

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 862208 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 862208

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

C12N 1/20

C12N 9/08

C12N 15/00

C12P 7/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 24.09.1985

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.05.1986

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 26.05.1986

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 24.09.1985 PCT/US1985/001832
Internationell ansökan - International
application

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

27.09.1984 US 655193

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Research Corporation, Suite 853, 25 Broadway New York, New York, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Srinivasan, Vadake R., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Cary, Jeffrey W., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Chon, Younghae, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Narva, Kenneth E., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Ligniinin hajottamisgeeni ja sen käytöt.

Gen för sönderdelning av lignin och dess användning.

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

39873 ATCC

39874 ATCC

Ligniinin hajottamisgeeni ja sen käytöt

Tämä keksintö liittyy ligniinin hajottamiseen. Tarkemmin sanottuna keksintö liittyy menetelmiin, joilla
5 valitaan ja eristetään luonnosta sellaisia mikro-organis-
meja, jotka pystyvät ligniinin hajoitukseen, sellaisen
organismin geenisegmentin kloonamiseen, ja menetelmiin,
joissa käytetään tämän geenisegmentin tuottamaa entsyy-
mituotetta arvokkaiden kemiallisten raaka-aineiden, me-
10 tanolin ja senkaltaisten yhdisteiden tuottamiseen lignii-
nipitoisesta lähtöaineesta.

Ligniini on yleinen fenolinen biopolymeeri, joka vastaa noin neljännestä puun kuiva-aineesta. Ligniinin rakenne on melko monimutkainen ja sen rakenteesta on vas-
15 ta viime vuosina päästy syvemmin selville. Toisin kuin
muilla biopolymeereillä, kuten tärkkelys, selluloosa, proteiinit, nukleiinihapot ja muut sellaiset, ei ligniini-
nillä ole toistuvia rakenneyksiköitä eikä sen kemialli-
sia sidoksia ole kovin helppo hydrolysoida. Eetterisidok-
20 set, jotka antavat mahdollisuudet monenlaisiin sidok-
siin aromaattisiin ryhmiin, ovat usein vallitsevia. Osa
tyypillisestä rakenteesta on esitetty kuviossa 1.

Ligniini syntetisoidaan ei-entsymaattisesti yhdistämällä kolmenlaisia fenyylipropaniyyksiköitä (kuma-
25 ryylialkoholi, koniferyylialkoholi ja sinapyylialkoholi)
dilignoleiksi, trilignoleiksi ja oligonoleiksi, jotka
edelleen jatkavat yhdistymistä sattumanvaraisesti keske-
nään ja muiden monomeeriyyksiköiden kanssa. Ligniinituote
on kopolykondensaatti, joka ei ole vesiliukoinen ja jon-
30 ka molekyylipaino on kymmeniä tuhansia.

Vaikkakin ligniini yleisesti pystyy vastustamaan mikrobien hyökkäyksiä, on sen osoitettu hajoavan joiden-
kin lahotussienten toimesta, erityisesti ns. valkolahot-
tajat ovat tästä tunnettuja. Yksi erityisesti tutkittu
35 sienilaji on Phanerochaete chrysosporium (katso esimer-

kiksi: D. Ulmer et al., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:153-157 (1983) ja M. Leisola, et al. Arch. of Microbiol 137: 171-175 (1984)). Lisäksi eräiden *Streptomyces* spp. ryhmään kuuluvien kantojen on osoitettu hajottavan ligniiniä (T. Pettey et al., Appl. Environ. Microbiol. 47 (2): 439-440 (1984)) samoin kuin alustavasti *Arthrobacter* sukuun luokiteltujen bakteerien, jotka oli eristetty hajoavista maapähkinänkuorista (T. Kerr et al. Appl. Environ. Microbiol. 46 (5): 1201-1206 (1983)).

10 Viime aikoina ¹³CNMR tekniikka on antanut mahdollisuudet selvittää valkolahottajien ligniinin hajotusmekanismia (M. Chua et al. Holzforschung 36:165-172 (1982)). Näiden tutkimusten perusteella näyttää siltä, että polymeeriin integroidut aromaattiset ytimet lohkeavat sieltä
15 ensin oksidatiivisesti, jonka jälkeen aromaattiset osat edelleen hajoavat alifaattisiksi rakenteiksi.

On toivottavaa identifioida uusia ligniiniä hajottavia mikrobikantoja käytettäväksi selluloosatuotteiden valmistukseen lignoselluloosasta "biologisen kuiduttamisen"
20 avulla, kuten on kuvattu US-patenttijulkaisussa 3 962 033, ligniinijätteiden, kuten Kraft-menetelmällä valmistetun selluloosan valkaisulaitoksen effluentin (Kirk, T. et al. Biotechnol. Lett. 1: 347-352 (1979)) käsittelyn tai ruoan tai polttoaineen tuotantoon (Lindenfelser, L. et al. Dev.
25 Ind. Microbiol. 20:541-551 (1979)). Myös ligniiniä osittain hajottavien organismien eristäminen on toivottavaa arvokkaiden kemiallisten raaka-aineiden lähteeksi hienokemikaalien valmistukseen.

Tämän keksinnön mukaan voidaan tuottaa biologisesti puhdas ligniiniä hajottava *Erwinia* sukuun kuuluva mikro-organismiviljelmä, jolla on ATCC 39873:n tunnistamiseen käytetyt ominaisuudet.
30

Yksi keksinnön suoritusmuoto koskee menetelmää, jolla voidaan eristää ligniiniä hajottavat mikro-organismit näytteestä, jossa on sekä ligniiniä hajottavia että ei-hajottavia mikro-organismeja, seuraavasti:
35

Näyte rikastetaan ligniiniä hajottavilla mikro-organismeilla inkuboimalla näytettä rikastusväliaineessa, joka sisältää metanolia ja jonka pH on emäksinen:

rikastettua näytettä inkuboidaan selektiivisessä
5 väliaineessa, jossa on hiivauuteligniiniä hiilenlähteenä emäksisessä pH:ssa;

ligniiniä hajottava mikro-organismi eristetään ottamalla talteen pesäkkeitä muodostavat mikro-organismit kiinteältä alustalta.

10 Vielä yhden tämän keksinnön suoritusmuodon mukaan voidaan tuottaa DNA-segmentti, joka koodaa aryylieetteraasiproteiinia, ja joka segmentti on niin suunnattu mainitussa vektorissa, että se ekspressoituu tuottaen ei-natiivia aryylieetteraasiproteiinia.

15 Vielä yhden tämän keksinnön suoritusmuodon mukaan voidaan tuottaa isäntäorganismi, joka on transformoitu vektorilla, joka sisältää DNA-segmentin, joka koodaa aryylieetteraasiproteiinia.

20 Yksi tämän keksinnön suoritusmuoto koskee ligniinin hajotusprosessia, jonka mukaan hajotettava ligniininäyte saatetaan kosketukseen ligniinin hajoitukseen sopivissa oloissa, isäntäorganismin kanssa, joka on transformoitu vektorilla, joka sisältää DNA-segmentin, joka koodaa aryylieetteraasiproteiinia, segmentin ollessa niin orientoitunut mainitussa vektorissa, että se
25 ekspressoituu tuottaen mainittua aryylieetteraasia.

Yksi tämän keksinnön suoritusmuoto koskee prosessia, jonka mukaan voidaan tuottaa metanolia ligniinistä viljelemällä isäntäorganismia, joka on transformoitu vektorilla, joka koostuu DNA-segmentistä, joka koodaa
30 aryylieetteraasiproteiinia mainitun segmentin ollessa niin orientoituneena mainitussa vektorissa, että mainittu segmentti ekspressoituu tuottaen aryylieetteraasiproteiinia, metanolin tuotantoon sopivissa olosuhteissa.

Tämän keksinnön viimeinen suoritustapa koskee prosessia kemiallisten raaka-aineiden tuottamiseksi ligniinistä viljelemällä isäntäorganismia, joka on transformoitu vektorilla, joka koostuu DNA-segmentistä, joka koodaa aryylietteraasiproteiinia mainitun segmentin ollessa orientoituneena mainitussa vektorissa siten, että se ekspressoituu tuottaen mainittua aryylietteraasia kemiallisen raaka-aineen tuotanto-olosuhteissa.

Tarkka kuvaus piirustuksista:

Kuviossa 1 on esitetty selitysosassa mainittujen yhdisteiden molekyyliarakenteet.

Kuvio 2a kuvaa plasmidi pNCl:n restriktiokarttaa.

Kuvio 2b esittää Erwinian genomisen DNA:n hybridisaatiota ^{32}P :llä merkityn pNCl:stä peräisin olevan DNA-koettimeen kanssa. Kaista 1, pNCL 810 emäsparin Bam HI fragmentti (0.1 ug); kaistat 2-6, Erwinian DNA, joka on hajotettu Bam HI:lla + Hind III:lla, EcoRI:lla, Sal I:lla, Hind III:lla, Pst. I:lla.

Kuvio 3 osoittaa kloonatun aryylietteraasin aktiivisuutta Kraft-menetelmän lingiiniin analysoituna ohutkerroskromatografialla. Kaista 1, E. Coli Cs412 (kontrolli); kaista 2, Cs412 pNCl:llä transformoituna; kaista 3, Cs412 pNC2:lla transformoituna; kaista 4, Kraft-menetelmän ligniinistandardi.

Kuvio 4 osoittaa ligniinin metaboliittien erottamisen 2, 4, 8, ja 20 tunnin inkubaation jälkeen eristetyllä bakteerilla, ohutkerroskromatografisesti. Liuotin: Bentseeni, 2-propanoli, NH_4OH (4:1:1). L=ligniini, C=kontrolli (soluja inkuboitu 20 tuntia), L.st. (20)=ligniiniä inkuboitu keitettyjen solujen kanssa 20 tuntia, L.st=ligniinistandardi. Tuotteet todettiin lyhytaaltoisen ultraviolettin avulla (UVS.12, Ultraviolet Products INC.).

Ligniinillä on suuri potentiaali uudistuvana luonnonvarana kemiallisten raaka-aineiden tuotannossa; mutta, se on suhteellisen resistentti mikrobiologiselle

hajotukselle. Ligniini edustaa myös pääkomponenttia kuitu- ja paperiteollisuuden käytetyssä sulfiittiliuoksessa ja Kraft-menetelmän mustalipeässä. Ligniinin biohajotukseen liittyvät tutkimukset ovat ekonomis-ekologisesti
 5 tärkeitä tämän ilmeisen hankalan heteropolymeerin tehokkaiden hajotusprosessien kehittämisessä.

Kuvio 2b esittää Erwinian genomisen DNAn hybridisaatiota ³²P:llä merkityn pNCl:stä peräisin olevan koe-
 tin-DNAn kanssa. Viitaten kuvioon 2b kaistaan 1, pNCl:n
 10 810 emäsparin Bam HI fragmentti (0.1 g); kaistoihin 2-6, Erwinia DNA, joka on hajotettu Bam HI:lla + Hind III:lla, EcoRI:lla, Sal I:lla, Hind III:lla, Pst I:lla.

Kuten aikaisemmin mainittiin, joukon erilaisia mikro-organismeja on osoitettu hajottavan ligniiniä ja
 15 sen sukusia malliyhdisteitä. Hiljattain Kirk ja Tien (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 2280-84 (1984)) eristivät ja puhdistivat valkolahottajasienilajista Phanerochaete chrysosporium-entsyymien, joka pystyy depolymeroimaan ligniiniä.

Tämä keksintö sisältää menetelmän ligniiniä hajottavien mikro-organismien eristämiseksi ja menetelmän geenin, joka koodaa entsyymiä, joka pystyy rikkomaan aryyli-
 20 eetterisidokset, kloonamiseksi E. Colin plasmidin pBR322. Kloonattu aryylieetteraasi hajottaa Kraft-menetelmän mustalipeän ligniiniä samoin kuin useita ligniinin malliyhdisteitä.

Yksi tämän keksinnön suoritusmuoto koskee menetelmää, jolla voidaan valita ligniiniä hajottavat mikro-organismit. Historiallisesti on käytetty kahta perusmenetelmää haluttujen mikrobivarianttien talteenottamiseksi,
 30 nimittäin skriinausta ja selektiota.

Skriinaussysteemissä kaikki kannat kasvavat lukuunottamatta niitä, jotka kuolevat heti, kuten kävisi esimerkiksi mutageenikäsittelyssä; täten jokainen isolaatti täytyy tutkia erikseen haluttujen ominaisuuksien
 35 toteamiseksi. Koska kymmeniä miljoonia isolaatteja pi-

tää tutkia, tämä menetelmä saattaa olla hyvin työläs. Tämä pitää erityisesti paikkansa silloin kun haluttu ominaisuus on solunsisäinen. Tällaisessa tilanteessa, koska solut täytyy rikkoa halutun ominaisuuden tutkimiseksi, on viljelmistä ylläpidettävä varaviljelmiä ja näin viljelmien lukumäärä välttämättä nousee ainakin kaksinkertaiseksi.

Selektiosysteemissä valitaan koeolosuhteet siten, että niiden harvojen kantojen, joilla on haluttu ominaisuus, sekä muiden kantojen, joilla sitä ei ole, välille kehittyy kasvuero. Tietyissä tapauksissa valittu kanta ei kasva koeolosuhteissa, kun taas ei-valitut kannat kasvavat. Tällöin poistamalla kasvavat kannat joko suodattamalla tai jollain muulla tavalla tutkittavan jäljelle jäävän solupopulaation koko dramaattisesti pienenee. Vaihtoehtoisesti olosuhteet voidaan järjestää sellaisiksi, että valittu kanta kasvaa, kun taas ei-valittujen kantojen kasvu on inhiboitu, ja näin taas tutkittava populaatio tehokkaasti pienenee ja rikastuu kiinnostuksen kohteena olevalla variantilla. On aivan ilmeistä, että hyödyllinen valintasysteemi perustuu valinta-agentin ja eristettävän mikro-organismin luonteen välisen suhteen ymmärtämiseen. Tämän keksinnön rikastamissysteemi perustuu siihen toteamukseen, että metanoli on todennäköinen ligniinimetabolian hajotustuote ja siten mikrobit, jotka pystyvät hajottamaan ligniiniä, todennäköisesti kestävät metanolia. Edelleen ligniiniä hajottavien mikro-organismin kykyä käyttää ligniiniä hiilen lähteenä voidaan käyttää tässä sovelletun valintasysteemin rationaalina pohjana.

Vaikka, kuten edellä on tarkoin kuvattu, valintasysteemiä käytettiin ligniiniä hajottavien mikro-organismin eristämiseksi luonnosta, tätä menetelmää voidaan käyttää valinnassa riippumatta varianttikannan lähteestä. Valittava kanta saattaa olla luonnossa esiintyvä, indu-

soitu mutantti, tai seksuaalisen, aseksuaalisen tai geeniteknologisen prosessin tuottama rekombinantti. Tässä kuvatus valintamenetelmän erityisenä etuna on se, että sen avulla tutkija saattaa erottaa halutun kannan niistä kannoista, jotka eivät hajota ligniiniä, mutta joista haluttu kanta kehittyi.

Erityisen hyödyllinen ligniiniä hajottava bakteeri, joka on alustavasti luokiteltu *Erwinia* sp.:ksi eristettiin jätevedestä.

Näytettä rikastettiin aluksi potentiaalisilla ligniinin hajottajilla viljelemällä sitä väliaineessa, jossa oli 0.2% - 5% v/v metanolia, edullisen konsentraation ollessa 1%. Koska monien ligniiniä hajottavien kantojen on osoitettu olevan emäshakuisia, pidetään rikastuksen suorittamista emäksisessä pH:ssa parempana; noin pH 9 on havaittu hyödylliseksi. 2-3 päivän rikastuksen, joka suoritettiin 30-37°C:ssa yksiprosenttisessa metanolissa, jälleen näyte altistettiin valintaprosessille, jossa rikastettua näytettä viljeltiin 2-3 päivää väliaineessa, joka koostui minimisuoloista (kuten on kuvannut R. Summers et al. (Appl. Environ. Microbiol. 38:(1) 66-71 (1979)), hiivaekstraktista ja Kraft-menetelmän ligniinistä pH:ssa 9,0. Glukoosialustalta toiselle suoritettun siirtosarjan jälkeen otettiin talteen prototrofi, joka pystyi kasvamaan käyttämällä ligniiniä ainoana hiilenlähteenään. Kuten on jo aiemmin mainittu, yksi tällainen isolaatti on alustavasti luokiteltu *Erwinia* sp.:ksi. Tämän isolaatin ja ligniinin inkubaation tuloksena saadut metaboliatuotteet erotettiin kerroskromatografialla (kuvio 4). Näyte tästä viljelmästä on tallennettu American Type Culture kokoelmaan ja sille on annettu talletusnumero 39873.

Aryylieetteraasin karakterisointi

Organismin kyky kasvaa metanolin läsnäollessa ja käyttää ligniiniä hiilen lähteenä viittasi siihen, että ligniinin hajotuksesta ehkä vastaavat aromaattiset eetteraasit. p-nitrofenyyli- β -D-glykopyranosidia (PNPG, kuvio 1), jossa on pseudoeetterisidos aromaattisen ytimen ja sokeriosan välillä, käytettiin kromageenisena substraattina isolaatin aryylieetteraasiaktiivisuuden analysoimiseksi. Soluviljelmien (tai osittain puhdistetun entsyymin) inkubaatio PNPG:n kanssa aiheutti keltaisen p-nitrofenolin vapautumisen. Koska tämä organismi ei pysty käyttämään sellobioosia tai laktoosia hiilenlähteenään, PNPG:n hajoamisesta vastaava entsyymi ei todennäköisesti ole β -glukosidaasi tai β -galaktosidaasi. Edelleen sekä 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-galakto-

15 sidin (x-gal) ja β -D-glukosididerivaatin (x-glu) lisääminen soluviljelmään aiheuttivat sinisen indolyyliyhdisteen kehittymisen. Nämä tulokset viittaavat siihen, että entsyymin spesifisyys perustuu käytettyjen substraattien aromaattisen komponentin tunnistamiseen.

Entsyymi puhdistettiin osittain sonikoidusta soluvapaista uutteista polyetyleni-imiinikäsittelyllä, ammoniumsulfaattifraktioinnilla ja DEAE-selluloosa-ioninvaihtokromatografialla, millä saavutettiin 33 %:n saanto. Entsyymi on aktiivinen laajalla pH alueella (4,5 - 9,5) optimin ollessa pH 6,0 - 7,0. Lämmön aiheuttamat inakti-

20 vaatiokokeet osoittivat, että entsyymiaktiivisuus hävisi yli 50°C:een lämpötiloissa.

Aryylieetteraasigeenin kloonaus

Aryylieetteraasigeenin kloonaamiseksi Bam HI:lla hajotettu Erwinian DNA liitettiin pBR322:n Bam HI leikkauskohtaan, jonka jälkeen sillä tranformoitiin E. Coli kanta Cs412 (McLaughlin, J.R., et al., Nucleic Acid Res 10: 3905-3919 (1982) Hanahanin kuvaamien menetelmien mukaan (J. Mol. Biol. 166: 447-580 (1983)). Transformantit mal-

30 joitettiin M9 minimialustalle (Maniatis, T. et al. In:

"Molecular Cloning" Cold Spring Harbour Laboratory pp. 68-69 (1982)), johon oli lisätty salisiinia ainoaksi hiilenlähteeksi ja ampisilliinia (40 ug/ml) toiseksi valintayhdisteeksi. Erwinia-isolaatti pystyi, mutta

5 E. Coli-isäntäkanta Cs412 ei pystynyt kasvamaan salisiinilla (kuvio 1), joka sisältää pseudoeetterisidoksen glukoosin ja aromaattisen ytimen välillä. Saaduista useista sadoista transformaateista 30 tutkittiin asyyliet-

10 teraasin aktiivisuuden suhteen käyttämällä PNPG:tä kromogeenisena substraattina. Tämän tuloksena saatiin kolme isolaattia, joilla oli kyky vapauttaa keltaista p-nitrofenolia PNPG:stä. 2 isolaatin (pNC1 ja pNC2) rekombinaatioplasmidit pystyivät siirtämään salisiininkäyttö-

15 kyvyn E. Colin kantaan Cs412 seuranneissa transformatiokokeissa.

Bam HI-hajotuksen avulla osoitettiin plasmidi pNC1:n sisältävän B10 emäsparin kokoisen DNA insertin. Kartoit-

20 tus muilla restriktioendonukleaasientsyymeillä on esitetty kuviossa 2a. Insertti sisältää yhden restriktio-

25 kohdan Sal I:lle, Pst I:lle ja Pvu II:lle, mutta ei yhtään sisäistä leikkauskohtaa EcoRI:lle, Hind II:lle, Ava I:lle tai Cla I:lle. 32 p-Nick-transloitua (Rigby, P. W. J. et al. J. Mol. Biol. 113: 237-251 (1977)) pNC1:ää käytettiin koettimena osoittamaan Erwinian genomisen

30 DNAn ja kloonatun DNAn välinen sekvenssihomologia (Southern, E. M., J. Mol. Biol. 98: 503-517 (1975)).

Genominen DNA (5 ug) eristettiin Saiton ja Mivran menetelmän mukaan (Biochem. Biophys. Acta. 72: 619-269 (1963)), jonka jälkeen se hajotettiin täydellisesti käyttämällä

35 40 U jokaista restriktioendonukleaasia (BRL), ajettiin elektroforeesi 0,8 % agarosigeelillä ja siirrettiin nitroselluloosasuodattimelle. ³²P:llä merkitty pNC1 valmistettiin ja 10⁶ cpm koetinta hybridisoitiin suodattimen kanssa hybridisaatioliuoksessa, joka sisälsi 50 %

formamidia, 4 X SSC:tä, 1 X Denhardtin liuosta, joka si-

sälsi 20 ug/ml sonikoitua, denaturoitua vasikan kateen-
 korvan DNAta inkubaatioajan ollessa 24 tuntia ja lämpöti-
 lan 42°C. Suodatin pestiin sen jälkeen kolme kertaa tun-
 nin kuluessa liuoksella, jossa oli 1 X SSC:tä, 0,1 %
 5 SDS:ä ja sen jälkeen kaksi kertaa tunnin kuluessa
 1 X SSC:llä, 0,1 % SDS ennen röntgenfilmikuvausta. Koska
 geenissä ei ole yhtään sisäistä Hind III leikkauskohtaa,
 hajotettiin Erwinian genominen DNA Hind III:lla ja Bam
 10 HI:llä ennen agarosigeelielektroforeesia saadun signaa-
 lin vahvistamiseksi (kuvio 2b, kaista 3). Yksi Bam HI
 fragmentti, joka liikkuu samalla nopeudella kuin 810 emäs-
 parin fragmentti, joka sisälsi asetyylieetteraasigeenin,
 todettiin tässä kokeessa. Koettimella oli myös homolo-
 giaa yhden Hind III ja Pst I fragmentin ja kahden Sal I
 15 fragmentin kanssa. Aryylieetteraasigeenin restriktiokart-
 taa tutkittaessa nämä tulokset viittaavat siihen, että
 tätä geeniä on yksi kopio Erwinia sp:n kromosomissa.

Kloonatun aryylieetteraasin ekspressio E. Colissa
 Isolaatin kyky hajottaa ligniiniä ja useita mal-
 20 liyhdisteitä osoitettiin ohutkerroskromatografialla (TLC)
 sen jälkeen kun sitä oli inkuboitu kokonaisten solujen
 kanssa. Vanilliinin täydellinen hajoaminen sen initiaa-
 lioksidaation jälkeen vanilliinihapoksi viittaa siihen,
 että Erwinia isolaatti tuottaa useita entsyymejä kuten
 25 hydroksylaasia ja oksygenaasia, jotka ovat osallisina
 aromaattisten renkaiden fissioprosesseissa.

Asyylieetteraasigeenin kloonaminen pBR322:een
 antoi mahdollisuuden sen tutkimiseen muiden rengasfis-
 siota aiheuttavien entsyymien puuttuessa. E. coli
 30 Cs412 ekspressoi aryylieetteraasia ja transformantit
 tuottivat yhden, tunnistamattoman aromaattisen yhdis-
 teen 2 tunnin inkubaation jäleen ligniinin kanssa
 (kuvio 3). E. coli Cs412 soluja tai pNC1:llä tai pNC2:lla
 transformoituja soluja viljeltiin 10 ml:n panosviljel-
 35 mänä, pelleteitiin 12 000 x g nopeudella ja suspendoi-
 tiin uudelleen 1 ml:aan 0,1% Kraft-menetelmän ligniiniä,

joka oli 10 mM MgCl_2 :ssa, 10 mM tris HCl:ssä, pH 7,8.

Inkubaatio suoritettiin 32°C:ssa 2 tunnin ajan. Liuotinsysteemi oli bentseeni, 2-propanoli, HN_4OH (4:1:1). Tuo-

te ja standardi todettiin lyhyt-aaltoisella ultraviolettivalolla. On olemassa mahdollisuus, että tuloksena tuli muitakin ligniinin hajotustuotteita, jotka eivät erottuneet käytetyssä liuotinsysteemissä. Vanilliini ja vanilliinihap-
 5 po demetyloituivat katekoliksi transformoitujen kantojen inkubaation tuloksena. Katekoli tunnistettiin ohutkerros-
 10 kromatografialla vertaamalla sitä standardeihin useissa eri liuotinsysteemeissä. Ohutkerroskromatografia-analyysi myös osoitti, että kloonattu aryylieetteraasi pystyi hajotamaan p-fenoksifenolia, syringaldehydiä ja syringiinihappoa (kuvio 1). p-fenoksifenolin hajottamistuote tunnistettiin hydroksikinoniksi ohutkerroskromatografialla.

15 Tuotteen NMR-analyysi osoitti sen olevan p-bentsoguinoni, joka on todennäköisesti hydroksikinonin oksidaation tulos.

Esitetyt tulokset osoittavat, että kloonattu aryylieetteraasi pystyy rikkomaan aryylieetterisidokset samoin
 20 kuin aromaattisten ligniinimalliyhdisteiden metoksyyliryhmät. Entsymologian alalla on tavallista, että entsyymiin viitataan useilla eri nimillä, joista jokainen ilmentää ko. entsyymin tiettyä substraattispesifisyyttä. Käsillä olevassa tapauksessa suositetaan nimeä aryylieetteraasi, mutta entsyymiä voidaan myös kutsua demetylaasiksi, demetoksyylaasiksik aryyli-, alkyylieetterihydrolaasiksi tai diaryylieetteraasiksi, joista jokainen viittaa entsyymin toiminnalliseen ominaisuuteen.

Ligniiniä hajottavan bakteerin, alustavasti luokiteltu Erwiniaksi, biologisesti puhdas viljelmä sekä
 30 plasmidi pNC1, joka sisältää kloonatun aryylieetteraasi-geenin, ja jolla E. coli on transformoitu luovutettiin American Type Culture Collectioniin, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland syyskuun 20., 1984, ja niille on an-
 35 nettu tunnistuskoodit ATCC 39873 ja ATCC 39874 ja vaadi-

tut maksut on suoritettu. Patenttihakemuksen hakemisajan aikana on mainittuihin viljelmiin oikeus niillä henkilöillä, jotka Commissioner kelvollisiksi toteaa seuraavien pykälien mukaisesti 37 C.F.R. §1.14 ja 35 U.S.C. §122.

- 5 Kaikki mainitun viljelmän saantioikeutta koskevat rajoitukset poistuvat pysyvästi tähän hakemukseen perustuvan patenttioikeuden myöntämisen jälkeen ja viljelmät ovat pysyvästi saatavilla mainitun patenttioikeuden ajan; ja jos viljelmät kuolevat tai tuhoutuvat, ne korvataan elävillä viljelmillä, jotka ovat saman taksonomisen kuvauksen mukaisia.
- 10

- Isäntäorganismi, joka on transformoitu vektorilla, joka sisältää ekspressoituvan aryylieetteraasigeenin, on erittäin hyödyllinen aryylieetteraasiproteiinin tuotantoa ajatellen. Toisaalta, transformoitua isäntää sopivissa olosuhteissa voidaan käyttää ligniinin hajotusprosessissa. Edelleen, voidaan aryylieetteraasi eristää isäntästä ja käyttää sitä joko immobilisoituna tai vapaana ligniinin hajotuksen katalyyttinä. Lopuksi, transformoitua isäntää voidaan käyttää metanolin samoin kuin kemiallisten raaka-aineiden tuotannossa.
- 15
- 20

Patenttivaatimukset:

1. Erwinia-sukuun kuuluvan ligniiniä hajottavan mikro-organismin biologisesti puhdas viljelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että sillä on ATCC 39873:n ominaisuuudet.

2. Menetelmä ligniiniä hajottavien mikro-organismien eristämiseksi näytteestä, joka sisältää ligniiniä hajottavia ja ei-hajottavia mikro-organismeja,
10 t u n n e t t u siitä, että

näyte rikastetaan ligniiniä hajottavilla mikro-organismeilla inkuboimalla näytettä rikastusväliaineessa, joka sisältää metanolia ja jonka pH on emäksinen;
15 rikastettu näyte inkuboidaan selektiivisessä väliaineessa, joka sisältää hiivauuteligniiniä hiilenlähteenä emäksisessä pH:ssa;

ligniiniä hajottavat mikro-organismit eristetään poimimalla pesäkkeitä muodostavat mikro-organismit kiinteältä alustalta.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että mainittu pH on noin 9.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että mainitun metanolin konsentraatio on rajoissa 0,2% - 5% v/v.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että mainitun metanolin konsentraatio on 1% v/v.

6. DNA-segmentti, t u n n e t t u siitä, että se koodaa aryylieetteraasiproteiinia tai sen yksittäistä tai useampaa emässubstituutiota, deleetiota, insertiota tai inversiota, jossa mainittu DNA segmentti on saatu ligniiniä hajottavasta mikro-organis-
30 mista, ja joka oikein yhdistettynä leikatun vektorin kanssa pystyy ekspressoimaan ei-natiivia proteiinia, jolla on aryylieetteraasientsyymiaktiivisuutta transformoitaessa isäntä mainitulla vektorilla.
35

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen DNA-segmentti, t u n n e t t u siitä, että mainittu ligniiniä hajottava mikro-organismi kuuluu sukuun Erwinia.

5 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen DNA-segmentti, t u n n e t t u siitä, että mainitulla Erwinialla on ATCC 39873:n mukaiset tuntomerkit.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen DNA-segmentti, t u n n e t t u siitä, että segmentti on noin 810 emäsparia pitkä, ja sen päät ovat Bam HI restriktiokohtia ja
10 jossa mainitussa segmentissä on yksi sisäinen restriktiokohta Sal I:lle, Pst I:lle ja Pvu II:lle.

10. Aryylieetteraasiproteiinia koodaavan DNA-segmentin sisältävä vektori, t u n n e t t u siitä, että segmentti on suunnattu mainitussa vektorissa niin, että
15 se isäntäsolussa ekspressoit ei-natiivia aryylieetteraasi-proteiinia.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että isäntäorganismi on E. coli.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että mainittu vektori on plas-
20 midi.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu plasmidi on pBR322.

14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että mainittu DNA-segmentti on
25 noin 810 emäsparia pitkä, sen päiden ollessa Bam HI restriktiokohtia ja mainitun segmentin sisältäessä sisäiset restriktiokohdat Sal I:lle, Pst I:lle ja Pvu II:lle.

15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että mainittu vektori on pNCl.
30

16. Isäntäorganismi, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu patenttivaatimuksen 10 mukaisella vektorilla.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen isäntä, t u n -
n e t t u siitä, että mainittu isäntä on E. coli.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen isäntä, t u n -
n e t t u siitä, että mainittu E. coli on kanta Cs412.

5 19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen isäntä, t u n -
n e t t u siitä, että mainitulla isäntäväellä on ATCC
39874:n tuntomerkit.

20. Aryylieetteraasin tuotantoprosessi, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 16
10 tai 19 mukaisen isännän viljelyn.

21. Ligniinin hajotusprosessi, t u n n e t t u
siitä, että hajotettava ligniininäyte saatetaan koske-
tukseen ligniinin hajotusolosuhteissa isäntäorganismin
kanssa, joka on transformoitu vektorilla, joka sisältää
15 DNA segmentin, joka koodaa arylieetteraasiproteiinia,
segmentin ollessa suunnattuna mainitussa vektorissa
niin, että se ekspressoituu tuottaen arylieetteraasia.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen prosessi,
t u n n e t t u siitä, että mainittu arylieetteraasi
20 uutetaan mainitusta isännästä ennen kosketusta hajotet-
tavan ligniinin kanssa.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen prosessi,
t u n n e t t u siitä, että mainittu arylieetteraasi
on immobilisoitu.

25 24. Menetelmä metanolin valmistamiseksi lignii-
nistä, t u n n e t t u siitä, että isäntäorganismia
viljellään metanolia muodostavissa olosuhteissa lignii-
nin läsnäollessa isännän ollessa transformoitu vekto-
rilla, joka käsittää DNA-segmentin, joka koodaa aryyli-
eetteraasiproteiinia mainitun segmentin ollessa suunnat-
30 tuna mainitussa vektorissa niin, että mainittu segment-
ti ekspressoituu muodostaen mainittua arylieetteraasia.

25. Menetelmä kemiallisten raaka-aineiden valmis-
tamiseksi ligniinistä, t u n n e t t u siitä, että
35 isäntäorganismia viljellään ligniinin läsnäollessa, isän-

täorganismin ollessa transformoitu vektorilla, joka sisältää DNA-segmentin, joka koodaa aryylieetteraasiproteiinia mainitun segmentin ollessa suunnattuna mainitussa organismissa siten, että se ekspressoituu tuottaen aryylieetteraasia kemiallisten raaka-aineiden muodostusolosuhteissa.

26. Jonkin patenttivaatimuksen 21-25 mukainen prosessi, t u n n e t t u siitä, että mainitulla isännällä on ATCC 39874:n mukaiset tuntomerkit.

Patentkrav:

1. En mikrobiologiskt ren kultur av en lignin-
nedbrytande mikroorganism av släktet Erwinia med identi-
fieringskännetecknan för ATCC 39873.

2. Sätt för isolering av ligninnedbrytande mikro-
organismer ur ett prov innehållande ligninnedbrytande
och icke ligninnedbrytande mikroorganismer innefattande:
berikning av provet för ligninnedbrytande mikroorganis-
mer genom inkubering av provet i ett berikningsmedium in-
nefattande metanol vid alkaliskt pH;
inkubation av det berikade provet i ett selektionsmedium
innefattande jästextraktlignin som kolkälla vid alkaliskt
pH;
isolering av ligninnedbrytande mikroorganismer genom åter-
vinning av de mikroorganismer som har förmåga att bilda
kolonier på ett fast medium.

3. Sättet enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att nämnda pH är ungefär 9.

4. Sättet enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att metanol är närvarande i en koncentration
mellan ungefär 0,2 % till ungefär 5 % volym/volym.

5. Sättet enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att metanol är närvarande i en koncentration
av ungefär 1 % volym/volym.

6. Ett DNA-segment som kodar för ett aryleteraspro-
tein eller dess singel- eller multippelbassubstitutioner,
deletioner, insertioner eller inversioner, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att nämnda DNA-segment härletts från
en ligninnedbrytande mikroorganism och har förmåga att,
när den korrekt kombineras med en spjälkande vektor, ut-
trycka ett icke-nativt protein med aryleterasenzymaktivi-
tet vid transformation av en värd genom nämnda vektor.

7. DNA-segmentet enligt patentkravet 6, k ä n n e -

t e c k n a t av, att den ligninbrytande mikroorganismen är en medlem av släktet Erwinia.

8. DNA-segmentet enligt patentkravet 7, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att Erwinia har identifieringskän-
5 netecknen för ATCC 39873.

9. DNA-segmentet enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att nämnda segment är ungefär 810
baspar långt, att termini av nämnda segment är Bam HI-res-
triktionssiten och att nämnda segment innefattar enkla
10 interna restriktionssiten för Sal I, Pst I och Pvu II.

10. En vektor innefattande ett DNA-segment som ko-
dar för ett arylerasprotein, varvid segmentet oriente-
ras inom nämnda vektor så att i en värd nämnda segment ut-
trycks att producera ett icke-nativt arylerasprotein.

11. Vektorn enligt patentkravet 10, k ä n n e -
15 t e c k n a d därav, att nämnda värd är E. coli.

12. Vektorn enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att nämnda vektor är en plasmid.

13. Vektorn enligt patentkravet 12, k ä n n e -
20 t e c k n a d därav, att nämnda plasmid är pBR322.

14. Vektorn enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att nämnda DNA-segment är ungefär
810 baspar långt, att termini av nämnda segment är Bam
Hi-restriktionssiten och att nämnda segment innefattar
25 interna restriktionssiten för Sal I, Pst I och Pvu II.

15. Vektorn enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att nämnda vektor är pNC1.

16. En värdorganism transformerad av vektorn
enligt patentkravet 10.

17. Värden enligt patentkravet 16, k ä n n e -
30 t e c k n a d därav, att nämnda värd är E.coli.

18. Värden enligt patentkravet 17, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att nämnda E.coli-stam är Cs412.

19. Värden enligt patentkravet 18, k ä n n e -
35 t e c k n a d därav, att nämnda värd har identifierings-

kännetecknen för ATCC 39874.

20. Ett förfarande för framställning av aryleteraser vilket innefattar odling av värden enligt patentkravet 16 eller patentkravet 19.

5 21. Ett förfarande för nedbrytning av lignin innefattande kontakt mellan ett prov av ligninet som skall nedbrytas under ligninnedbrytande betingelser med en värdorganism transformerad av en vektor innefattande ett DNA-segment som kodar för ett aryleteraserprotein, varvid segmentet är orienterat inom nämnda vektor så att nämnda segment uttrycks att producera nämnda aryleteraser.

10

22. Förfarande enligt patentkravet 21, k ä n n e - t e c k n a t därav, att nämnda aryleteraser extraheras med nämnda värd innan kontakt med ligninet som skall nedbrytas.

15 23. Förfarande enligt patentkravet 22, k ä n n e - t e c k n a t därav, att nämnda aryleteraser är immobiliserat.

24. Ett förfarande för framställning av metanol från lignin innefattande odling i närvaro av lignin under metanolbildande odlingsbetingelser av en värdorganism transformerad med en vektor innefattande ett DNA-segment som kodar för ett aryleteraserprotein, varvid nämnda segment är orienterat inom nämnda vektor så att nämnda segment uttrycks att producera nämnda aryleteraser.

20

25 25. Ett förfarande för framställning av kemiska basråvaror från lignin innefattande odling i närvaro av lignin av en värdorganism transformerad med en vektor innefattande ett DNA-segment som kodar för ett aryleteraserprotein varvid nämnda segment är orienterat inom nämnda vektor så att nämnda segment uttrycks att producera aryleteraser under kemiska basråvarubildande betingelser.

30

26. Förfarande enligt något av patentkraven 21 till 25, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda värd har identifieringskännetecknen för ATCC 39874.

1
5
10
15
20
25
30
35

pNCl:n restriktiokartta

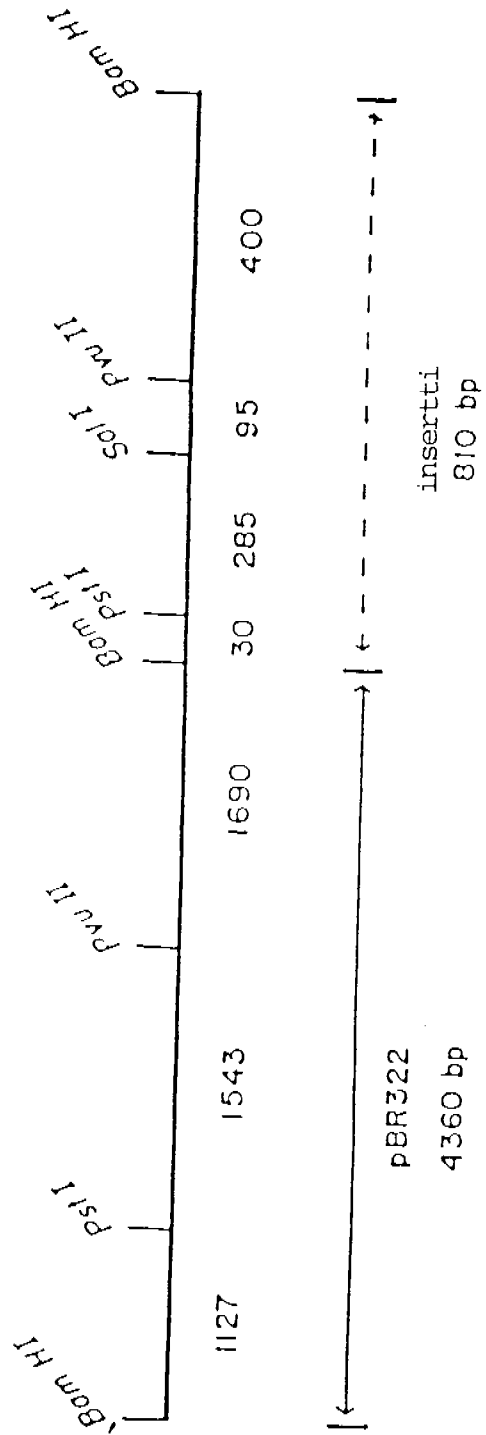


FIG. 2A

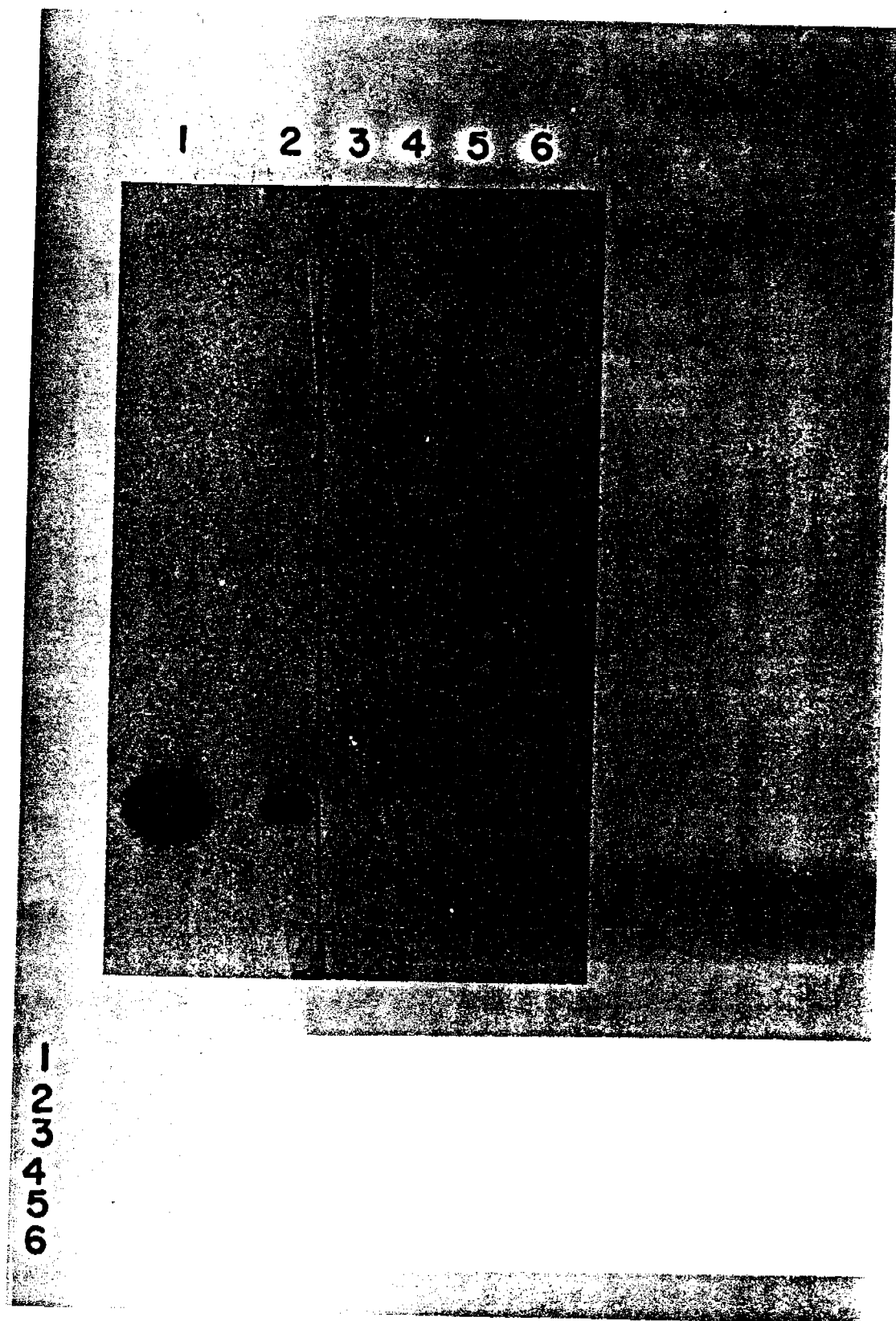


FIG. 2B

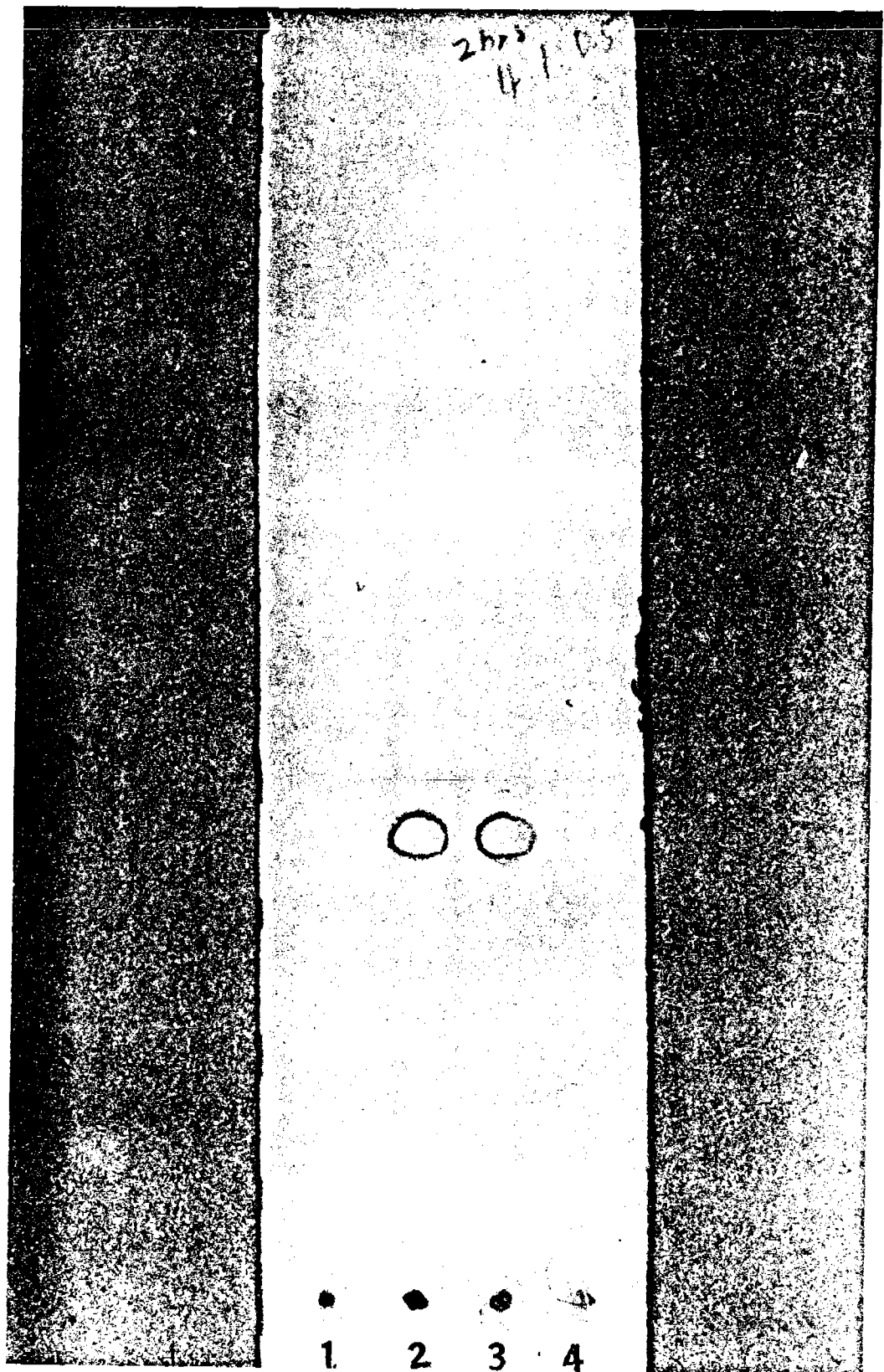


FIG. 3

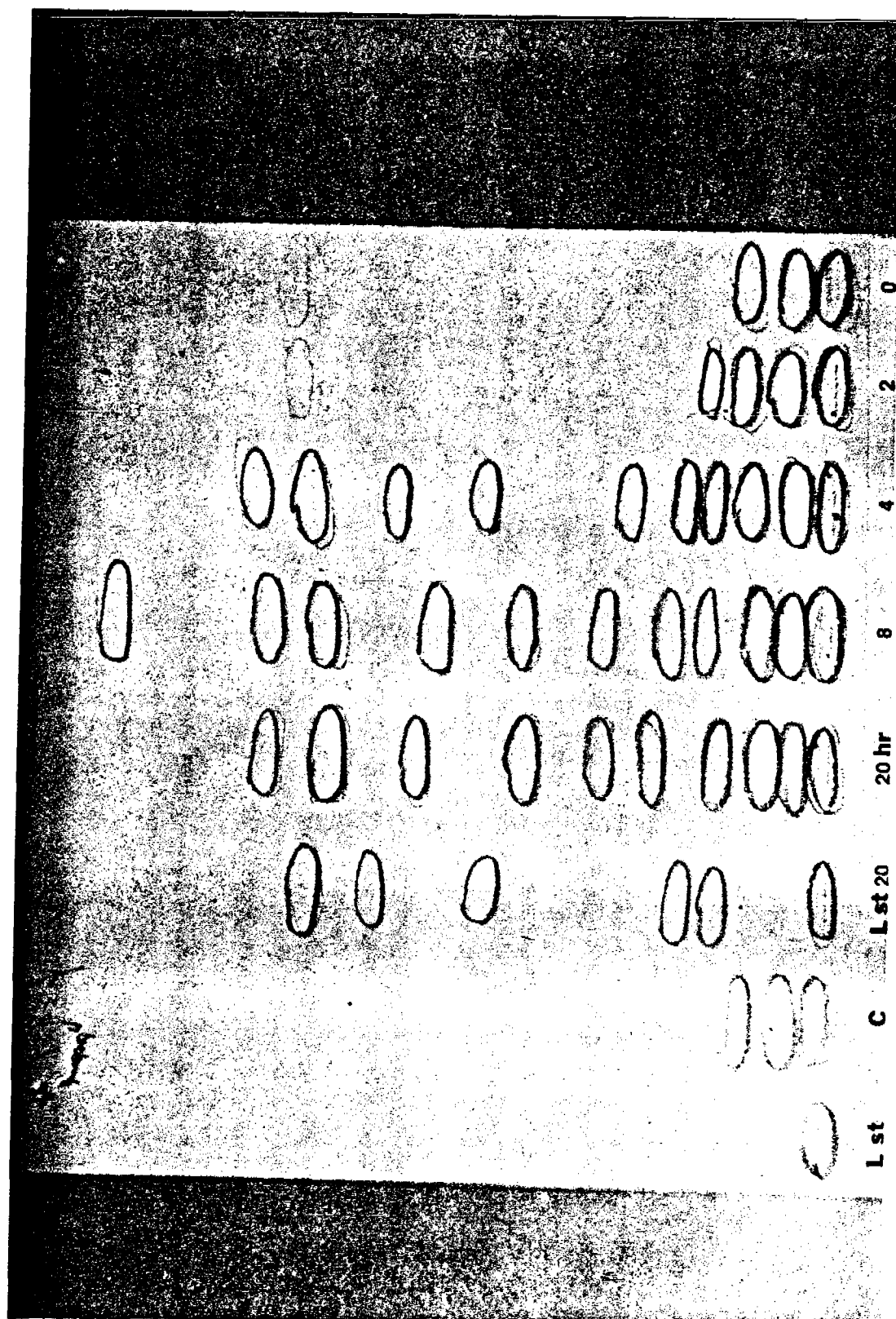


FIG. 4