa natiivi TrX-entsyymi osoittaa maksimiaktiivisuutensa (pH 5,0). Mutantilla oli kohonnut entsyymaattinen aktiivisuus myös pH-olosuhteissa 6,0 ja 6,5 verrattuna luonnolliseen TrX-ksylanaasiin.

- 5 Samanlainen parantunut alkalofiilisyytsvaikutus kuin S75A-mutaatiolla oli TrX-75A-entsyymiin, havaittiin myös TrX-HML-75A-entsyymillä verrattuna TrX-HML-emoksyylanaasiin pH-olosuhteissa, jotka olivat 6,5 – 7 (kuvio 11).

- 10 L105H-mutaatio TrX-HML-105H-mutanttiksyylanaasissa kohotti myös entsyymaattista aktiivisuutta verrattuna TrX-HML-emoksyylanaasiin pH:ssa 6,5 ja 7,0 (kuvio 11). Mielenkiintoista on, että TrX-HML-75A-105H-yhdistelmämutanttiksyylanaasi osoitti suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin kumpikaan yksittäismutanttiksyylanaasi TrX-HML-75A tai TrX-HML-105H pH:ssa 6,5 ja 7,0 (kuvio 11), joka vihjaa, että S75A-mutaation ja L105H-mutaation vaikutukset ksyylanaasin alkalofiilisyyteen ovat additiivisia tai täydentäviä.

- 15 Rakennettiin sarja geneettisesti kohtaan 105 modifioituja ksyylanaaseja niiden jäännösten määrittämiseksi, jotka edistävät modifioitujen ksyylanaasin alkalofiilisyyttä (kuvio 12). Kolme mutanttiksyylanaasia, joissa oli kolme mutaatiota kohdassa 75, TrX-HML-105H, TrX-HML-105R ja TrX-HML-105K, osoittivat suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden kuin TrX-HML-esiasteksyylanaasi pH-olosuhteissa 6,5 ja 7,0. Yhteen vetona mutaatiot, jotka johtavat alkalofiilisyyden kohoamiseen, edustavat muutosta haarautuneen ketjun sisältävästä suhteellisen hydrofobisesta Leu-jäännöksestä jäännökseksi, joka on hydrofiilinen, positiivisesti varattu tai emäksinen.

- 20 Teoriaan sitoutumatta, hydrofiiliset, positiivisesti varatut tai emäksiset jäännökset voivat tehostaa molekyyllinsisäistä pakkautumista muiden atomien kanssa, jotka sijaitsevat vierekkäin samalla alueella ksyylanaasin tertiaarirakenteessa. Nämä jäännökset voivat stabiloida entsyymien kolmiulotteista rakennetta sellaisia rakenteellisia häiriöitä vastaan, jotka voivat syntyä molekyyllissä molekyylin muiden alueiden useiden aminohappojen ionisoituvien sivuketjujen titrauksen välityksellä. Jälleen sitoutumatta teoriaan, sivuketjun emäksinen ionisoitunut muoto voi olla tärkeä muutettaessa entsyymien pH-aktiivisuusprofiilia, koska pH-olosuhteissa välillä 6 ja 7 Arg- ja Lys-jäännöksillä on sivuketjut, jotka todennäköisesti jäävät protonoituneiksi. Tälle päinvastaisesti His-jäännökset, joiden pKa-arvo imidatsoliryhmän suhteen on liuoksessa noin 6, voivat olla läsnä joko protonoituneena tai protonoitumattomana muotona. Alan ammattimiehet kuitenkin tietävät, että aminohapposivuketjuja ympäröivien substituenttien polaarisuus voi vaikuttaa sen pKa-arvoon. Esimerkiksi
- 25
- 30
- 35

His-jäännöksen sivuketjun pKa-arvo voi proteiinin polaaraisella tai hydrofobisella alueella olla 6, kun taas saman sivuketjun pKa-arvo voi hydrofobisessa tai apolaarisessa ympäristössä olla 7 tai suurempi.

- Toisessa tutkimuksessa rakennettiin mutaatiot TrX-HML-entsyymiin kohtaan 75 niiden jäännösten määrittämiseksi, jotka edistävät kohonnutta alkalofiilisyyttä modifoiduissa ksylanaaseissa (kuvio 13). Neljä ksylanaasia, joissa oli mutaatiot kohdassa 75, TrX-HML-75C-105R, TrX-HML-75A-105R, TrX-HML-75G-105R ja TrX-HML-75T-105R, osoittivat suuremman entsyymaattisen aktiivisuuden pH-olosuhteissa 6,0, 6,5 ja 7,0 kuin TrX-HML- ja TrX-HML-105R-esiasteksyylanaasit.
- 10 Kaksi mutaatiota, Q125A ja I129E TrX-HML-125A- ja TrX-HML-125A129E-mutantiksiylanaaseissa, jotka onnistuneesti kohottivat näiden entsyymien termofiilisyyttä, eivät yleensä vaikuttaneet niiden aktiivisuuteen korkeammassa pH:ssa verrattuna TrX-HML-entsyymiin. Tämä spesifinen parantuminen ksylanaasin termofiilisyydessä, mutta ei alkalofiilisyydessä, osoitettiin myös verrattaessa TrX-HML-15 75A-105H- ja TrX-HML-75A-105H-125A129E-yhdistelmämutantteja (kuvio 14). Tämä on myös havaittu muilla mutanteilla TrX-HML-75G-105H-125A129E (kuvio 14), TrX-HML-75A-105R-125A129E ja TrX-HML-75G-105R-125A129E.
- Happaman aminohapon substituuatio kohdassa 157 ja emäksisten aminohappojen substituuatio kohdissa 161, 162 ja 165 niin, että läsnä oli emäksisen aminohapon substituuotit kohdissa 132, 135 ja 144 tai ilman niitä, kohotti myös alkalofiilisyyttä. 20 Sekä TrX-HML-AHAE-RR-DRHH että TrX-HML-AHAE-RRR-DRRH (katso täydellinen kuvaus substituoitujen aminohappojen suhteen taulukosta 2) osoittivat kohoamisen alkalofiilisyydessä (kuviot 18 ja 19). Näiden entsyymien MEP-arvon on myös karakterisoitu olevan noin pH 7,0 (kuviot 18 ja 19).
- 25 Alkalofiilisyyden lisäkoahoaminen verrattuna yllä kuvattuihin saatiin myös aikaan substituoimalla hapan aminohappo kohdassa 157 ja emäksiset aminohapot kohdissa 135, 144, 161, 162, 165 ja jättämällä aminohapot kohdissa 129 ja 132 niiden luonnolliseksi jäännökseksi, esimerkiksi TrX-HML-AHA-RR-DRHH (kuviot 18 ja 19). TrX-HML-AHA-RR-DRHH:n MEP on noin pH 7,4 (kuviot 18 ja 19).
- 30 Yhteenvetona, TrX-mutantiksiylanaasit, joilla on parantunut alkalofiilisyyys, voidaan rakentaa i) mutatoimalla Ser 75 pieniksi apolaarisiksi jäännöksiksi. Olematta rajoitettavia, nämä jäännökset voivat käsittää Gly:n, Ala:n ja Cys:n; ii) mutatoimalla Ser 75 Thr:ksi; iii) mutatoimalla Leu 105 emäksiseksi jäännökseksi, kuten, mutta ei rajoituen, Arg:ksi, Lys:ksi tai His:ksi; iv) mutatoimalla Ala 132, Tyr 135, His 144, Gln

161, Gln 162, Thr 165 tai niiden yhdistelmä emäksiseksi aminohapoksi, esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, Arg:ksi, Lys:ksi tai His:ksi; v) mutatoimalla Asn 157 happamaksi aminohapoksi Asp tai Glu; tai vi) yhdistämällä kohdissa i) tai ii) kuvatut mutaatiot kohdissa iii) ja iv) kuvattujen mutaatioiden kanssa alkalofiilisyyden parantamiseksi.

Samalla, kun esillä olevassa keksinnössä on kuvattu mutanttiksylanaasit, joilla on parantunut termofiilisyyys ja alkalofiilisyyys, ja näiden entsyymien edut paperisellun tuotossa, näitä mutanttiksylanaaseja voidaan käyttää myös muissa teollisuusprosesseissa, esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, tarkkuuslaitteiden ja puolijohteiden puhdistuksessa. Lisäksi, johtuen mutanttiksylanaasien kohonneesta termofiilisyydestä ja termostabiiliudesta, niitä voidaan käyttää kemiallisissa prosesseissa, joissa käytetään pieniä määriä denaturantteja tai detergenttejä, tai liuottimien kanssa, esimerkiksi, mutta ei rajoittuen, pienien määrien kanssa apolaarisia liuottimia, kuten, mutta ei rajoittuen, heksaanin, dioksaanien, hiilitetrakloridin, bentseenin, eettereiden, kloroformin, etikkahapon ja metyleenikloridin kanssa, ja polaaristen liuottimien kanssa, kuten, mutta ei rajoittuen, asetonin, alkoholien, dimetyyliformamidin, asetonitriilin, sulfolaanin, dimetyylisulfoksidin ja veden kanssa.

Esillä oleva keksintö on kuvattu koskien edullisia suoritusmuotoja. Alan ammattimiehille on kuitenkin ilmeistä, että useita variaatioita ja modifikaatioita voidaan tehdä ilman, että poistutaan tässä kuvatun keksinnön piiristä.

Kaikki viitteet ja lainaukset, joihin tässä viitataan.

Viitteet

Arase, A., Yomo, T., Urabe, I., Hata, Y., Katsube, Y. and Okada, H. (1993)
FEBS Lett. 316:123-127.

Casimir-Schenkel, J., Davis, S., Fiechter, a., Gysin, B., Murray, E., Perrolaz, J.-J.
and Zimmermann, W. European Patent application no. 91810652.7,
published on 04.03.92. Publication no. 0 473 545 A2.

Campbell, R. L., Rose, D. R., Sung, W. L., Yaguchi, M. and Wakarchuk, W. US
patent no. 5,405,769 issued on Apr. 11, 1995.

Campbell, R. L., Rose, D. R., Sung, W. L., Yaguchi, M. and Wakarchuk, W. PCT
publication no. WO 94/24270, published on 27.10.1994.

Fisk, R. S. and Simpson, C. (1993) in *Stability and Stabilization of Enzymes*,
edited by W. J. J. van den Tweel, A. Harder and R. M. Buitelaar;
published by Elsevier Science Publishers B. V. pp323-328.

Gruber, K., Klintschar, G., Hayn, M., Schlacher, A., Steiner, W. and Kratky, C.
(1998) *Biochemistry* 37:13475-13485.

Irwin, D., Jung, E. D. and Wilson, D. B. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.*
60:763-770.

Lee, S. L., Forsberg, C. W., and Rattray, J. B. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.*
53:644-650.

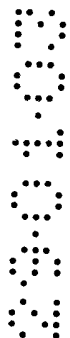
Lüthi, E., Jasmat, N. B., and Bergquist, P. L. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.*
56:2677-2683.

Mathrani, I. M. and Ahring, B. K. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:23-27.

Misset, O. (1993) in *Stability and Stabilization of Enzymes*, edited by W. J. J.
van den Tweel, A. Harder and R. M. Buitelaar; published by Elsevier
Science Publishers B. V. pp111-131.

Nissen A. M., Anker, L., Munk, N., and Lange, N. K. in *Xylans and Xylanases*,
edited by J. Visser, G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren and A. G. J.
Voragen, published by Elsevier, Amsterdam, 1992. p325-337.

Sakka, K., Kojima Y., Kondo, T., Karita, S., Ohmiya, K. and Shimada, K. (1993)
Biosci. Biotech. Biochem. 57:273-277.



Simpson, H. D., Haufler, U. R., and Daniel, R. M. (1991) *Biochem. J.* (1991) 277:413-417.

Sung, W. L. . Yao, F.-L., Zahab, D. M. and Narang, S. A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:561-565.

Sung, W. L., Luk, C. K., Zahab, D. M. and Wakarchuk, W. (1993) *Protein Expression Purif.* 4:200-206.

Sung, W. L., Luk, C. K., Chan, B., Wakarchuk, W., Yaguchi, M., Campbell, R., Willick, G., Ishikawa, K. and Zabab, D. M. (1995) *Biochem. Cell. Biol.* 73:253-259.

Sung, W. L., Yaguchi, M and Ishikawa, K. US patent #5,759,840, issued on Jun. 2, 1998.

Sung, W. L., Yaguchi, M and Ishikawa, K. US patent #5,866,408, issued on Feb. 2, 1999

Tolan, J. S. and Vega Canovas, R. (1992) *Pulp & Paper Canada* 93:116-119).

Wakarchuk W. W., Sung, W. L., Campbell, R. L., Cunningham, A., Watson, D. C. and Yaguchi, M. (1994) *Protein Engineering* 7:1379-1386.

Wilson, D. B., Jung, E. D., Changas, G. S., Irvin, D. C. PCT international publication on 11 may 1995. Publication No. WO 95/12668.

Winterhalter C. and Liebl, W. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1810-1815.

Zappe, H., Jones, W. A., and Woods, D. R. (1987) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:57-63.

Zappe, H., Jones, W. A., and Woods, D. R. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:2179.

Patenttivaatimukset

1. Modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka käsittää yhden substituoidun aminohappojäännöksen kohdassa 75, mainitun kohdan ollessa määritetty mainitun modifioidun ksylanaasin sekvenssivertailulla *Trichoderma reesei* -ksylanaasi II:n aminohapposekvenssiin, joka on määritelty sekvenssissä nro 16, jolloin mainittu modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi sisältää parantuneen termofiilisyyden, alkalofiilisyyden tai niiden yhdistelmän, verrattuna vastaavaan natiiviin ryhmä 11 -ksylanaasiin, ja jossa mainittu substituoitu aminohappo kohdassa 75 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat Ala, Cys, Gly ja Thr.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu ryhmä 11 -ksylanaasi on valittu joukosta, jonka muodostavat *Trichoderma reesei* -ksylanaasi II, *Trichoderma reesei* -ksylanaasi I, *Trichoderma viride* -ksylanaasi, *Streptomyces lividans* -ksylanaasi B ja *Streptomyces lividans* -ksylanaasi C.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu ryhmä 11 -ksylanaasi on *Trichoderma reesei* -ksylanaasi II.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa on lisäksi His kohdassa 10, Met kohdassa 27 ja Leu kohdassa 29 (HML).
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu ainakin yksi substituoitu aminohappojäännös on emäksinen aminohappo kohdassa 105.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu polaarinen aminohappo on valittu ryhmästä, jonka muodostavat His, Lys ja Arg.
7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jolloin mainittu ryhmä 11 -ksylanaasi on valittu joukosta, jonka muodostavat *Trichoderma reesei* -ksylanaasi II, *Trichoderma reesei* -ksylanaasi I, *Trichoderma viride* -ksylanaasi, *Streptomyces lividans* -ksylanaasi B ja *Streptomyces lividans* -ksylanaasi C.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jolloin mainittu ryhmä 11 -ksylanaasi on *Trichoderma reesei* -ksylanaasi II.
9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa on yksi substituoitu ei-polaarinen aminohappojäännös kohdassa 125 ja yksi substituoitu hapan aminohappojäännös kohdassa 129.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu substituoitu aminohappo kohdassa 125 on Ala.
11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu hapan aminohappojäännös kohdassa 129 on Glu.
- 5 12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka lisäksi käsittää ei-polaarisen substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 104.
13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu ei-polaarinen substituoitu aminohappo kohdassa 104 on Pro.
14. Patenttivaatimuksen 9 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka lisäksi käsittää emäksisen substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 132 ja emäksisen substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 135.
- 10 15. Patenttivaatimuksen 9 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka lisäksi käsittää emäksisen substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 135 ja emäksisen substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 144.
- 15 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka lisäksi käsittää substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 157, substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 161, substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 162 ja substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 165, mainittujen substituoitujen aminohappojen kohdissa 161, 162 ja 165 kunkin ollessa emäksinen aminohappo ja mainitun substituoitun aminohapon kohdassa 157 ollessa hapan aminohappo.
- 20 17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka lisäksi käsittää substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 144, substituoitun aminohappojäännöksen kohdassa 157, substituoitun aminohapon kohdassa 161, substituoitun aminohapon kohdassa 162 ja substituoitun aminohapon kohdassa 165, mainittujen substituoitujen aminohappojen kohdissa 144, 161, 162 ja 165 kunkin ollessa emäksinen aminohappo ja mainitun substituoitun aminohapon kohdassa 157 ollessa hapan aminohappo.
- 25

18. Patenttivaatimuksen 1 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jolla mainitulla modifioidulla ksylanaasilla on maksimitehokkuuslämpötila (MET) noin 69 °C – noin 78 °C, tai jolla mainitulla modifioidulla ksylanaasilla on maksimitehokkuus-pH (MEP) noin pH 5,8 - noin pH 7,6, ja joka mainittu modifioitu
- 5 ksylanaasi on ryhmä 11 -ksylanaasi, joka saadaan *Trichoderma* sp:stä.
19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jossa mainittu MET on välillä, joka on noin 70 °C – noin 75 °C.
20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jonka mainitun modifioidun ksylanaasin maksimitehokkuuden pH (MEP) on välillä, joka
- 10 on noin pH 5,8 – noin pH 7,6 ja maksimitehokkuuslämpötila (MET) noin 69 °C – noin 78 °C.
21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, jonka mainitun modifioidun ksylanaasin maksimitehokkuuden pH (MEP) on välillä, joka on noin pH 6,5 – noin pH 7,4.
- 15 22. Modifioitu ryhmä 11 -ksylanaasi, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat:
- TrX-75A (SEQ ID NO:59);
- TrX-HML-75A (SEQ ID NO:62);
- TrX-HML-75A-105H (SEQ ID NO:63);
- 20 TrX-HML-75A-105R (SEQ ID NO:64);
- TrX-HML-75C-105R (SEQ ID NO:65);
- TrX-HML-75G-105R (SEQ ID NO:66);
- TrX-HML-75T-105R (SEQ ID NO:67);
- TrX-HML-75G-105R-125A-129E (TrX-HML-GRAE) (SEQ ID NO:68);
- 25 TrX-HML-75A-105H-125A-129E (TrX-HML-AHAE) (SEQ ID NO:69);
- TrX-HML-75G-105H-125A-129E (TrX-HML-GHAE) (SEQ ID NO:70);
- TrX-HML-75A-105R-125A-129E (TrX-HML-ARAE) (SEQ ID NO:71);
- TrX-HML-75G-104P-105R-125A-129E (TrX-HML-GPRAE) (SEQ ID NO:72);
- TrX-HML-75G-104P-105H-125A-129E (TrX-HML-GPHAE) (SEQ ID NO:73);
- 30 TrX-HML-AHAE-RR (SEQ ID NO:74);
- TrX-HML-AHAE-RRR (SEQ ID NO:75);
- TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH (SEQ ID NO:76);
- TrX-HML-AHA-RR-DRHH (SEQ ID NO:77); ja
- TrX-HML-AHAE-RR-DRHH (SEQ ID NO:78).

Patentkrav

1. Modifierat grupp 11 -xylanas innehållande en substituerad aminosyrarest vid position 75, varvid nämnda position är bestämd på basis av sekvensjämförelsen av det modifierade xylanaset med aminosyrasekvensen för *Trichoderma reesei* -xylanas II definierad i SEQ ID NR 16, vilket modifierat grupp 11 -xylanas har förbättrad termofilicitet, alkalofilicitet eller en kombination därav i jämförelse med ett motsvarande naturligt grupp 11 -xylanas, och varvid substituerad aminosyra vid position 75 väljs ur en grupp som består av Ala, Cys, Gly och Thr.
2. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 1, vari grupp 11 -xylanaset väljs ur en grupp som består av *Trichoderma reesei* -xylanas II, *Trichoderma reesei* -xylanas I, *Trichoderma viride* -xylanas, *Streptomyces lividans* -xylanas B och *Streptomyces lividans* -xylanas C.
3. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 2, vari det nämnda grupp 11 -xylanaset är *Trichoderma reesei* -xylanas II.
4. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 1, som dessutom innehåller en His i position 10, Met i position 27 och Leu i position 29 (HML).
5. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 4, vari nämnda minst en substituerad aminosyrarest är en basisk aminosyra i position 105.
6. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 5, vari den polära aminosyran väljs ur en grupp som består av His, Lys och Arg.
7. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 4, varvid grupp 11 -xylanaset väljs ur en grupp som består av *Trichoderma reesei* -xylanas II, *Trichoderma reesei* -xylanas I, *Trichoderma viride* -xylanas, *Streptomyces lividans* -xylanas B och *Streptomyces lividans* -xylanas C.
8. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 7, varvid nämnda grupp 11 -xylanaset är *Trichoderma reesei* -xylanas II.
9. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 5, som innehåller en icke-polär substituerad aminosyrarest i position 125 och en substituerad, sur aminosyrarest i position 129.
10. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 9, vari nämnda substituerade aminosyra i position 125 är Ala.

11. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 9, vari nämnda substituerade sura aminosyrarest i position 129 är Glu.
12. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 9, som dessutom innehåller en icke-polär substituerad aminosyrarest i position 104.
- 5 13. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 12, vari nämnda icke-polära substituerade aminosyra i position 104 är Pro.
14. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 9, som dessutom innehåller en basisk substituerad aminosyrarest i position 132 och en basisk substituerad aminosyrarest i position 135.
- 10 15. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 9, som dessutom innehåller en basisk substituerad aminosyrarest i position 135 och en basisk substituerad aminosyrarest i position 144.
16. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 15, som dessutom innehåller en substituerad aminosyrarest i position 157, en substituerad aminosyrarest i position 161, en substituerad aminosyrarest i position 162 och en substituerad aminosyrarest i position 165, varvid var och en av dessa substituerade aminosyror i positionerna 161, 162 och 165 är en basisk aminosyra och den substituerade aminosyran i position 157 är en sur aminosyra.
- 15 17. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 14, som dessutom innehåller en substituerad aminosyrarest i position 144, en substituerad aminosyrarest i position 157, en substituerad aminosyra i position 161, en substituerad aminosyra i position 162 och en substituerad aminosyra i position 165, varvid var och en av dessa substituerade aminosyror i positionerna 144, 161, 162 och 165 är en basisk aminosyra och nämnda substituerade aminosyra i position 157 är en sur aminosyra.
- 20 18. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 1, varvid det modifierade xylanaset har en maximal effektiv temperatur (MET) från ca. 69 °C till ca. 78 °C eller det modifierade xylanaset har ett maximalt effektivt pH-värde (MEP) från ca. pH 5,8 till ca. pH 7,6 och varvid det modifierade xylanaset är ett grupp 11 -xylanas, erhållet från *Trichoderma* sp.
- 30 19. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 18, vari nämnda MET ligger mellan ca. 70 °C och ca. 75 °C.



20. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 18, varvid det modifierade xylanaset har ett maximalt effektivt pH-värde (MEP) från ca. pH 5,8 till ca. pH 7,6 och en maximal effektiv temperatur (MET) från ca. 69 °C till ca. 78 °C.

5 21. Modifierat grupp 11 -xylanas enligt patentkrav 19, varvid det modifierade xylanaset har ett maximalt effektivt pH-värde (MEP) från ca. pH 6,5 till ca. pH 7,4.

22. Modifierat grupp 11 -xylanas valt ur en grupp som består av:

TrX-75A (SEQ ID NO:59);

TrX-HML-75A (SEQ ID NO:62);

10 TrX-HML-75A-105H; (SEQ ID NO:63);

TrX-HML-75A-105R (SEQ ID NO:64);

TrX-HML-75C-105R (SEQ ID NO:65);

TrX-HML-75G-105R (SEQ ID NO:66);

TrX-HML-75T-105R (SEQ ID NO:67);

15 TrX-HML-75G-105R-125A-129E (TrX-HML-GRAE) (SEQ ID NO:68);

TrX-HML-75A-105H-125A-129E (TrX-HML-AHAE) (SEQ ID NO:69);

TrX-HML-75G-105H-125A-129E (TrX-HML-GHAE) (SEQ ID NO:70);

TrX-HML-75A-105R-125A-129E (TrX-HML-ARAE) (SEQ ID NO:71);

TrX-HML-75G-104P-105R-125A-129E (TrX-HML-GPRAE) (SEQ ID NO:72);

20 TrX-HML-75G-104P-105H-125A-129E (TrX-HML-GPHAE) (SEQ ID NO:73);

TrX-HML-AHAE-RR (SEQ ID NO:74);

TrX-HML-AHAE-RRR (SEQ ID NO:75);

TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH (SEQ ID NO:76);

TrX-HML-AHA-RR-DRHH (SEQ ID NO:77) och

25 TrX-HML-AHAE-RR-DRHH (SEQ ID NO:78).

SEQUENCE LISTING

<110> National Research Council of Canada

<120> Modified Xylanases Exhibiting Increased Thermophilicity
and Alkalophilicity

<130> 08-885644WO

<140> PCT/CA01/00769

<141> 2001-05-31

<150> 60/213,803

<151> 2000-05-31

<160> 51

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Aspergillus niger

<400> 1

Ser Ala Gly Ile Asn Tyr Val Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Asp
1 5 10 15

Phe Thr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp
20 25 30

Gly Val Ser Ser Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Thr Thr Gly Ser
35 40 45

Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gly Ala Glu Tyr
65 70 75 80

Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys Thr
100 105 110

Asp Thr Arg Ile Asn Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr
115 120 125

Gln Tyr Phe Ser Val Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr
130 135 140

Val Ala Asn His Phe Asn Phe Trp Ala Gln His Gly Phe Gly Asn Ser
145 150 155 160

Asp Phe Asn Tyr Gln Val Met Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala Gly
165 170 175

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180

<210> 2
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus tubingensis*

<400> 2
 Ser Ala Gly Ile Asn Tyr Val Gln Asn Tyr Asn Gln Asn Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 Phe Thr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp
 20 25 30
 Gly Val Ser Ser Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Gly Trp Thr Thr Gly
 35 40 45
 Ser Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ala Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala
 85 90 95
 Thr Ser Leu Gly Thr Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys
 100 105 110
 Thr Asp Thr Arg Ile Asn Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe
 115 120 125
 Thr Gln Tyr Phe Ser Val Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val
 130 135 140
 Thr Val Ala Asn His Phe Asn Phe Trp Ala His His Gly Phe His Asn
 145 150 155 160
 Ser Asp Phe Asn Tyr Gln Val Val Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala
 165 170 175
 Gly Ser Ala Ala Val Thr Ile Ser Ser
 180 185

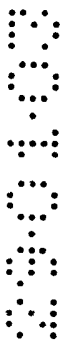
<210> 3
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> *Bacillus circulans*

<400> 3
 Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn
 20 25 30
 Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe
 35 40 45
 Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly
 50 55 60

Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
 85 90 95
 Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg
 100 105 110
 Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr
 115 120 125
 Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
 130 135 140
 Thr Phe Thr Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu
 145 150 155 160
 Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
 180 185

<210> 4
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Bacillus pumilus

<400> 4
 Arg Thr Ile Thr Asn Asn Glu Met Gly Asn His Ser Gly Tyr Asp Tyr
 1 5 10 15
 Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly Asn Thr Ser Met Thr Leu Asn Asn Gly
 20 25 30
 Gly Ala Phe Ser Ala Gly Trp Asn Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg
 35 40 45
 Lys Gly Lys Lys Phe Asp Ser Thr Arg Thr His His Gln Leu Gly Asn
 50 55 60
 Ile Ser Ile Asn Tyr Asn Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ser Tyr
 65 70 75 80
 Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Gln Ser Pro Leu Ala Glu Tyr Tyr Ile
 85 90 95
 Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Ala Tyr Lys Gly Ser
 100 105 110
 Phe Tyr Ala Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val
 115 120 125
 Asn Gln Pro Ser Ile Ile Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser
 130 135 140
 Val Arg Gln Thr Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Ser Val Ser Ala His
 145 150 155 160



Phe Arg Lys Trp Glu Ser Leu Gly Met Pro Met Gly Lys Met Tyr Glu
165 170 175

Thr Ala Phe Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val
180 185 190

Met Thr Asn Gln Leu Phe Ile Gly Asn
195 200

<210> 5

<211> 185

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 5

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val
1 5 10 15

Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn
20 25 30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe
35 40 45

Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly
50 55 60

Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr
65 70 75 80

Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
85 90 95

Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg
100 105 110

Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr
115 120 125

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
130 135 140

Thr Phe Ser Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu
145 150 155 160

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
165 170 175

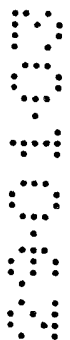
Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

<210> 6

<211> 211

<212> PRT

<213> *Clostridium acetobutylicum*



<400> 6

Ser Ala Phe Asn Thr Gln Ala Ala Pro Lys Thr Ile Thr Ser Asn Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Val Asn Gly Gly Tyr Asp Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly
 20 25 30
 Asn Thr Ser Met Thr Leu Lys Asn Gly Gly Ala Phe Ser Cys Gln Trp
 35 40 45
 Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Asp
 50 55 60
 Thr Gln Thr Tyr Lys Gln Leu Gly Asn Ile Ser Val Asn Tyr Asn Cys
 65 70 75 80
 Asn Tyr Gln Pro Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr
 85 90 95
 Ser Ser Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly Ser Trp
 100 105 110
 Arg Pro Pro Gly Gly Thr Ser Lys Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly
 115 120 125
 Ile Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Ile Asn Gln Pro Ser Ile Gln
 130 135 140
 Gly Asn Thr Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr Lys Arg
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Lys His Phe Ala Ala Trp Glu Ser
 165 170 175
 Lys Gly Met Pro Leu Gly Lys Met His Glu Thr Ala Phe Asn Ile Glu
 180 185 190
 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Lys Ala Asp Val Asn Ser Met Ser Ile Asn
 195 200 205
 Ile Gly Lys
 210

<210> 7

<211> 206

<212> PRT

<213> Clostridium stercorarium

<400> 7

Gly Arg Ile Ile Tyr Asp Asn Glu Thr Gly Thr His Gly Gly Tyr Asp
 1 5 10 15
 Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly Asn Thr Ile Met Glu Leu Asn Asp
 20 25 30
 Gly Gly Thr Phe Ser Cys Gln Trp Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe
 35 40 45



6/23

Arg Lys Gly Arg Lys Phe Asn Ser Asp Lys Thr Tyr Gln Glu Leu Gly
50 55 60

Asp Ile Val Val Glu Tyr Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser
65 70 75 80

Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Phe Leu Val Glu Tyr Tyr
85 90 95

Ile Val Glu Ser Trp Gly Ser Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys
100 105 110

Gly Thr Ile Thr Gln Trp Met Ala Gly Thr Tyr Glu Ile Tyr Glu Thr
115 120 125

Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Thr Ala Thr Phe Gln Gln
130 135 140

Tyr Trp Ser Val Arg Thr Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val
145 150 155 160

Thr Glu His Phe Lys Gln Trp Glu Arg Met Gly Met Arg Met Gly Lys
165 170 175

Met Tyr Glu Val Ala Leu Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Tyr
180 185 190

Ala Asn Val Tyr Lys Asn Glu Ile Arg Ile Gly Ala Asn Pro
195 200 205

<210> 8

<211> 211

<212> PRT

<213> Ruminococcus flavefaciens

<400> 8

Ser Ala Ala Asp Gln Gln Thr Arg Gly Asn Val Gly Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

Glu Met Trp Asn Gln Asn Gly Gln Gly Gln Ala Ser Met Asn Pro Gly
20 25 30

Ala Gly Ser Phe Thr Cys Ser Trp Ser Asn Ile Glu Asn Phe Leu Ala
35 40 45

Arg Met Gly Lys Asn Tyr Asp Ser Gln Lys Lys Asn Tyr Lys Ala Phe
50 55 60

Gly Asn Ile Val Leu Thr Tyr Asp Val Glu Tyr Thr Pro Arg Gly Asn
65 70 75 80

Ser Tyr Met Cys Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Met Glu Tyr
85 90 95

Tyr Ile Val Glu Gly Trp Gly Asp Trp Arg Pro Pro Gly Asn Asp Gly
100 105 110

Glu Val Lys Gly Thr Val Ser Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Asp Ile Arg
115 120 125

Lys Thr Met Arg Tyr Asn Gln Pro Ser Leu Asp Gly Thr Ala Thr Phe
130 135 140

Pro Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asn Gln
145 150 155 160

Thr Asn Tyr Met Lys Gly Thr Ile Asp Val Ser Lys His Phe Asp Ala
165 170 175

Trp Ser Ala Ala Gly Leu Asp Met Ser Gly Thr Leu Tyr Glu Val Ser
180 185 190

Leu Asn Ile Glu Gly Tyr Arg Ser Asn Gly Ser Ala Asn Val Lys Ser
195 200 205

Val Ser Val
210

<210> 9

<211> 197

<212> PRT

<213> Schizophyllum commune

<400> 9

Ser Gly Thr Pro Ser Ser Thr Gly Thr Asp Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Trp Trp Thr Asp Gly Ala Gly Asp Ala Thr Tyr Gln Asn Asn Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Trp Ser Gly Asn Asn Gly Asn Leu Val Gly
35 40 45

Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ala Ala Ser Arg Ser Ile Ser Tyr Ser
50 55 60

Gly Thr Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp
65 70 75 80

Thr Arg Ser Ser Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr Gly Ser
85 90 95

Tyr Asp Pro Ser Ser Ala Ala Ser His Lys Gly Ser Val Thr Cys Asn
100 105 110

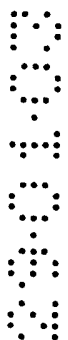
Gly Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Ser Thr Trp Arg Tyr Asn Ala Pro Ser
115 120 125

Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Glu Gln Phe Trp Ser Val Arg Asn Pro
130 135 140

Lys Lys Ala Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Thr Val Asp Val Gln Cys
145 150 155 160

His Phe Asp Ala Trp Lys Gly Leu Gly Met Asn Leu Gly Ser Glu His
165 170 175

Asn Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Thr Ala
180 185 190



Thr Ile Thr Val Thr
195

<210> 10
<211> 191
<212> PRT
<213> Streptomyces lividans

<400> 10
Asp Thr Val Val Thr Thr Asn Gln Glu Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Gln Gly Thr Val Ser Met Asn Met Gly
20 25 30

Ser Gly Gly Gln Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val
35 40 45

Ala Gly Lys Gly Trp Ala Asn Gly Gly Arg Arg Thr Val Gln Tyr Ser
50 55 60

Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp
65 70 75 80

Thr Ser Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr
85 90 95

Tyr Arg Pro Thr Gly Glu Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly
100 105 110

Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Val Asn Lys Pro Ser Val Glu
115 120 125

Gly Thr Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg
130 135 140

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
145 150 155 160

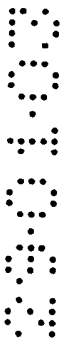
Ala Gly Met Pro Leu Gly Asn Phe Ser Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr
165 170 175

Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Thr Ser Ser Ile Asn Val Gly Gly
180 185 190

<210> 11
<211> 191
<212> PRT
<213> Streptomyces lividans

<400> 11
Ala Thr Thr Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asp Gly Met Tyr Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly
20 25 30



9/23

Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Gln Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala
35 40 45

Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Asp Gly Asn Val Arg Tyr Asn Gly Tyr
50 55 60

Phe Asn Pro Val Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
85 90 95

Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ser Asp Gly Gly Thr Tyr
100 105 110

Asp Ile Tyr Gln Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Gly Thr
115 120 125

Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
130 135 140

Gly Ser Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
145 150 155 160

Ala Gly Met Asn Met Gly Gln Phe Arg Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr
165 170 175

Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Thr Val Ser Gly
180 185 190

<210> 12

<211> 189

<212> PRT

<213> Streptomyces sp.

<400> 12

Ala Thr Thr Ile Thr Asn Glu Thr Gly Tyr Asp Gly Met Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Tyr Ser Thr Arg Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala Gly
35 40 45

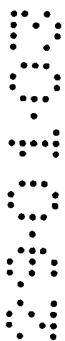
Lys Gly Trp Ala Asn Gly Gly Arg Arg Thr Val Arg Tyr Thr Gly Trp
50 55 60

Phe Asn Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
85 90 95

Pro Thr Gly Glu Thr Arg Gly Thr Val His Ser Asp Gly Gly Thr Tyr
100 105 110

Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Ala Pro
115 120 125



10/23

Ala Ala Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
130 135 140

Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly
145 150 155 160

Met Asn Met Gly Asn Phe Arg Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr Glu Gly
165 170 175

Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Val Ser Gly
180 185

<210> 13

<211> 189

<212> PRT

<213> Thermomonospora fusca

<400> 13

Ala Val Thr Ser Asn Glu Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Glu Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Ala Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser Ala Ser
50 55 60

Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg
65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Thr Tyr Arg
85 90 95

Pro Thr Gly Thr Tyr Met Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly Thr Tyr
100 105 110

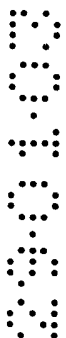
Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr
115 120 125

Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Ser
130 135 140

Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg His Gly
145 150 155 160

Met His Leu Gly Thr His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Leu Gly Thr Ser
180 185

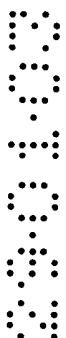
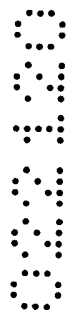


<210> 14
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma harzianum*

<400> 14
 Gln Thr Ile Gly Pro Gly Thr Gly Tyr Ser Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Tyr Trp Asn Asp Gly His Ala Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Ser Phe Thr Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45
 Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Ile Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80
 Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110
 Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125
 Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140
 Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160
 Ser His Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175
 Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 15
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 15
 Ala Ser Ile Asn Tyr Asp Gln Asn Tyr Gln Thr Gly Gly Gln Val Ser
 1 5 10 15
 Tyr Ser Pro Ser Asn Thr Gly Phe Ser Val Asn Trp Asn Thr Gln Asp
 20 25 30
 Asp Phe Val Val Gly Val Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser Ala Pro Ile
 35 40 45
 Asn Phe Gly Gly Ser Phe Ser Val Asn Ser Gly Thr Gly Leu Leu Ser
 50 55 60



12/23

Val Tyr Gly Trp Ser Thr Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Met Glu
65 70 75 80

Asp Asn His Asn Tyr Pro Ala Gln Gly Thr Val Lys Gly Thr Val Thr
85 90 95

Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Thr Ile Trp Glu Asn Thr Arg Val Asn Glu
100 105 110

Pro Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Asn Gln Tyr Ile Ser Val Arg
115 120 125

Asn Ser Pro Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gln Asn His Phe Asn
130 135 140

Trp Ala Ser Leu Gly Leu His Leu Gly Gln Met Met Asn Tyr Gln Val
145 150 155 160

Val Ala Val Glu Gly Trp Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ser Gln Ser Val
165 170 175

Ser Asn

<210> 16
<211> 190
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 16
Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 17

<211> 190

<212> PRT

<213> *Trichoderma viride*

<400> 17

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

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
 20 25 30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
 35 40 45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr His
 130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 18

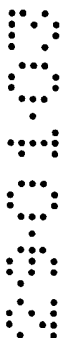
<211> 202

<212> PRT

<213> *Fibrobacter succinogenes*

<400> 18

Asn Ser Ser Val Thr Gly Asn Val Gly Ser Ser Pro Tyr His Tyr Glu
 1 5 10 15



Ile Trp Tyr Gln Gly Gly Asn Asn Ser Met Thr Phe Tyr Asp Asn Gly
 20 25 30
 Thr Tyr Lys Ala Ser Trp Asn Gly Thr Asn Asp Phe Leu Ala Arg Val
 35 40 45
 Gly Phe Lys Tyr Asp Glu Lys His Thr Tyr Glu Glu Leu Gly Pro Ile
 50 55 60
 Asp Ala Tyr Tyr Lys Trp Ser Lys Gln Gly Ser Ala Gly Gly Tyr Asn
 65 70 75 80
 Tyr Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Ile Val Asp Asp Trp Phe Asn Lys Pro Gly Ala Asn Leu Leu Gly Gln
 100 105 110
 Arg Lys Gly Glu Phe Thr Val Asp Gly Asp Thr Tyr Glu Ile Trp Gln
 115 120 125
 Asn Thr Arg Val Gln Gln Pro Ser Ile Lys Gly Thr Gln Thr Phe Pro
 130 135 140
 Gln Tyr Phe Ser Val Arg Lys Ser Ala Arg Ser Cys Gly His Ile Asp
 145 150 155 160
 Ile Thr Ala His Met Lys Lys Trp Glu Glu Leu Gly Met Lys Met Gly
 165 170 175
 Lys Met Tyr Glu Ala Lys Val Leu Val Glu Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Phe Asp Val Thr Tyr Phe Lys Met Thr
 195 200

<210> 19

<211> 189

<212> PRT

<213> Aspergillus awamorii

<400> 19

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

Pro Gly Ser Gly Gly Thr Thr Arg Gly Asn Val Ser Ser Asp Gly Ser
100 105 110

Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Asp
115 120 125

Gly Thr Gln Thr Phe Ser Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asn Lys Arg
130 135 140

Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Lys
145 150 155 160

Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile Leu Ala Thr Glu
165 170 175

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr Ile Gln
180 185

<210> 20

<211> 194

<212> PRT

<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 20

Gln Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly
20 25 30

Gly Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly
50 55 60

Val Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr
65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
85 90 95

Asp Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly
100 105 110

Ser Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

Asp Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys
130 135 140

Arg Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala
145 150 155 160

Arg Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala
165 170 175

Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp
180 185 190



Val Gly

<210> 21
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: TrX-1

<400> 21
 ctagctaagg aggctgcaga tgcaaacaat acaaccagga accggttaca acaacggtta
 60
 cttttacagc tattgg
 76

<210> 22
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: XyTv-2

<400> 22
 aacgatggcc atggtggtgt tacctataca aacgggcccg gaggcccaatt tagcgtcaat
 60
 tgggtctaact ccggaaac
 78

<210> 23
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: TrX-3

<400> 23
 ttcgtaggtg gaaaaggttg gcaacccggg accaaaaata aggtgatcaa cttctctgga
 60
 tcttataatc cgaatggg
 78

<210> 24
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: XyTv-4



<400> 24
aattcatact taagcgtcta tggctggtct agaaaccac tgattgaata ttacattgtc
60
gaaaatttcg gtac
74

<210> 25
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TrX-8

<400> 25
gattcctccg acgtctacgt ttgttatggt ggtccttggc caatggtgtt g
51

<210> 26
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-7

<400> 26
ccaatgaaaa tgtcgataac cttgctaccg gtaccaccac aatggatatg tttgcccggg
60
cctccgggta aatgcagtt aacc
84

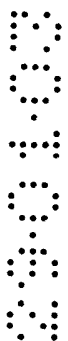
<210> 27
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TrX-6

<400> 27
agattgaggc ctttgaagca tccacctttt ccaaccgttg ggccttggtt tttattccac
60
tagttgaaga gacctaga
78

<210> 28
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-5



<400> 28
 atattaggct tacccttaag tatgaattcg cagataccga ccagatcttt gggtgactaa
 60
 cttataatgt aacagctttt aaagc
 85

<210> 29
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: XyTv-101

<400> 29
 tcgacaattt cggtagctac aatccgagta cgggcgccac aaaattaggc gaagtcac
 58

<210> 30
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: XyTv-102

<400> 30
 tagtgatgga tccgtatatg atatctaccg tacccaacgc gttaatcagc cat
 53

<210> 31
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

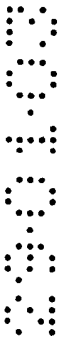
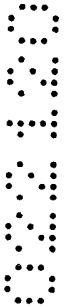
<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: TrX-103

<400> 31
 cgatcattgg aaccgccacc ttttatcagt actggagtgt tagacgtaat catcggagc
 59

<210> 32
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: XyTv-104

<400> 32
 tccggttcgg ttaatactgc gaatcacttt aatgcatggg cacagcaagg gttaacccta
 60
 ggtacaatg
 69



<210> 33
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-105

<400> 33
gattatcaaa tcgtagcggg ggaaggctac ttctcgagtg gttccgctag tattacagtg
60
agctaaa
67

<210> 34
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-110

<400> 34
gttaaagcca tggatgtag gctcatggcc gcgggtgtttt aatccgcttc agtgatcact
60
acctaggcat ata
73

<210> 35
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-109

<400> 35
ctatagatgg catgggttgc gcaattagtc ggtagctagt aaccttggcg gtgg
54

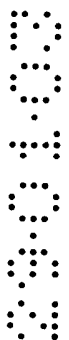
<210> 36
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-108

<400> 36
aaaatagtca tgacctcaca atctgcatta gtagcctcga ggccaagcca attatgacgc
60

<210> 37
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-107

<400> 37

ttagtgaaat tacgtacccg tgtegttccc aattgggatc catgttacct aatagtttag
60
catcgc
66

<210> 38

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XyTv-106

<400> 38

caccttccga tgaagagctc accaaggcga tcataatgtc actcgatttc tag
53

<210> 39

<211> 596

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: TrX

<400> 39

ctagctaagg aggctgcaga tgcaaacaat acaaccagga accggttaca acaacggtta
60
cttttacagc tattggaacg atggccatgg tgggtgttacc tatacaaacg ggccccggagg
120
ccaatttagc gtcaattggc ctaactccgg aaacttcgta ggtggaaaag gttggcaacc
180
cgggaccaaa aataaggtga tcaacttctc tggatcttat aatccgaatg ggaattcata
240
cttaagcgtc tatggctggc ctagaaaccc actgattgaa tattacattg tcgaaaattt
300
cggtacctac aatccgagta ccggcgccac aaaattaggc gaagtcacta gtgatggatc
360
cgtatatgat atctaccgta cccaacgcgt taatcagcca tcgatcattg gaaccgccac
420
cttttatcag tactggagtg ttagacgtaa tcacgagc tccgggttcgg ttaatactgc
480
gaatcacttt aatgcatggg cacagcaagg gttaacccta ggtacaatgg attatcaaat
540
cgtagcgggtg gaaggctact tctcgagtgg ttccgctagt attacagtga gctaaa
596

<210> 40

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Tx-75a-1

<400> 40

tggaattca tacttagccg tctatggctg gtctag
36

<210> 41

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Tx-105H-1

<400> 41

accggcgcca caaaacacgg cgaagtcact agtgatggat cc
42

<210> 42

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Tx-C1

<400> 42

ccaaggcgat cataatgtca ctcgatttct agaacttcga accc
44

<210> 43

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Tx-105K-1

<400> 43

accggcgcca caaaaaaagg cgaagtcact agtgatggat cc
42

<210> 44

<211> 42

<212> DNA

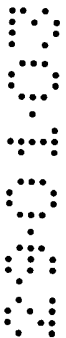
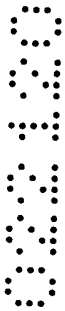
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Tx-105R-1

<400> 44

accggcgcca caaaaagagg cgaagtcact agtgatggat cc
42



<210> 45
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Tx-75C-1

<400> 45
tgggaattca tacttatgcg tctatggctg gtctag
36

<210> 46
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Tx-75G-1

<400> 46
tgggaattca tacttaggcg tctatggctg gtctag
36

<210> 47
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Tx-75T-1

<400> 47
tgggaattca tacttaaccg tctatggctg gtctag
36

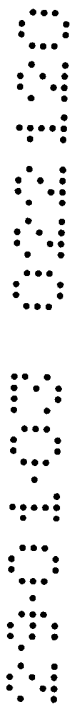
<210> 48
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TX-125A-1

<400> 48
ccaacgcgtt aatgcgccat cgatcattgg aaccgccacc
40

<210> 49
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TX-125A-129E-1



<400> 49
ccaacgcggtt aatgcgccat cgatcgaggg aaccgccacc
40

<210> 50
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

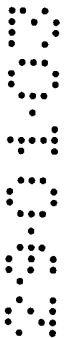
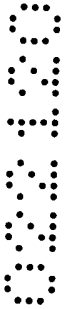
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TX-104P-105H-1

<400> 50
accggcgcca caccacacgg cgaagtcact agtgatgg
38

<210> 51
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: TX-104P-105R-1

<400> 51
accggcgcca caccaagagg cgaagtcact agtgatgg
38



Ca	23					S	AFNTQAAP	31
Cs	1						G	1
Tr2#			10	20	30	40		
Bp	1	RTITNNEMGN	HSGYDYELWK	DYGNT-SMTL	NNGGAFSAGW	N--NIGNA		45
Ca	32	KTITSNEIGV	NGGYDYELWK	DYGNT-SMTL	KNGGAFSCQW	S--NIGNA		76
Fs	1	NSSVTGNVG	SSPYHYEIWY	QGG-NNSMTF	YDNGTYKASW	N--GTNDF		
44								
Cs	2	RIIYDNETGT	HGGYDYELWK	DYGNT-IMEL	NDGGTFSCQW	S--NIGNA		46
Rf	1	SAADQQTRGN	VGGYDYEMWN	QNGQGQASMN	PGAGSFTCSW	S--NIENF		46
Tr2	1	QTIQPGTGY	NNGYFYSYWN	DHGCGVTYTN	GPGGQFSVNW	S--NSGNF		45
Tv	1	QTIQPGTGF	NNGYFYSYWN	DHGCGVTYTN	GPGGQFSVNW	S--NSGNF		45
Th	1	QTIGPGTGY	SNGYYSYWN	DGHAGVTYTN	GGGGSFTVNW	S--NSGNF		45
Sc	1	SGTPSSTGT	DGGYYSWWT	DGAGDATYQN	NGGGSYTLTW	SG-NNGNL		46
An	1		S	AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF	38
AT	1		S	AGINYVQNYN	QNLGDFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF	38
Tr1	1		ASINYDQNYQ	TGG-QVSYS-	PSNTGFSVNW	N--TQDDF		34
Aa	1	RSTPSSTGE	NNGYYSFWT	DGGGDVTYTN	GNAGSYSVEW	S--NVGNF		45
Ss	1	ATTIT-NETGY	D-GMYYSFWT	DGGGSVSMTL	NGGGSYSTRW	T--NCGNF		45
SlB	1	DTVVTTNQEGT	NNGYYSFWT	DSQGTVMNM	GSGGQYSTSW	R--NTGNF		47
SlC	1	ATTITTNQTGT	D-GMYYSFWT	DGGGSVSMTL	NGGGSYSTQW	T--NCGNF		46
Tl	1	QTPNSEGW	HDGYYSWWS	DGGAQATYTN	LEGGTYEISW	G--DGGNL		45
Tf	1	AVTSNETGY	HDGYFYSFWT	DAPGTVSMEL	GPGGNYSTSW	R--NTGNF		45
Bc	1		ASTDYWQNWT	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNW	S--NTGNF		36
Bs	1		ASTDYWQNWT	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNW	S--NTGNF		36
Tr2#			50	60	70	80		
Bp	46	LFRK-GKKFD	ST-RTHHQLG	NISINYNASF	N-PSGNSYLC	VY ~~GW~~ TQSP		90
Ca	77	LFRK-GKKFN	DT-QTYKQLG	NISVNYNCNY	Q-PYGNSYLC	VY ~~GW~~ TSSP		121
FS	45	LARV-GFKYD	EK-HTYEELGP	IDAYYKWSKQ	GSAGGYNYIG	IY ~~GW~~ TVDP		91
Cs	47	LFRK-GRKFN	SD-KTYQELG	DIVVEYGCDY	N-PNGNSYLC	VY ~~GW~~ TRNF		91
Rf	47	LARM-GKNYD	SQKKNYKAFG	NIVLTYDVEY	T-PRGNSYMC	VY ~~GW~~ TRNP		92
Tr2	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNGNSYLS	VY ~~GW~~ SRNP		83
Tv	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNGNSYLS	VY ~~GW~~ SRNP		83
Th	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNGNSYLS	IY ~~GW~~ SRNP		83
Sc	47	VGGK-GWNP	AASRS-----	---ISYS-GT	YQPNGNSYLS	VY ~~GW~~ TRSS		84
An	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	VY ~~GW~~ VNYP		76
At	39	VVGLGGWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSASYLA	VY ~~GW~~ VNYP		77
Tr1	35	VVGW-GWTTG	SSAP-----	---INFGGSF	SVNSGTGLLS	VY ~~GW~~ STNP		72
Aa	46	VGGK-GWNP	SAKD-----	---ITYSGNF	T-PSGNGYLS	VY ~~GW~~ TTDP		82
Ss	46	VAGK-GWANG	GR-RT-----	---VRYT-GW	FNPSGNGYGC	LY ~~GW~~ TSNP		82
SlB	48	VAGK-GWANG	GR-RT-----	---VQYS-GS	FNPSGNAYLA	LY ~~GW~~ TSNP		84
SlC	47	VAGK-GWSTG	DGN-----	---VRYN-GY	FNPVGNGYGC	LY ~~GW~~ TSNP		82
Tl	46	VGGK-GWNP	LNARA-----	---IHFE-GV	YQPNGNSYLA	VY ~~GW~~ TRNP		83
Tf	46	VAGK-GWATG	GR-RT-----	---VTYS-AS	FNPSGNAYLT	LY ~~GW~~ TRNP		82
Bc	37	VVGK-GWTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNGNGYLT	LY ~~GW~~ TRSP		75
Bs	37	VVGK-GWTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNGNGYLT	LY ~~GW~~ TRSP		75

Figure 1

Tr2#		90	100	110	120	130	
				*			
Bp	91	LA <u>EE</u> YIVDSW	GT <u>YR</u> -PT--G	AY <u>KG</u> SFYADG	GT <u>YD</u> IYETTR	VN <u>QPS</u> IIG	135
Ca	122	L <u>VE</u> YIVDSW	GS <u>WR</u> PP--GG	TS <u>KGT</u> ITVDG	GI <u>YD</u> IYETTR	IN <u>QPS</u> IQG	167
Fs	92	L <u>VE</u> YIVDDW	FN <u>KPG</u> ANLLG	QR <u>KGE</u> FTVDG	DT <u>YE</u> IWQNTR	VQ <u>QPS</u> IKG	139
Cs	92	L <u>VE</u> YIVESW	GS <u>WR</u> PP--GA	TP <u>KGT</u> ITQWMAGT <u>YE</u> IYETTR		VN <u>QPS</u> IDG	138
Rf	93	L <u>ME</u> YIVEGW	GD <u>WR</u> PPGNDG	EV <u>KGT</u> VSANG	NT <u>YD</u> IRKTMR	YN <u>QPS</u> LDG	140
Tr2	84	L <u>IE</u> YIVENF	GT <u>YN</u> -PSTGA	TKL <u>GE</u> VTSDG	SV <u>YD</u> IYRTQR	VN <u>QPS</u> IIG	130
Tv	84	L <u>IE</u> YIVENF	GT <u>YN</u> -PSTGA	TKL <u>GE</u> VTSDG	SV <u>YD</u> IYRTQR	VN <u>QPS</u> IIG	130
Th	84	L <u>IE</u> YIVENF	GT <u>YN</u> -PSTGA	TKL <u>GE</u> VTSDG	SV <u>YD</u> IYRTQR	VN <u>QPS</u> IIG	130
Sc	85	L <u>IE</u> YIVESY	GS <u>YD</u> -PSSAA	SH <u>KGS</u> VTCTNG	AT <u>YD</u> ILSTWR	YN <u>APS</u> IDG	131
An	77	GA <u>EE</u> YIVEDY	GD <u>YN</u> -PCSSA	TS <u>LGT</u> TVYSDG	ST <u>YQ</u> VCTDTR	IN <u>EPS</u> ITG	123
At	77	QA <u>EE</u> YIVEDY	GD <u>YN</u> -PCSSA	TS <u>LGT</u> TVYSDG	ST <u>YQ</u> VCTDTR	IN <u>EPS</u> ITG	123
Tr1	73	L <u>VE</u> YIMEDN	H <u>NY</u> --PAQ-G	TV <u>KGT</u> VTSDG	AT <u>YT</u> TIWENTR	VN <u>EPS</u> IQG	117
Aa	84	L <u>IE</u> YIVESY	GD <u>YN</u> -PGSGG	TT <u>RGN</u> VSSDG	SV <u>YD</u> IYTATR	TN <u>APS</u> IDG	130
Ss	83	L <u>VE</u> YIVDNW	GS <u>YR</u> -PT--G	ET <u>RGT</u> VHSDG	GT <u>YD</u> IYKTTR	YN <u>APS</u> VEA	127
SlB	85	L <u>VE</u> YIVDNW	GT <u>YR</u> -PT--G	EY <u>KGT</u> VTSDG	GT <u>YD</u> IYKTTR	VN <u>KPS</u> VEG	129
SlC	83	L <u>VE</u> YIVDNW	GS <u>YR</u> -PT--G	TY <u>KGT</u> VSSDG	GT <u>YD</u> IYQTTR	YN <u>APS</u> VEG	127
Tl	84	L <u>VE</u> YIVENF	GT <u>YD</u> -PSSGA	TDL <u>GT</u> VECDG	SI <u>YRL</u> GKTTR	VN <u>APS</u> IDG	130
Tf	83	L <u>VE</u> YIVESW	GT <u>YR</u> -PT--G	TY <u>MGT</u> VTTDG	GT <u>YD</u> IYKTTR	YN <u>APS</u> IEG	127
Bc	76	L <u>IE</u> YVVD <u>SW</u>	GT <u>YR</u> -PT--G	TY <u>KGT</u> VKSDG	GT <u>YD</u> IYTTTR	YN <u>APS</u> IDG	120
Bs	76	L <u>IE</u> YVVD <u>SW</u>	GT <u>YR</u> -PT--G	TY <u>KGT</u> VKSDG	GT <u>YD</u> IYTTTR	YN <u>APS</u> IDG	120
Tr2#		140	150	160			
Bp	136	-IAT <u>FKQ</u> YWS	VRQT <u>KRTS</u> --	-----GTVS	VSA <u>HFR</u> KWES	L <u>GMP</u> M-GK	174
Ca	168	-NTT <u>FKQ</u> YWS	VRRT <u>KRTS</u> --	-----GTIS	VSK <u>HFA</u> AWES	K <u>GMP</u> L-GK	206
Fs	140	-TQT <u>FQ</u> YFS	VRKS <u>ARSC</u> --	-----GHID	ITA <u>HMK</u> KWEE	L <u>GKM</u> M-GK	178
Cs	139	-TAT <u>FQ</u> YWS	VRTS <u>KRTS</u> --	-----GTIS	VTE <u>HFK</u> QWER	M <u>GMP</u> M-GK	177
Rf	141	-TAT <u>FQ</u> YWS	VRQT <u>SGS</u> ANN	QTN <u>YMK</u> GTID	VSK <u>HFD</u> AWSA	AGL <u>DMS</u> GT	187
Tr2	131	-TAT <u>FQ</u> YWS	VRN <u>HR</u> -S-S	-----GSVN	TAN <u>HFN</u> AWAQ	QGL <u>TL</u> -GT	168
Tv	131	-TAT <u>FQ</u> YWS	VRRT <u>HR</u> -S-S	-----GSVN	TAN <u>HFN</u> AWAQ	QGL <u>TL</u> -GT	168
Th	131	-TAT <u>FQ</u> YWS	VRN <u>HR</u> -S-S	-----GSVN	TAN <u>HFN</u> AWAS	HGL <u>TL</u> -GT	168
Sc	132	-TQT <u>FEQ</u> FWS	VRNP <u>KKAP</u> GG	SIS---GTVD	VQCH <u>FDA</u> WKG	L <u>GML</u> LGSE	175
An	124	-TST <u>FTQ</u> YFS	VR <u>ESTRTS</u> --	-----GTVT	VAN <u>HFN</u> FWAQ	H <u>GFG</u> N-SD	162
At	124	-TST <u>FTQ</u> YFS	VR <u>ESTRTS</u> --	-----GTVT	VAN <u>HFN</u> FWAH	H <u>GFG</u> N-SD	162
Tr1	118	-TAT <u>FNQ</u> YIS	VRN <u>SPR</u> -T-S	-----GTVT	VQNH <u>FN</u> -WAS	LGL <u>HLG</u> QM	155
Aa	131	-TQT <u>FQ</u> YWS	VRQ <u>NKR</u> -VG-	-----GTVT	TSN <u>HFN</u> AWAK	L <u>GML</u> NL-GT	168
Ss	128	-PAA <u>FDQ</u> YWS	VRQSK <u>VT</u> --S	-----GTIT	TGN <u>HFD</u> AWAR	AGM <u>NMG</u> NF	168
SlB	130	TR-T <u>FDQ</u> YWS	VRQSK <u>R</u> -TG-	-----GTIT	TGN <u>HFD</u> AWAR	AGM <u>PLG</u> NF	168
SlC	128	TK-T <u>FDQ</u> YWS	VRQSK <u>VTSGS</u>	-----GTIT	TGN <u>HFD</u> AWAR	AGM <u>NMG</u> QF	168
Tl	131	TQ-T <u>FDQ</u> YWS	VRQDK <u>R</u> -T-S	-----GTVQ	TGCH <u>FDA</u> WAR	AGL <u>NVNG</u> D	169
Tf	128	TR-T <u>FDQ</u> YWS	VRQSK <u>RTS</u> --	-----GTIT	AGN <u>HFD</u> AWAR	H <u>GML</u> LGTH	166
Bc	121	DRTT <u>FTQ</u> YWS	VRQSK <u>RPTGS</u>	N-----ATIT	FTN <u>HVN</u> AWKS	H <u>GML</u> NLGSN	163
Bs	121	DRTT <u>FTQ</u> YWS	VRQSK <u>RPTGS</u>	N-----ATIT	FSN <u>HVN</u> AWKS	H <u>GML</u> NLGSN	163

Figure 1, jatkuu

Tr2#		170	180	190	
Bp	175	MYETAFTVEG	YQSSGSANVM	TNQLFIGN	201
Ca	207	MHETAFNIEG	YQSSGKADVN	SMSINIGK	233
Fs	179	MYEAKVLVEA	GGSGSFDV-	TYFKMT	203
Cs	178	MYEVALTVEG	YQSSGYANVY	KNEIRIGANP....	
Rf	188	LYEVSLNIEG	YRSNGSANVK	SVSV	211
Tr2	169	MDYQIVAVEG	YFSSGSASI-	TVS	190
Tv	169	MDYQIVAVEG	YFSSGSASI-	TVS	190
Th	169	MDYQIVAVEG	YFSSGSASI-	TVS	190
Sc	176	HNYQIVATEG	YQSSGTATI-	TVT	197
An	163	FNYQVMAVEA	WSGAGSASV-	TISS	184
At	163	FNYQVVAVEA	WSGAGSAAV-	TISS	184
Tr1	157	MNYQVVAVEG	WGGSGSASQ-	SVSN	178
Aa	169	HNYQILATEG	YQSSGSSSI-	TIQ	190
Ss	167	RYYMINATEG	YQSSGSSTI-	TVSG	189
SlB	169	SYYMINATEG	YQSSGTSSI-	NVGG.....	
SlC	169	RYYMINATEG	YQSSGSSNI-	TVSG	191
Tl	170	HYYQIVATEG	YFSSGYARI-	TVADVG	194
Tf	167	D-YMIMATEG	YQSSGSSNVT	LGTS.....	
Bc	164	WAYQVMATEG	YQSSGSSNV-	TVW	185
Bs	164	WAYQVMATEG	YQSSGSSNV-	TVW	185

Bp *Bacillus pumilus*
 Ca *Clostridium acetobutylicum* P262 XynB
 Cs *Clostridium stercorarium* xynA
 Rf *Ruminococcus flavefaciens*
 Tr2 *Trichoderma reesei* XYN II
 Tv *Trichoderma viride*
 Th *Trichoderma harzianum*
 Sc *Schizophyllum commune* Xylanase A
 An *Aspergillus niger*, var. *awamori*
 At *Aspergillus tubigenensis*
 Tr1 *Trichoderma reesei* XYN I
 Aa *Aspergillus awamori* var. *kawachi* Xyn B
 Fs *Fibrobacter sccinogenes* XYN II
 Ss *Streptomyces* sp. 36a
 SlB *Streptomyces lividans* Xln B
 SlC *Streptomyces lividans* Xln C
 Tl *Thermomyces lanuginosus* Xyn
 Tf *Thermomonospora fusca* TfxA
 Bc *Bacillus circulans*
 Bs *Bacillus subtilis*

Figure 1, jatkuu

5'-CT AGC TAA GGA GG CTG CAG ATGst
G ATT CCT CC GAC GTC TAC
NheI | PstI

TrX-1
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Q T I Q P G T G Y N N G Y F Y S
CAA ACA ATA CAA CCA GGA ACC GGT TAC AAC AAC GGT TAC TTT TAC AGC
GTT TGT TAT GTT GGT CCT TGG CCA ATG TTG TTG CCA ATG AAA ATG TCG
TrX-8 AgeI |

XyTv-2
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
Y W N D G H G G V T Y T N G P G
TAT TGG AAC GAT GGC CAT GGT GGT GTT ACC TAT ACA AAC GGG CCC GGA
ATA ACC TTG CTA CCG GTA CCA CCA CAA TGG ATA TGT TTG CCC GGG CCT
NcoI XyTv-7 ApaI

33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
G Q F S V N W S N S G N F V G G
GGC CAA TTT AGC GTC AAT TGG TCT AAC TCC GGA AAC TTC GTA GGT GGA
CCG GTT AAA TCG CAG TTA ACC AGA TTG AGG CCT TTG AAG CAT CCA CCT
MunI BspEI

TrX-3
49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64
K G W Q P G T K N K V I N F S G
AAA GGT TGG CAA CCC GGG ACC AAA AAT AAG GTG ATC AAC TTC TCT GGA
TTT CCA ACC GTT GGG CCC TGG TTT TTA TTC CAC TAG TTG AAG AGA CCT
XmaI TrX-6

65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
S Y N P N G N S Y L S V Y G W S
TCT TAT AAT CCG AAT GGG AAT TCA TAC TTA AGC GTC TAT GGC TGG TCT
AGA ATA TTA GGC TTA CCC TTA AGT ATG AAT TCG CAG ATA CCG ACC AGA
EcoRI AflIII

XyTv-4
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95
R N P L I E Y Y I V E N F G T
AGA AAC CCA CTG ATT GAA TAT TAC ATT GTC GAA AAT TTC GGT AC
TCT TTG GGT GAC TAA CTT ATA ATG TAA CAG CTT TTA AAG C
XbaI I XyTv-5 KpnI

Figure 2

1
 V D N F G T Y N P S T G A T K L
 TC GAC AAT TTC GGT ACC TAC AAT CCG AGT ACC GGC GCC ACA AAA TTA
 3'-G TTA AAG CCA TGG ATG TTA GGC TCA TGG CCG CGG TGT TTT AAT
 SalI | KpnI XyTv-110 KasI/NarI

106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121
 G E V T S D G S V Y D I Y R T Q
 GGC GAA GTC ACT AGT GAT GGA TCC GTA TAT GAT ATC TAC CGT ACC CAA
 CCG CTT CAG TGA TCA CTA CCT AGG CAT ATA CTA TAG ATG GCA TGG GTT
 SpeI BamHI XyTv-109

122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137
 R V N Q P S I I G T A T F Y Q Y
 CGC GTT AAT CAG CCA TCG ATC ATT GGA ACC GCC ACC TTT TAT CAG TAC
 GCG CAA TTA GTC GGT AGC TAG TAA CCT TGG CGG TGG AAA ATA GTC ATG
 MluI ClaI TrX-103

138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153
 W S V R R N H R S S G S V N T A
 TGG AGT GTT AGA CGT AAT CAT CGG AGC TCC GGT TCG GTT AAT ACT GCG
 ACC TCA CAA TCT GCA TTA GTA GCC TCG AGG CCA AGC CAA TTA TGA CGC
 TrX-108 SacI

154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169
 N H F N A W A Q Q G L T L G T M
 AAT CAC TTT AAT GCA TGG GCA CAG CAA GGG TTA ACC CTA GGT ACA ATG
 TTA GTG AAA TTA CGT ACC CGT GTC GTT CCC AAT TGG GAT CCA TGT TAC
 NsiI XyTv-107 AvrII

170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185
 D Y Q I V A V E G Y F S S G S A
 GAT TAT CAA ATC GTA GCG GTG GAA GGC TAC TTC TCG AGT GGT TCC GCT
 CTA ATA GTT TAG CAT CGC CAC CTT CCG ATG AAG AGC TCA CCA AGG CGA
 XyTv-105 XhoI

186 187 188 189 190
 S I T V S
 AGT ATT ACA GTG AGC TAA A
 TCA TAA TGT CAC TCG ATT TCT AG-5'
 BglIII |

Figure 2, jatkuu

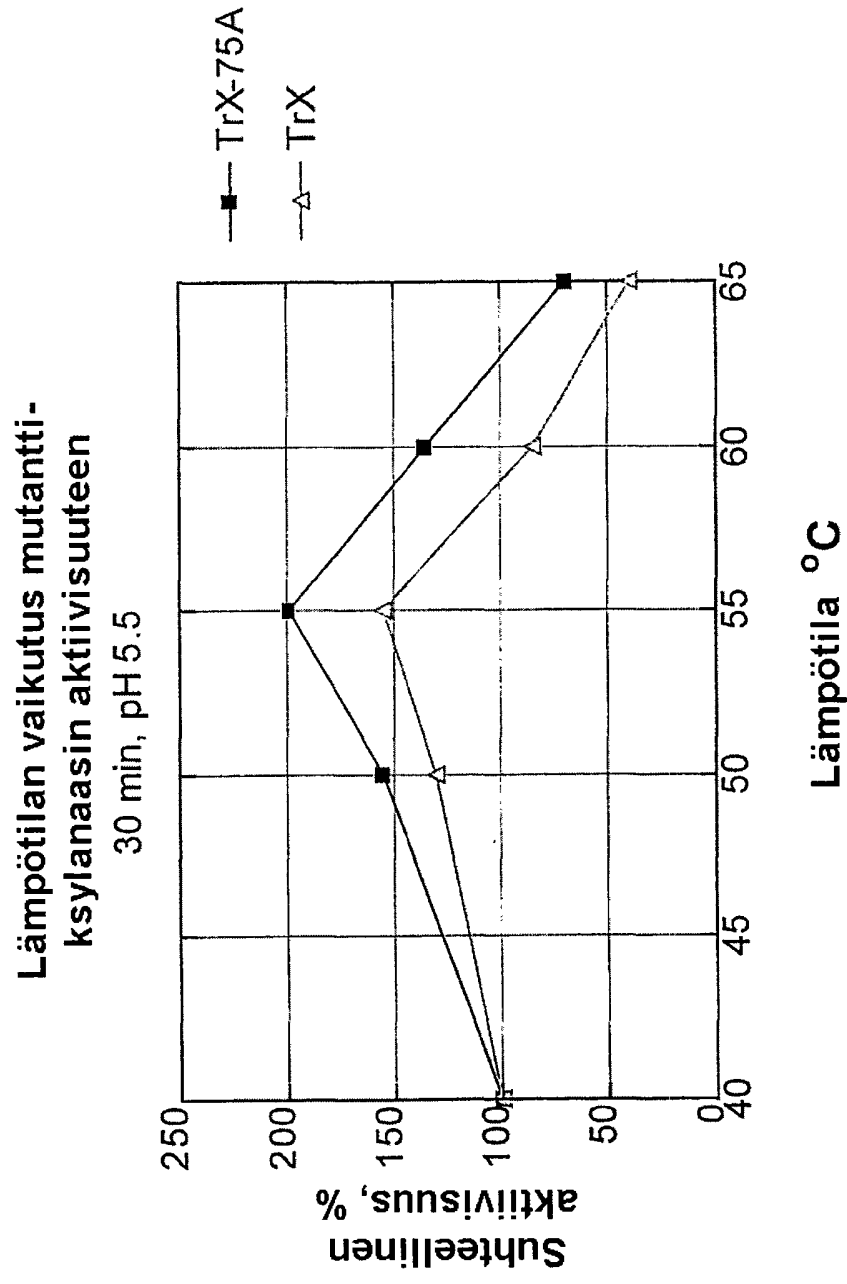


Figure 3

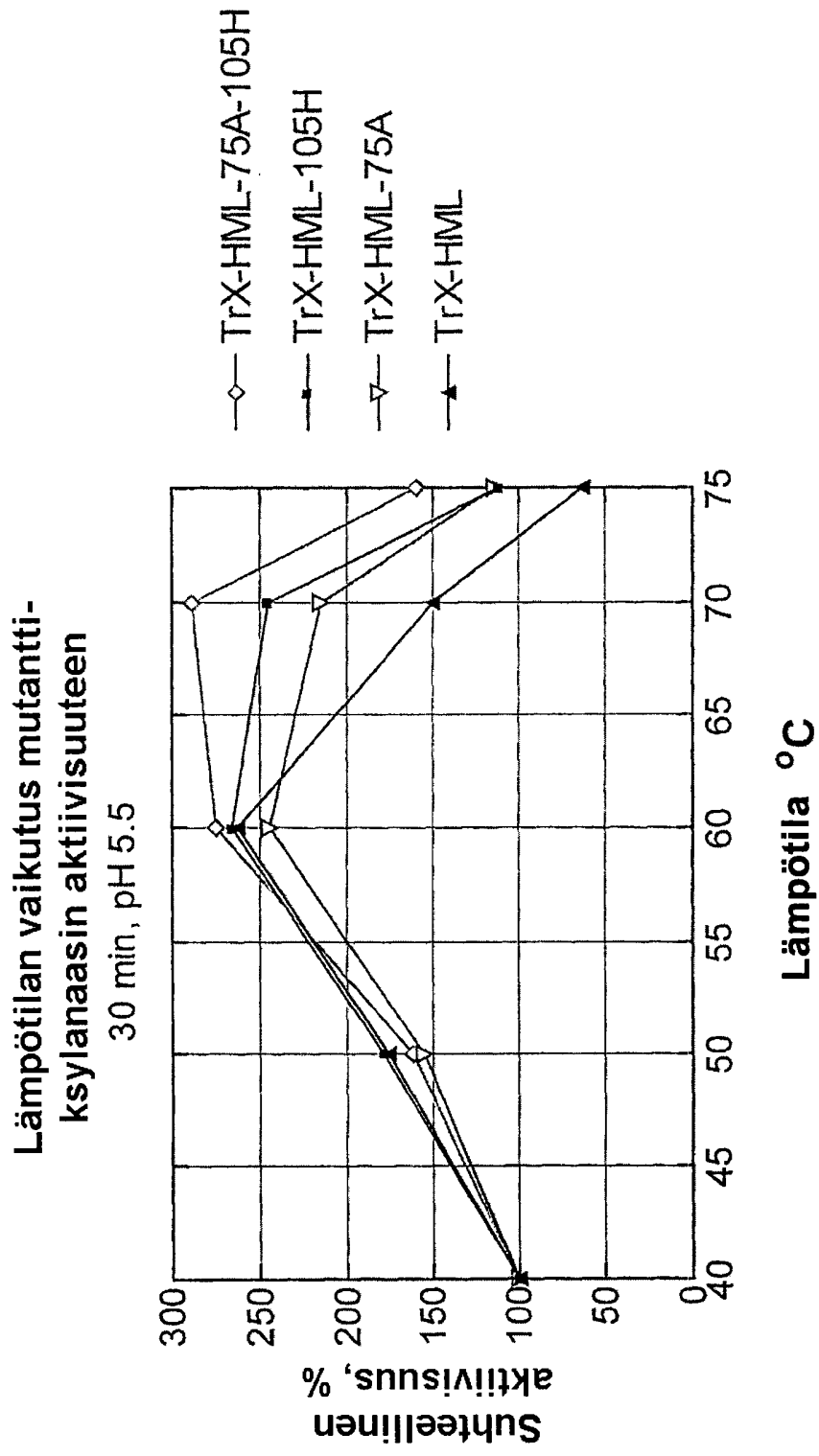


Figure 4

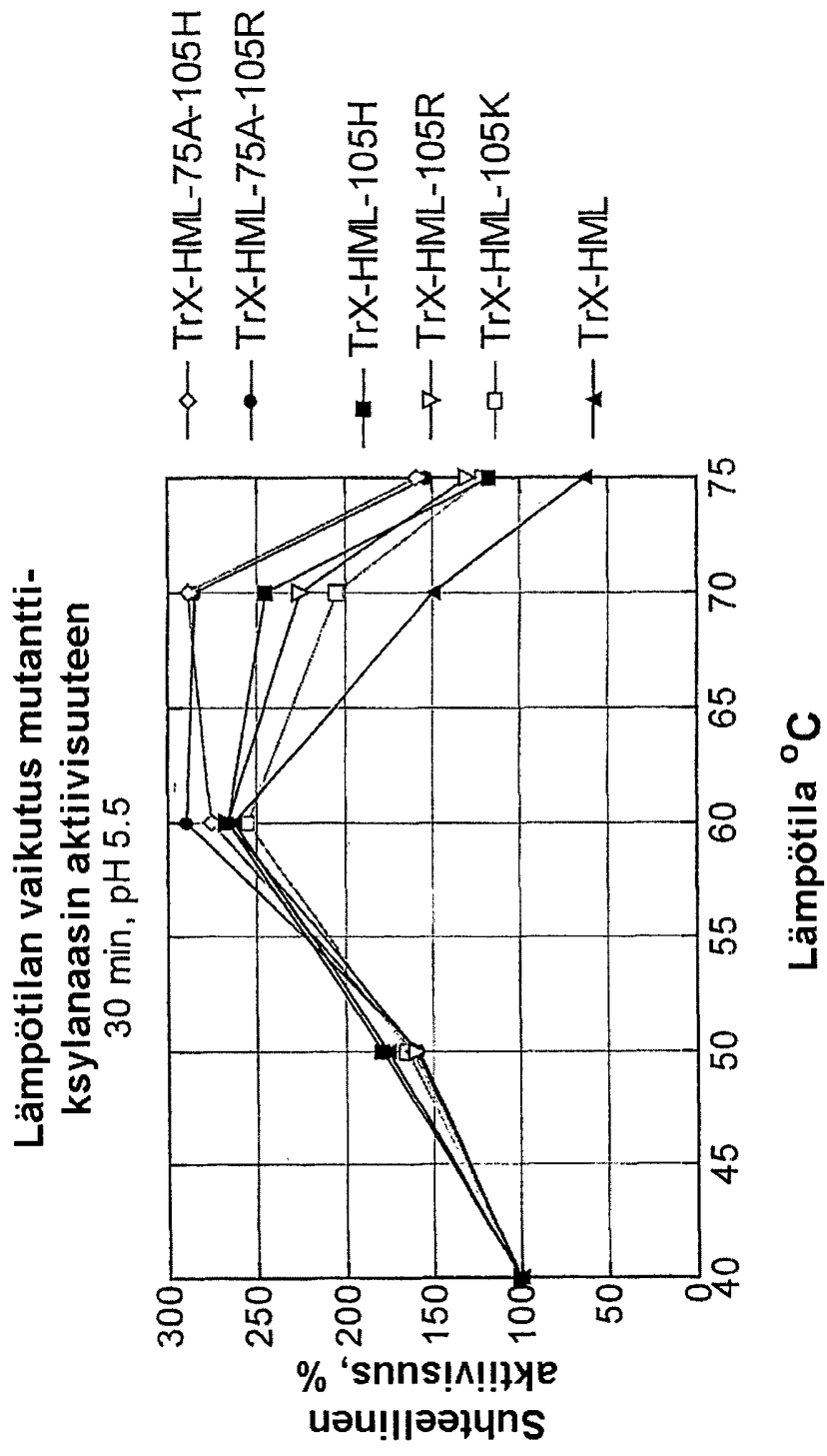


Figure 5

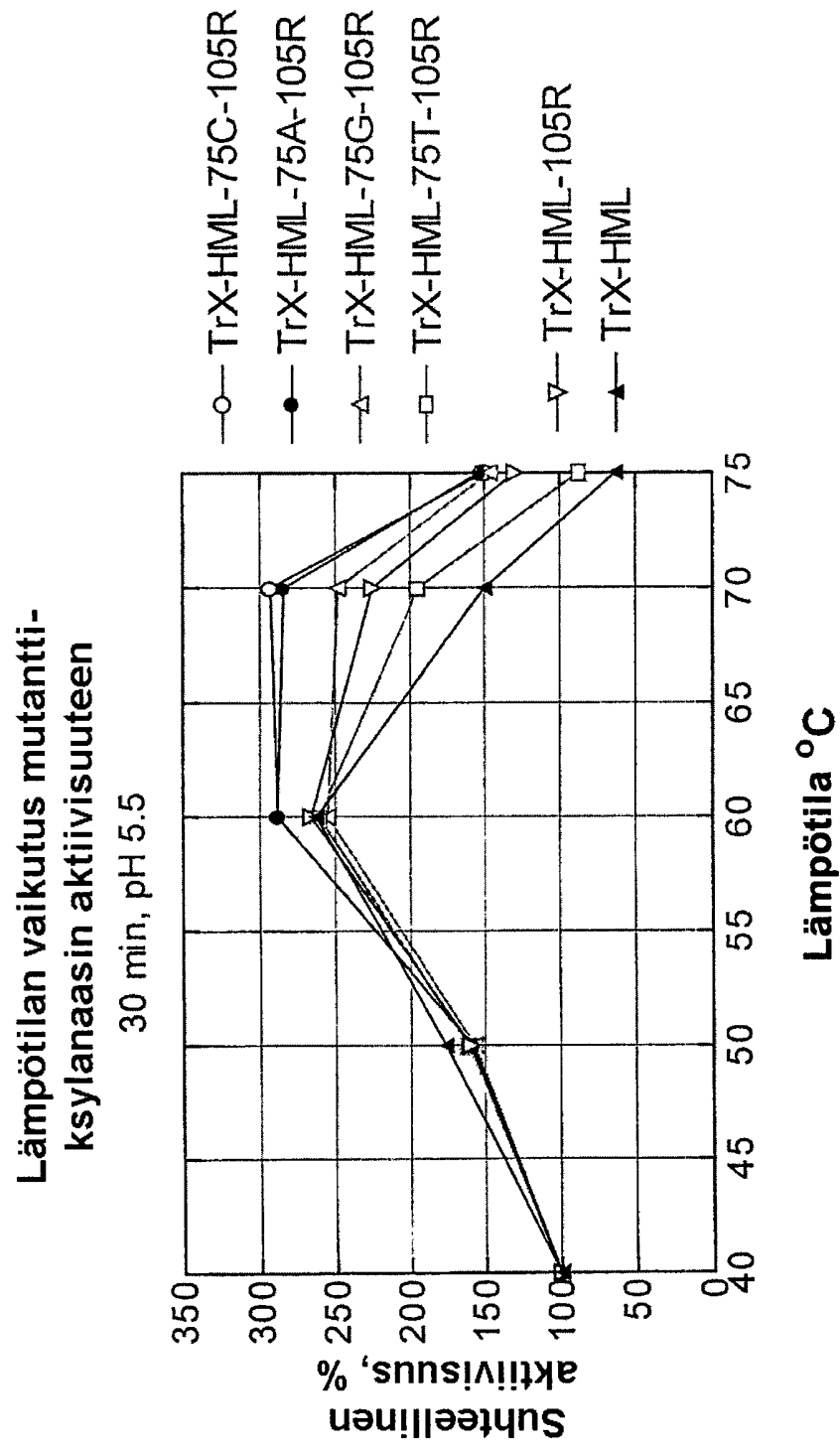


Figure 6

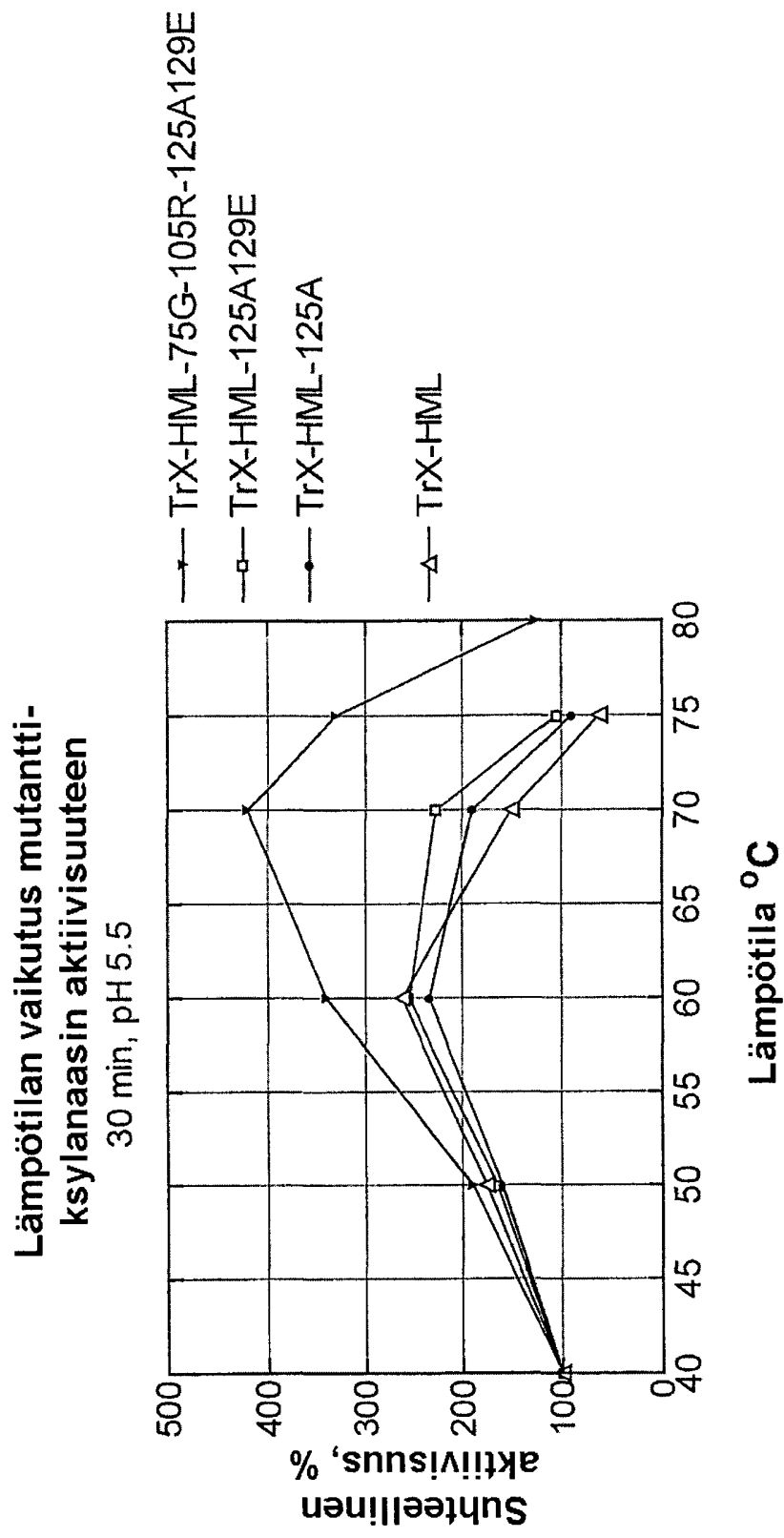


Figure 7

Lämpötilan vaikutus mutantti-
ksylanaasin aktiivisuuteen
30 min, pH 5.5

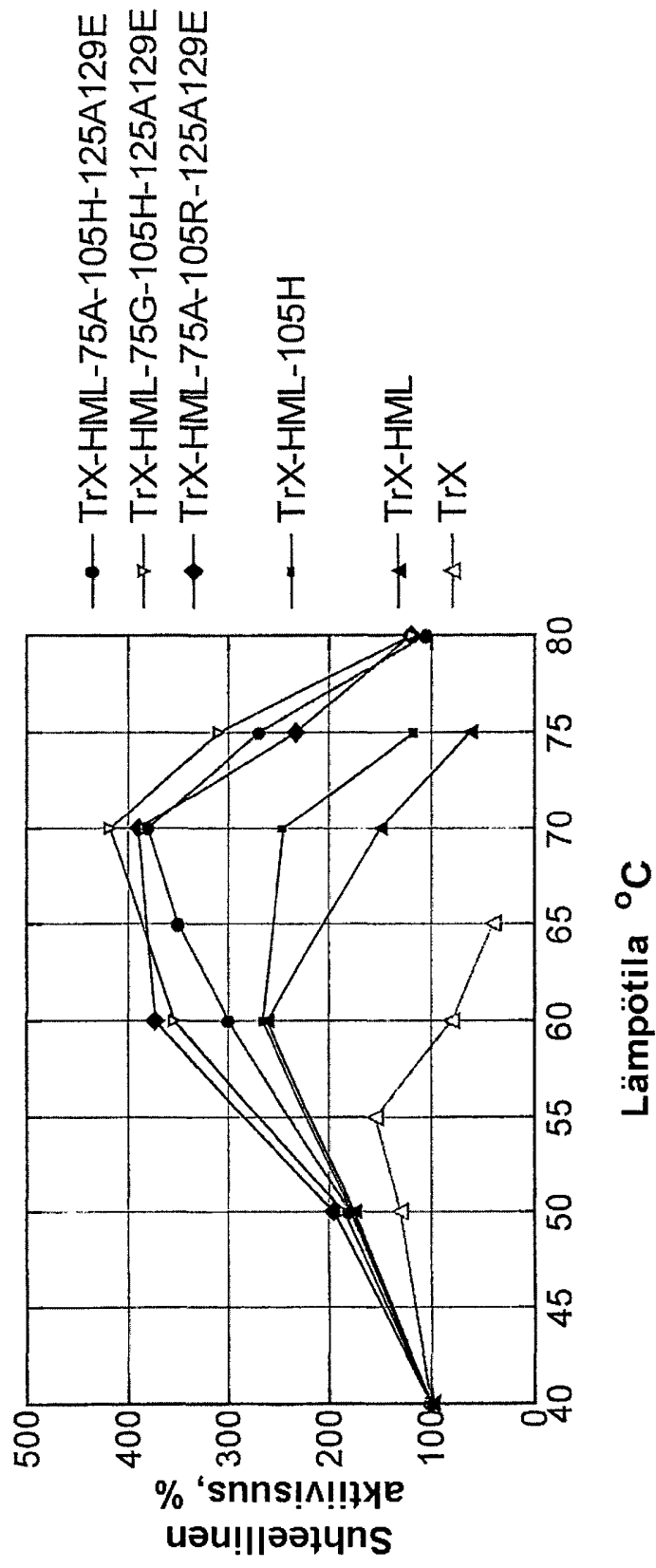


Figure 8

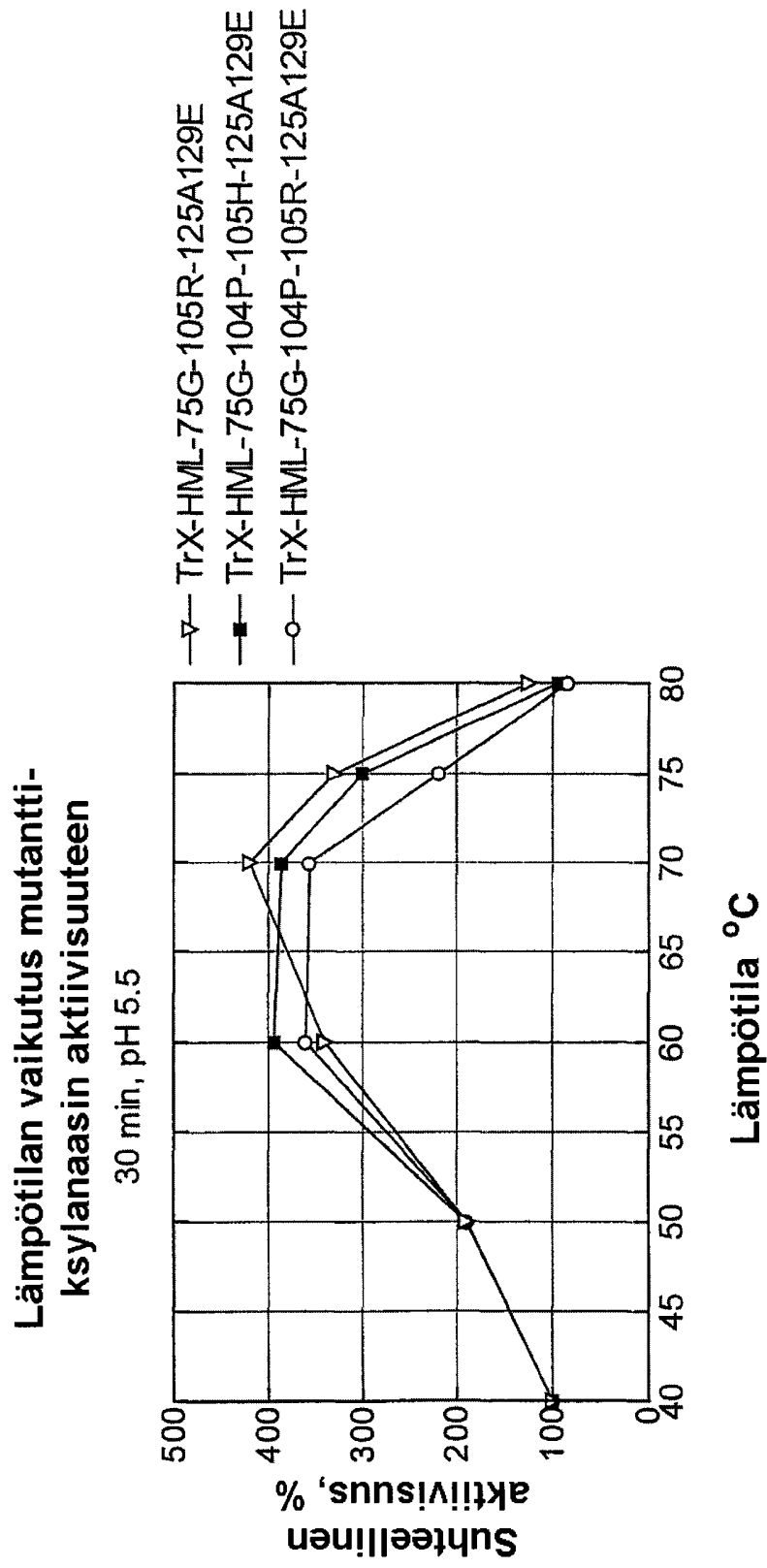


Figure 9

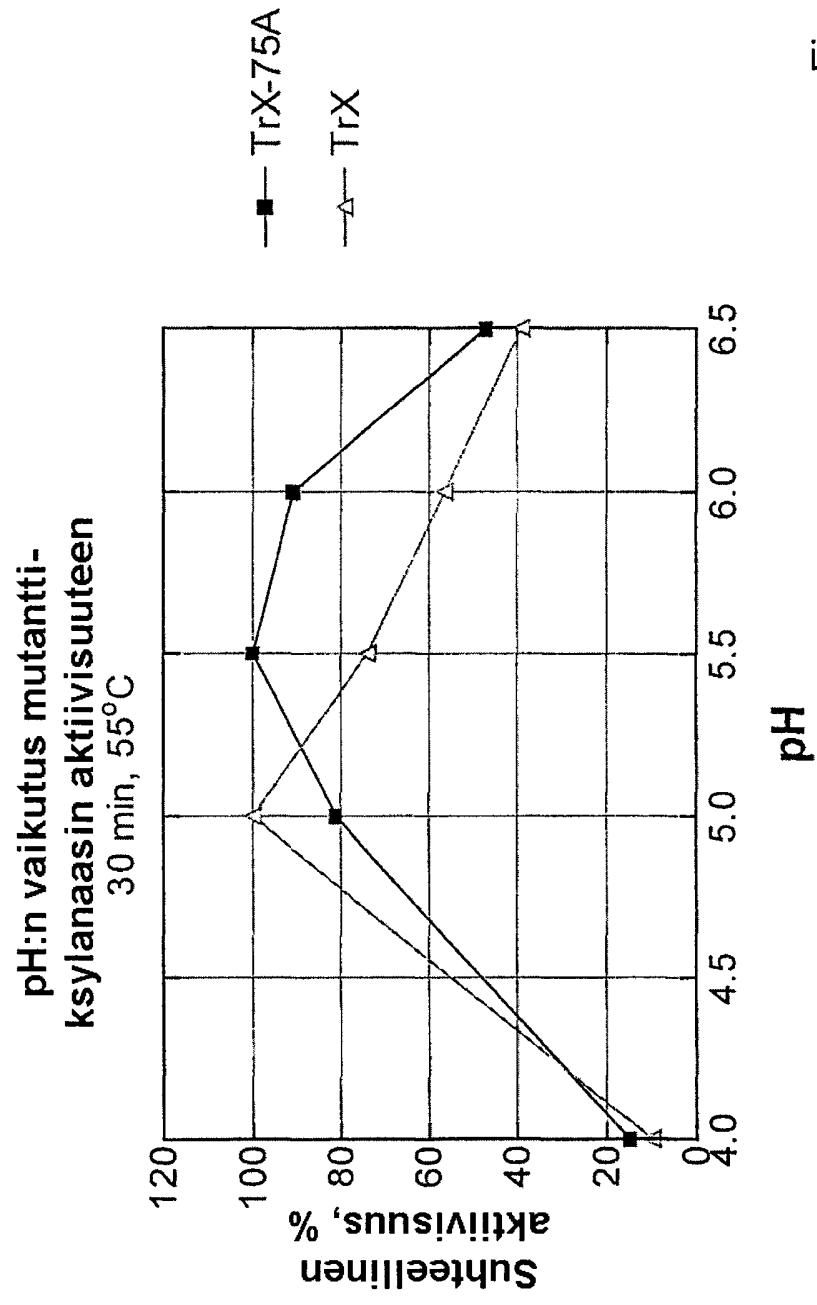


Figure 10

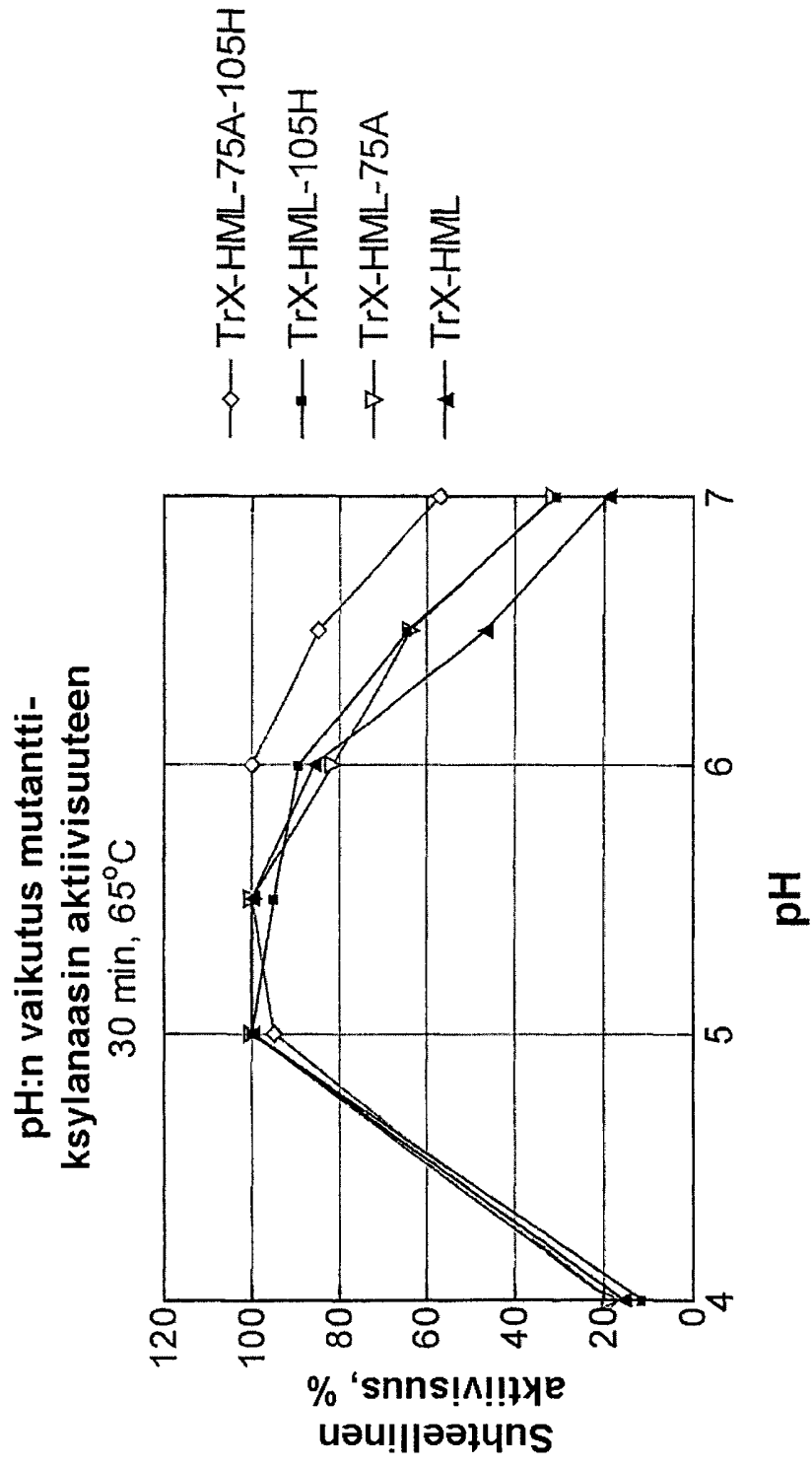


Figure 11

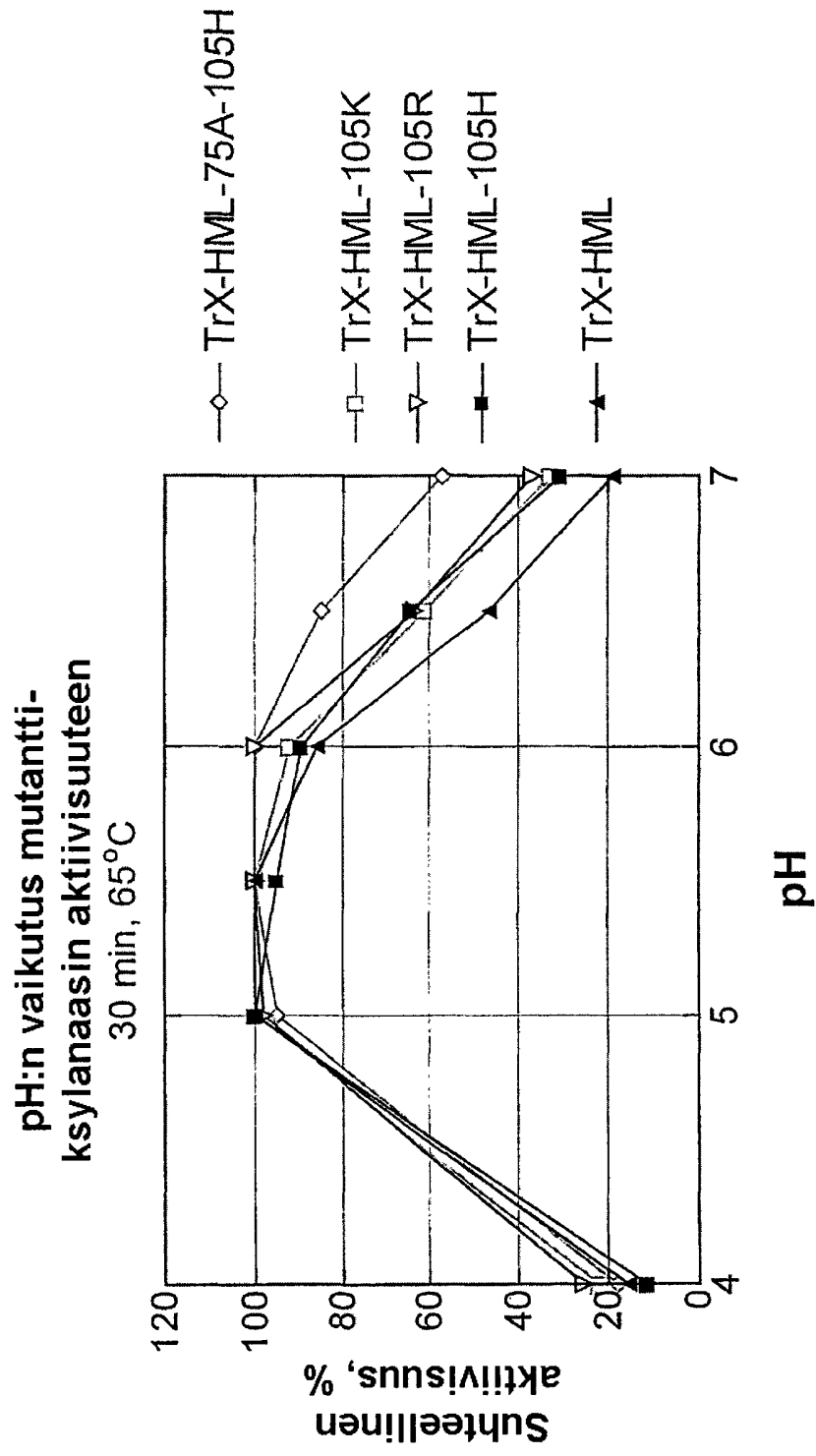


Figure 12

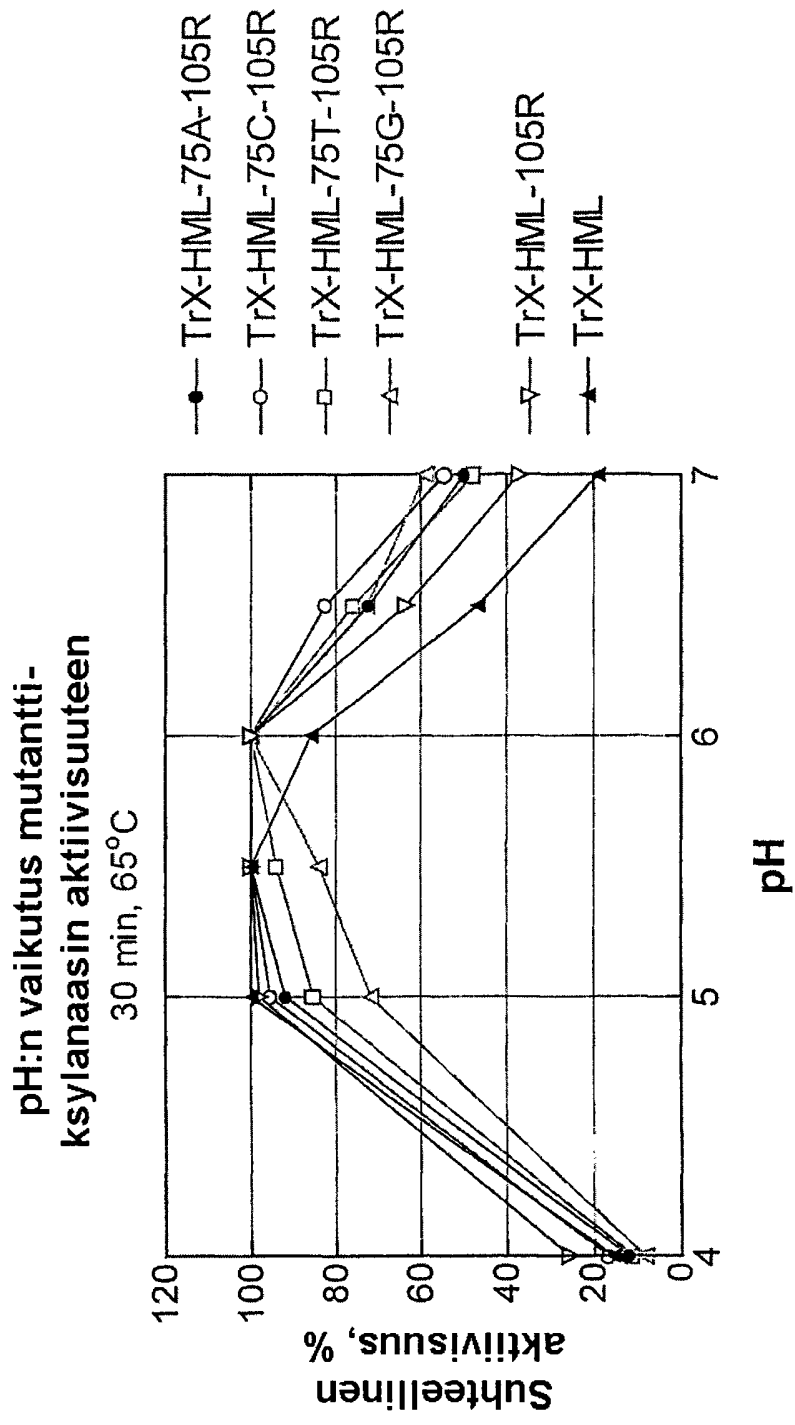


Figure 13

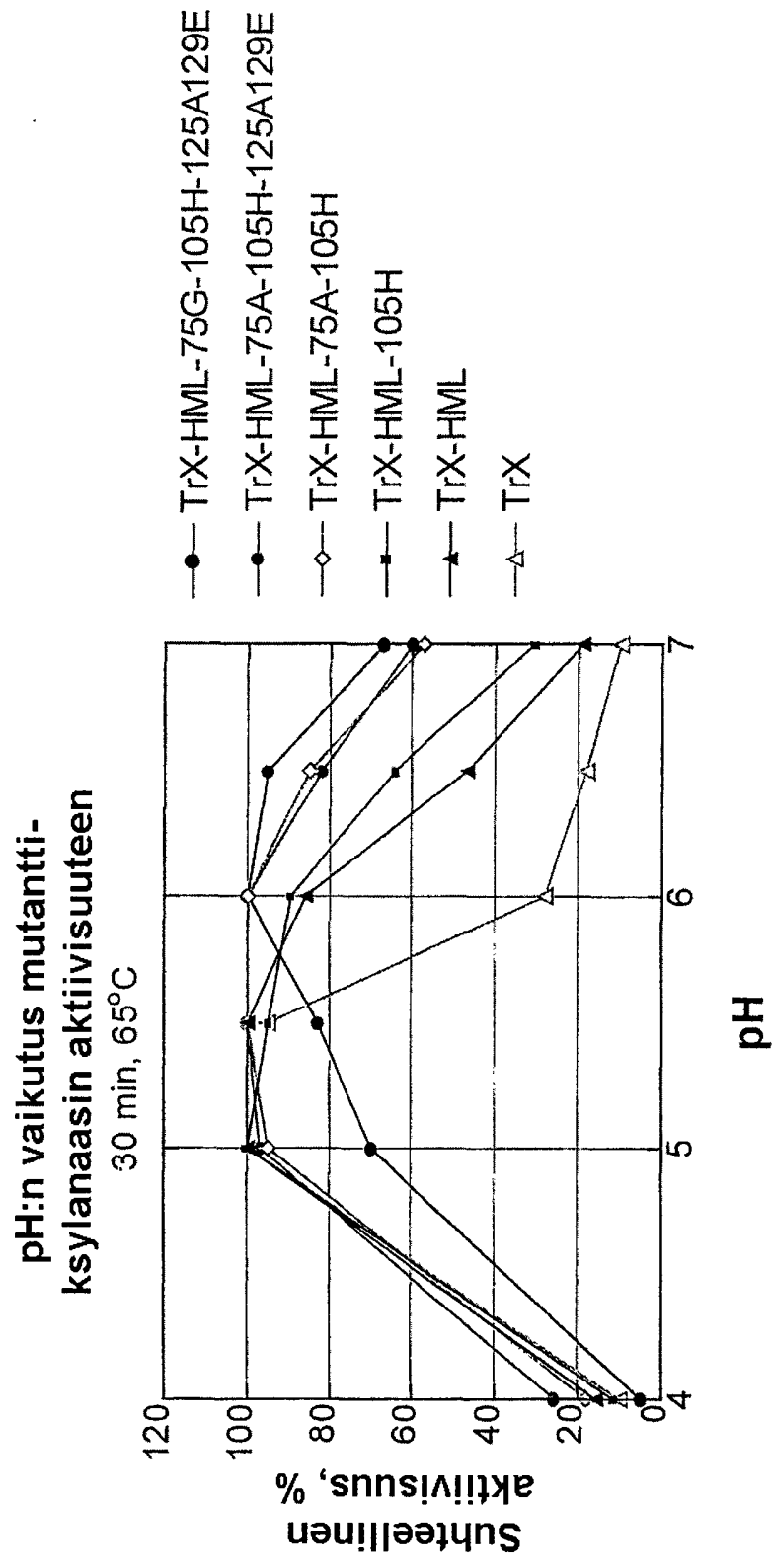


Figure 14

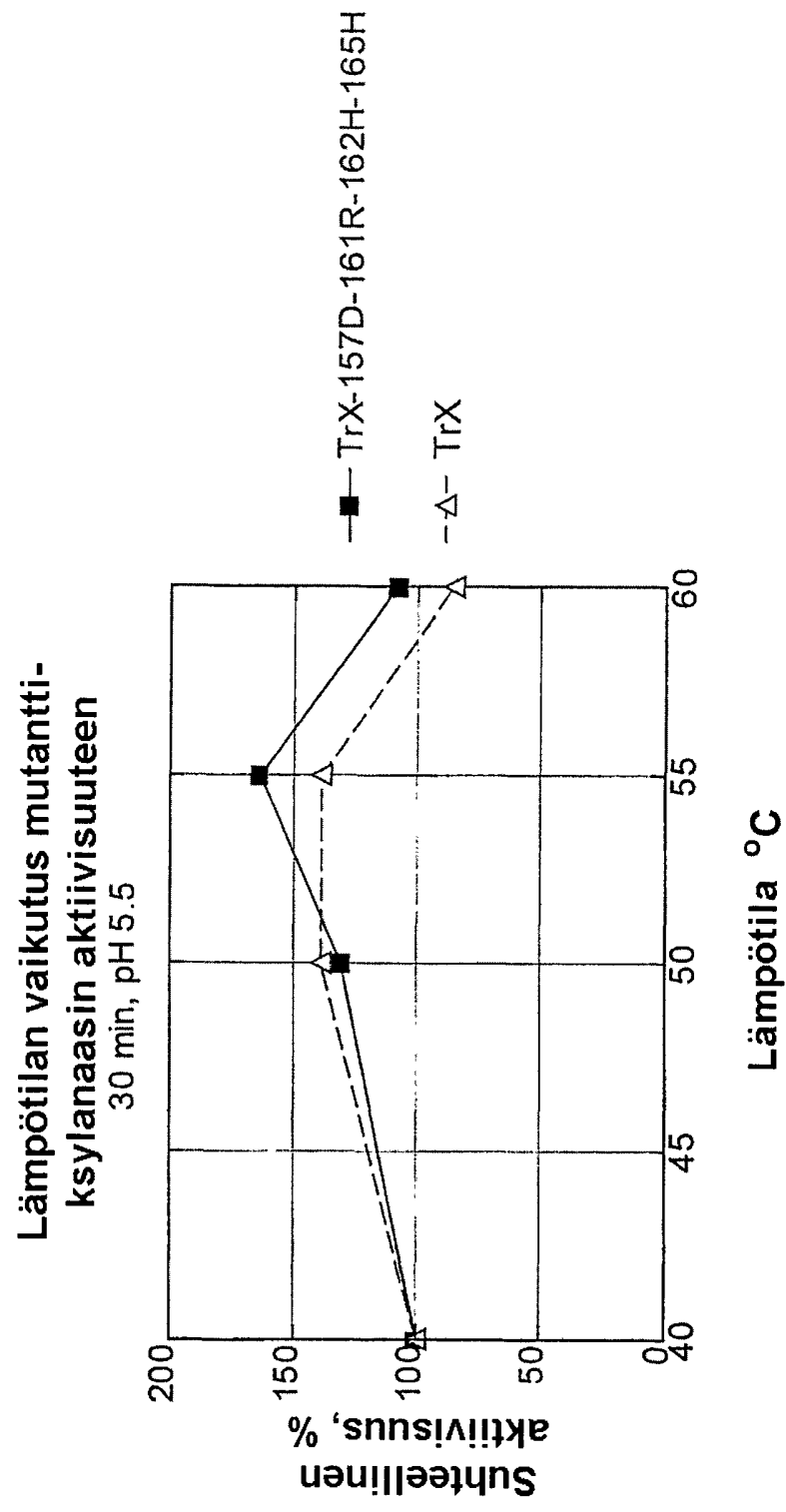


Figure 15

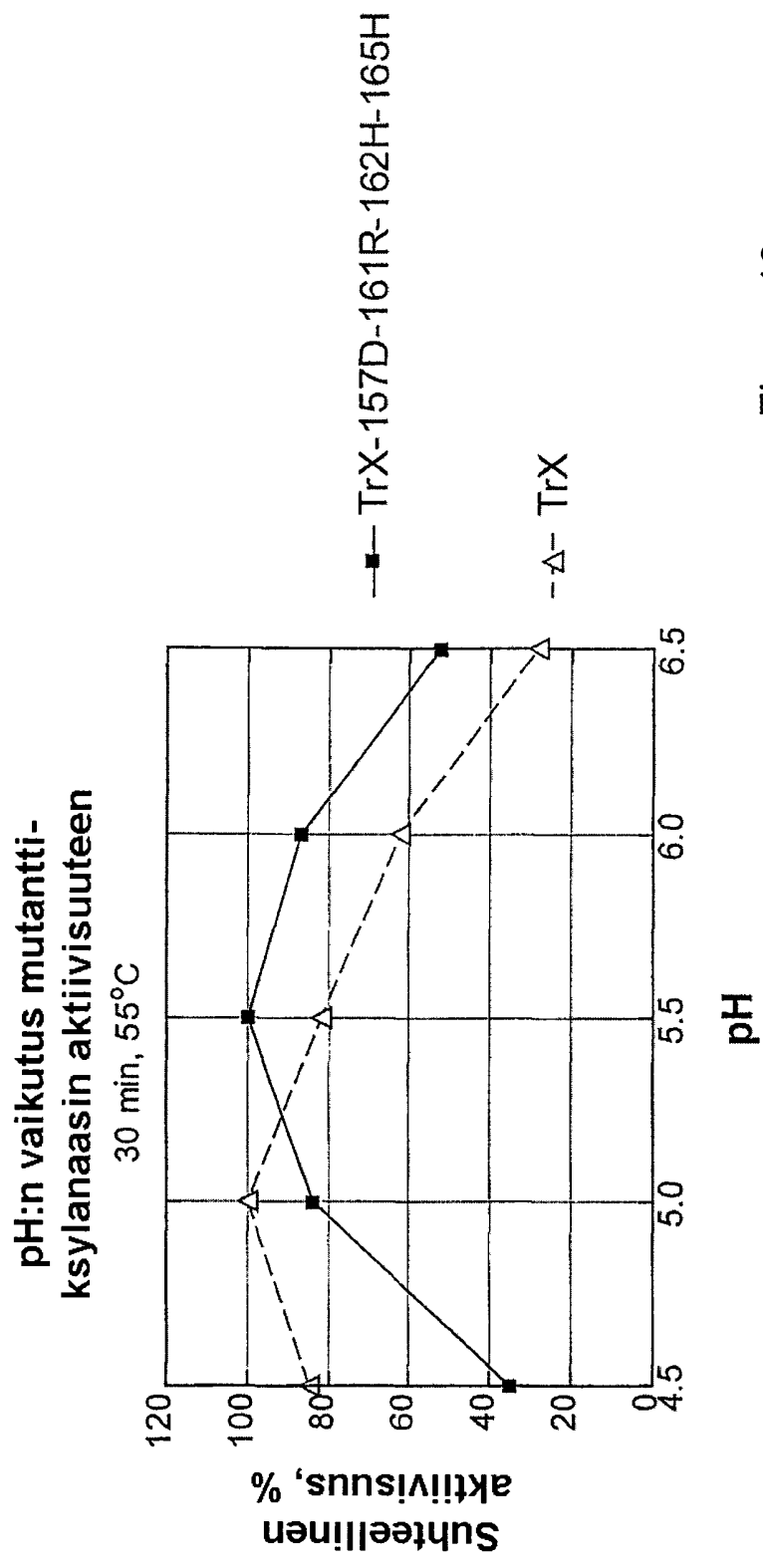


Figure 16

Lämpötilan vaikutus mutantti-
ksylanaasin aktiivisuuteen
TrX-HML-AHAE-RR ja
TrX-HML-AHAE-RRR

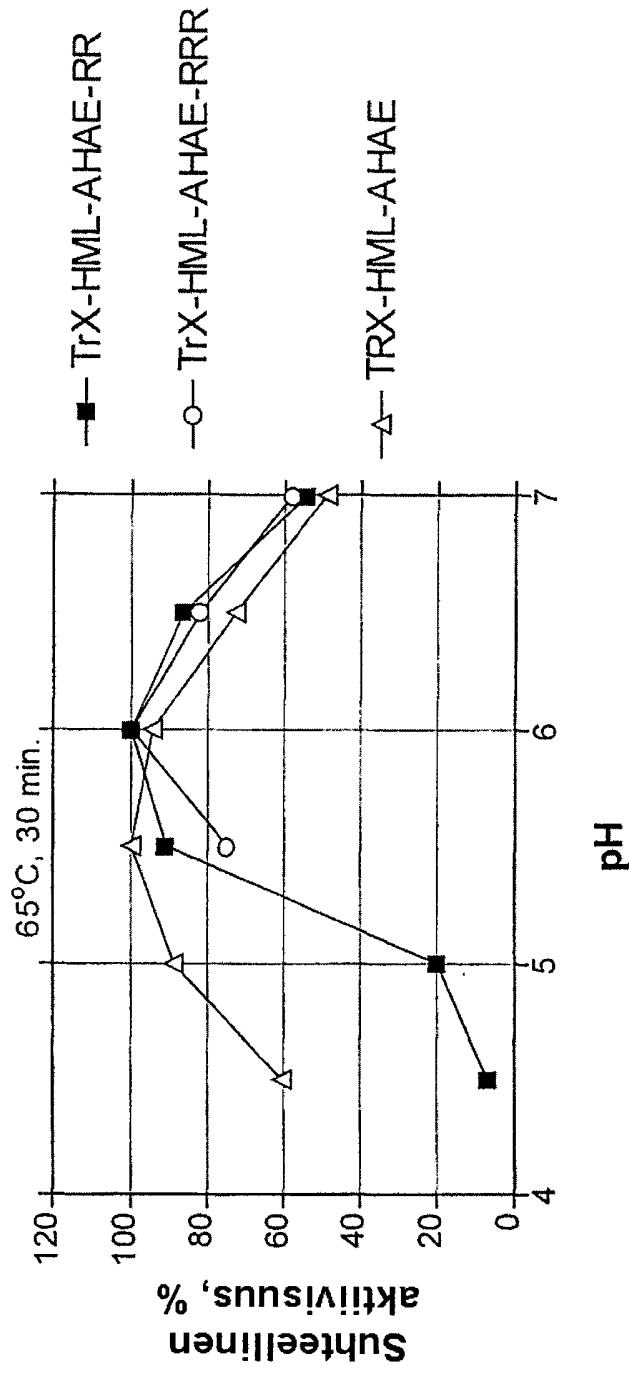


Figure 17

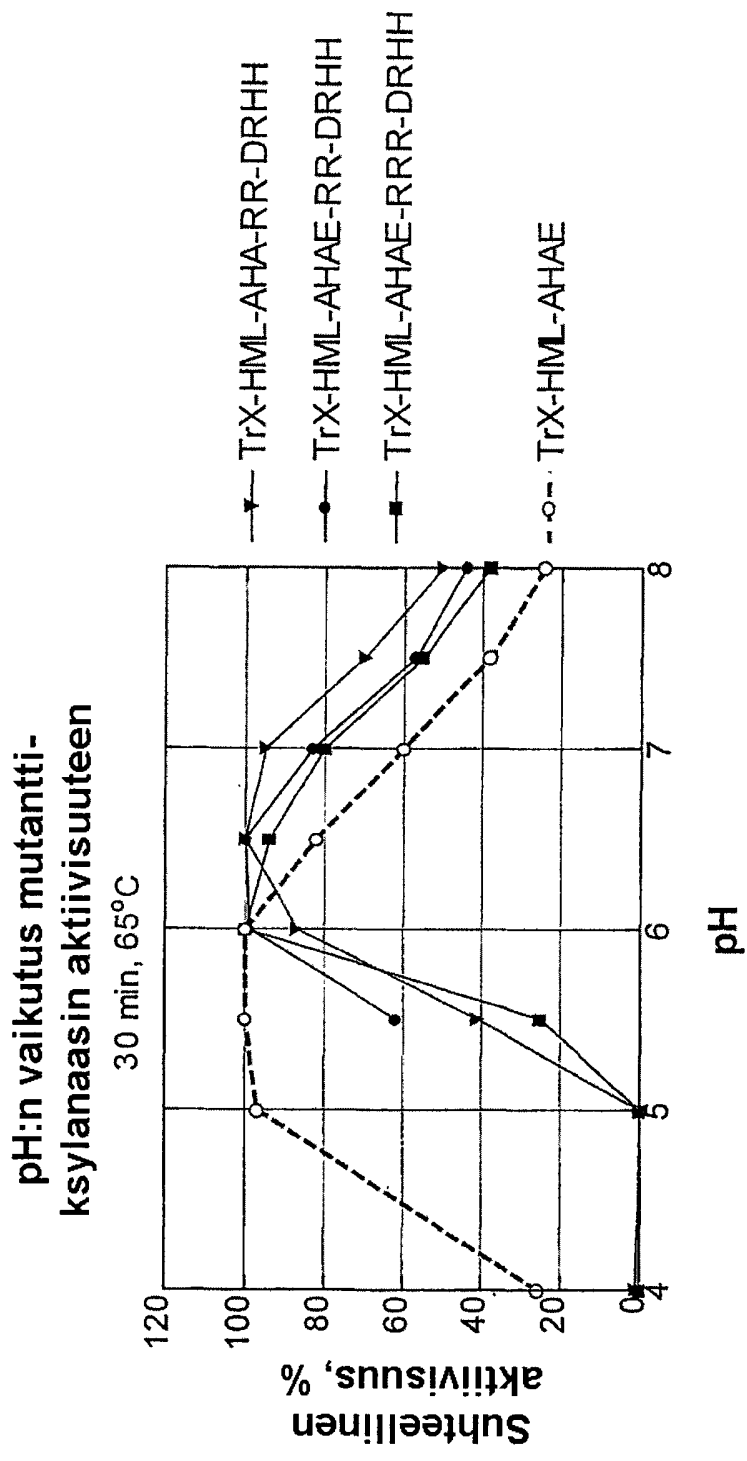


Figure 18

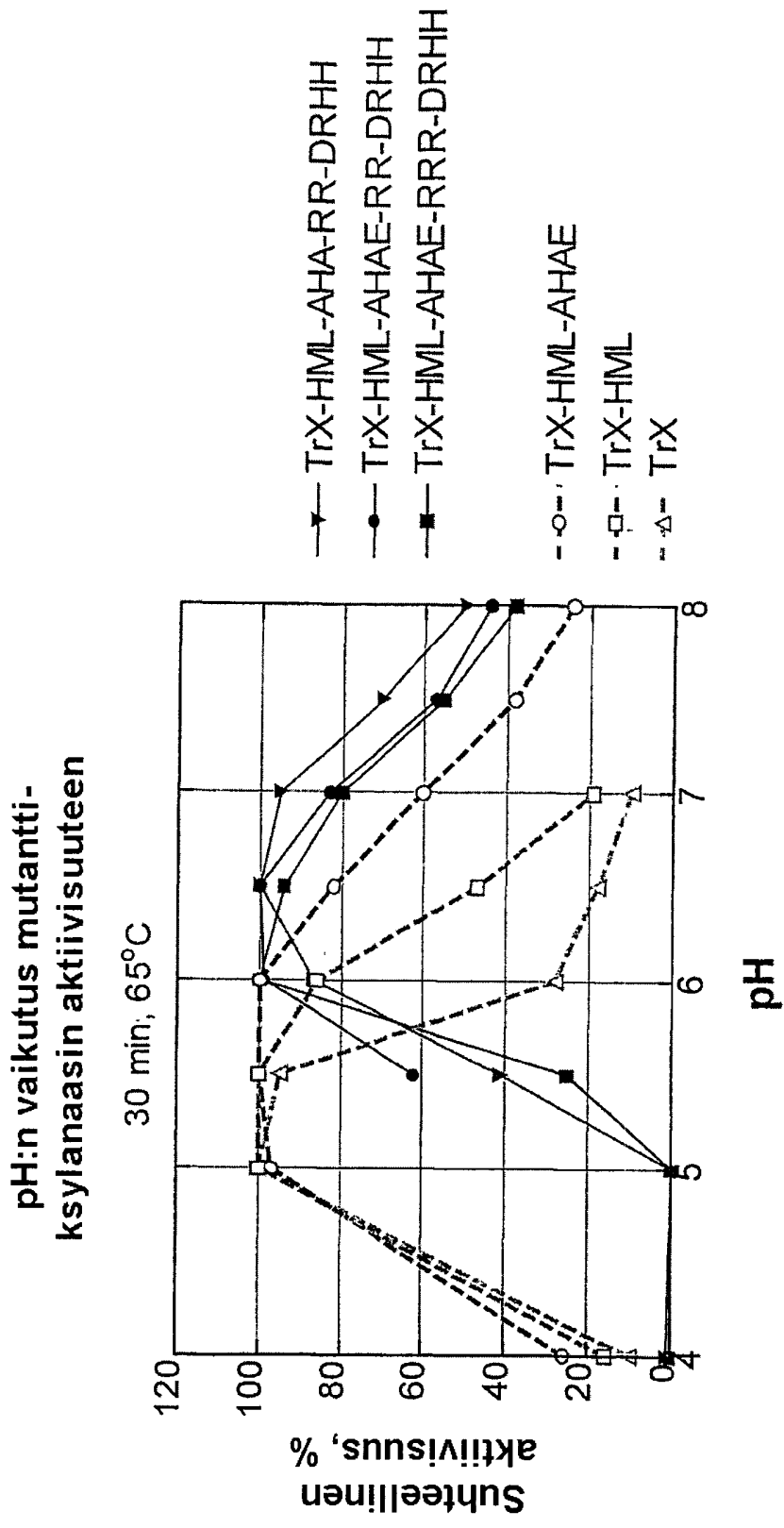


Figure 19

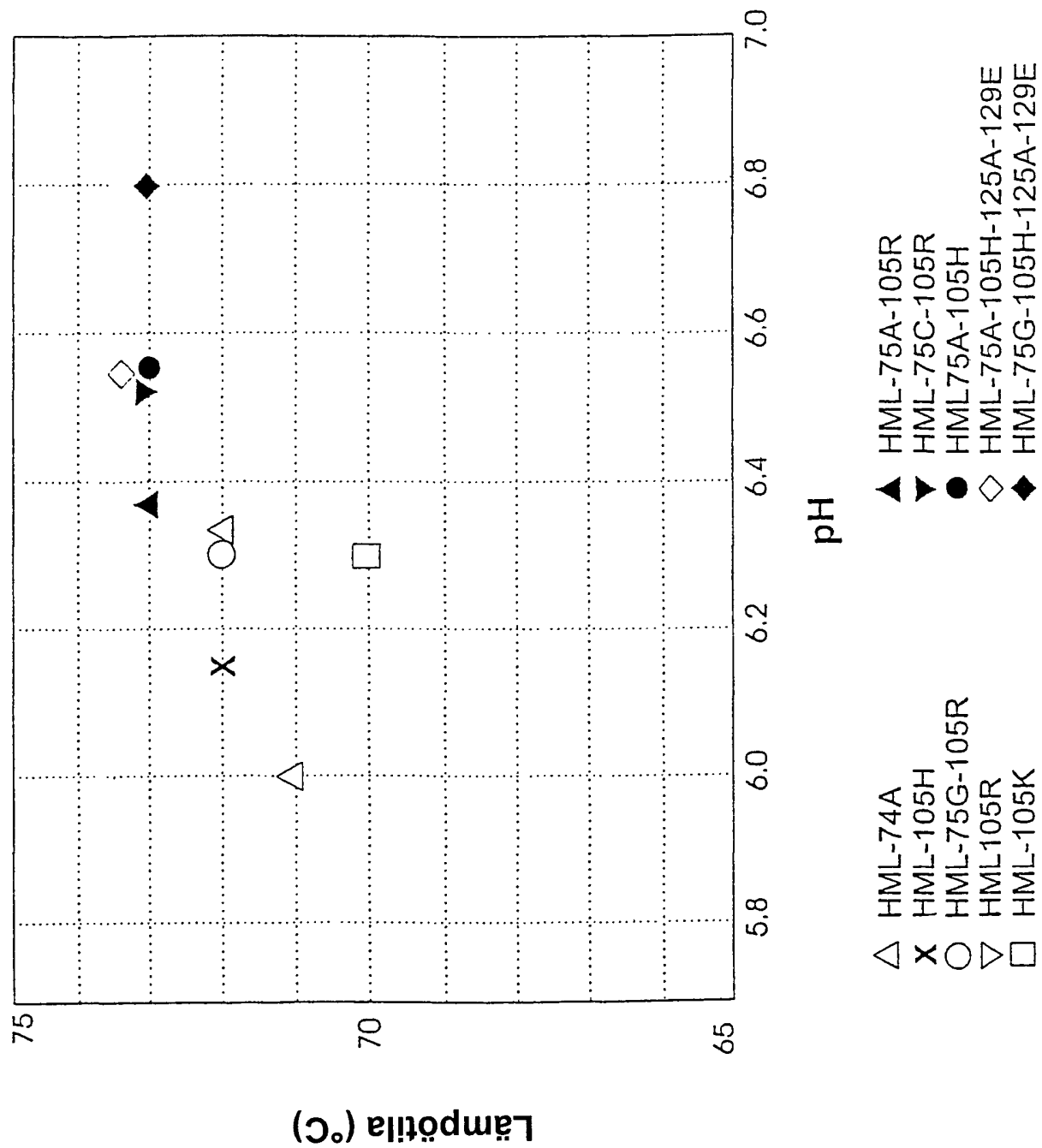


Figure 20