FI0001106148

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 110614 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **28.02.2003**

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/55, 15/31, 9/18, 1/15, 1/19, 1/21
C12P 21/00, A23K 1/165, D21C 5/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **921122**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **16.03.1992**

(24) Alkupäivä - Löpdag **16.03.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **19.09.1992**

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

18.03.1991 EP 91200579 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •DSM N.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •de Graaff,Leendert Hendrik, Cornelis Koningstraat 8, 6862 CK Oosterbeek, ALANKOMAAT, (NL)
2 •Visser,Jacob, Hinkeloordseweg 5, 6703 CJ Wageningen, ALANKOMAAT, (NL)
3 •van den Broeck,Henriette Catharina, Anna van Burenlaan 48, 6713 NK Ede, ALANKOMAAT, (NL)
4 •Strozyk,Francois, 47 Rue Emile Basly, 62790 Leforest, RANSKA, (FR)
5 •Kormelink,Felix J.M., Dorpsstraat 12 a, 6721 JK Bennekom, ALANKOMAAT, (NL)
6 •Boonman,Johannes Cornelis Petrus, Neptunusstraat 17, 2024 GM Harlem, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab
Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Sieniperäisten asetyyliksylaaniesteraasien kloonaus, ekspressio ja käyttö
Kloning, uttryckning och användning av acetylxylanesteraser av svampursprung

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 157.91 CBS 323.90 CBS

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Biotechnology and Applied Biochemistry vol. 13, Applied Microbiology and Biotechnology vol. 33, (1990) p. 506-510,
Canadian Journal of microbiology vol. 34, (1988), p. 767-772

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmiä ja DNA-rakenteita sienten asetyyliksylaaniesteraasigeenin ekspressoimiseksi mikrobi-isännissä. Tuotetaan puhdistettu sienten asetyyli-ksylaaniesteraasi, joka soveltuu käytettäväksi apuentsyyminä asetyloitujen ksylaanien pilkkomisessa.

Uppfinningen avser förfaranden och DNA-konstruktioner för att uttrycka en acetylxylanesterasgen av svamp i mikrobvärdar. Man producerar ett renat svampacetylxylanesteras, som lämpar sig för att användas såsom ett hjälpenzym vid nedbrytning av acetylerade xylaner.

Sieniperäisten asetyyliksylaaniesteraasien kloonaus, ekspressio ja käyttö

Tekniikan tausta

Tämä keksintö koskee molekyylibiologian alaa. Erityisesti keksintö koskee sienten asetyyliksylaaniesteraasia koodaavan DNA-sekvenssin kloonausta ja ekspressiota. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön rekombinantti-asetyyliksylaaniesteraasin, joka on saatu tätä proteiinia koodaavan kloonatun DNA-sekvenssin ekspressiolla. Näin saatua proteiinia käytetään rehuissa tai paperimassassa olevan ksylaanin hajotukseen.

Keksinnön tausta

Kasvisolukoiden soluseinien jäykän rakenteen saavat aikaan ksylaanit yhdessä muiden hemiselluloosien, pektiinien, selluloosan ja ligniinin kanssa. Ksylaanit muodostavat pääasiallisen hemiselluloosan, useimmat ksylaanit ovat heteropolysakkarideja, joilla on 1,4-sidottujen β-D-ksylopyranoosiyksiköiden muodostama homopolymeerinen pääketju. Kasvin alkuperä määrää spesifisen ksylaanin substituutioiden märän ja tyypin. Ksylaanien on havaittu sisältävän monia erilaisia sivuketjuja, joista L-arabinoosi, D-glukuronihappo tai sen 4-O-metyylieetteri ja etikka-, p-kumariini- ja koniferyylihapot ovat tunnetuimmat.

On oletettu, että sekä asetyyli että arabinosyylisubstituentit lisäävät hemiselluloosan liukoisuutta vähentämällä molekyylien välisten aggregaatioiden mahdollisuutta, nämä substituentit ovat kuitenkin samanaikaisesti vaikea este kasvisolukoiden entsymaattiselle hajotukselle. On esimerkiksi esitetty, että asetylointi inhiboi kasvien polysakkaridien pilkkoutuvuutta märehtijöissä. Poutanen ja Puls (1989) (kirjassa Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers (Lewis, N. ja Paice, M., toim.) ACS Symp. Ser. 399: 630 - 640), ovat osoittaneet, että Trichoderma reesein tärkein ksylanaasi ei kykene depolymerisoimaan asetyloitua liukoista ksylaania. Grohmann et

al. (1989) (Appl. Biochem. Biotechnol. 20/21: 45 - 61) ovat osoittaneet, että kemiallisen deasetylaation jälkeen ksylaani on 5 - 7 kertaa pilkkoutuvampi märehtijöissä.

Esteraasit (EC 3.1.1.6) luokitellaan niiden substraattispesifisyyden mukaan. Koska yleensä on vaikeaa määrittää näiden entsyymien luonnollista substraattia, luokitus on ongelmallinen, ja tätä ongelmaa suurentaa se, että esteraaseja esiintyy luonnossa laajalti. Tämän vuoksi ei ole yllättävää, että vaikka ksylaania deasetyloivien entsyymien olemassaolo on saattanut olla ennustettavaa, ottaen huomioon, että erilaisilla synteettisillä substraateilla toimivien mikrobiesteraasien esiintyminen on ollut kauan tunnettua, vasta vähän aikaa sitten osoitettiin asetyyliksylaaniesteraasien olemassaolo.

Biely et al. (1985, FEBS Lett. 186: 80 - 84) osoitti asetyyliksylaaniesteraasien olemassaolon (sienten) sellulolyyttisissä ja hemisellulolyyttisissä järjestelmissä: Trichoderma reesei, Aspergillus niger, Schizophyllum commune ja Aureobasidium pullulans. Verrattuna kasvien ja eläinten esteraaseihin, nämä sieniesteraasit osoittavat korkeaa spesifistä aktiivisuutta asetyloitua glukuronoksylaania kohtaan, ja ne nimettiin sen vuoksi asetyyliksylaaniesteraaseiksi.

Jatkotutkimuksia sienten asetyyliesteraaseista on esitetty. Poutanen et al. (1988, Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 419 - 425 ja 1990, Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 506 - 510) kuvasivat T. reesein asetyyliksylaaniesteraasien puhdistuksen ja karakterisoinnin. Ksylaanin entsymaattinen deasetylaatio käyttäen puhdistettua asetyyliksylaaniesteraasia, johti jäljelle jäävän polymeerirakenteen saostumiseen. Tämän vaikutuksen vuoksi asetyyliesteraasia ei käytetä yksin ensimmäisenä entsyyminä asetyloitujen ksylaanien hajotuksessa. Suurin ksyloosisaanto asetyloidusta ksylaanista saatiin ksylanaasin, β-

ksylosidaasin ja asetyyliksylaaniesteraasin synergistisellä toiminnalla.

Jotta saavutettaisiin käytännössä hyödynnettävä ksylaanien pilkkoutuminen, on olemassa tarve suurille määrille entsyymejä, jotka osallistuvat näiden voimakkaasti substituoitujen molekyylien entsymaattiseen hydrolyysiin. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön tavan saada suuria määriä sienten asetyyliksylaaniesteraaseja, haluttaessa puhtaassa muodossa.

Yhteenveto keksinnöstä

Tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota käyttöön sienialkuperää olevia puhdistettuja ja eristettyjä asetyyliksylaaniesteraaseja. Tämä proteiini on sienten asetyyliksylaaniesteraasia koodaavan geenin ekspression tuote.

Tämä keksintö tarjoaa edelleen käyttöön rakenteet asetyyliksylaaniesteraasia koodaavan sekvenssin mikrobeissa tapahtuvaa ekspressiota varten, käyttäen joko sen luontaisia säätelysekvenssejä tai vaihtoehtoisessa suoritusmuodossa käyttäen geeniä, joka on toiminnallisesti liitetty säätelyalueisiin, kuten promoottori, erityksen johtosekvenssi ja lopetussignaalit, jotka on valittu halutun ekspressioisännän mukaan.

Edelleen tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota käyttöön ekspressioisännät, jotka on transformoitu tämän keksinnön mukaisilla ekspressiorakenteilla, niin että isännät kykenevät sienialkuperää olevien asetyyliksylaaniesteraasien yliekspressioon ja, jos halutaan, niiden eritykseen.

Vielä edelleen tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota käyttöön menetelmät suurten määrien asetyyliksylaaniesteraasia tuottamiseksi.

Tämä keksintö tarjoaa vielä käyttöön menetelmän rehun sulavuuden lisäämiseksi siten, että menetelmässä lisätään rehuun tehokas määrä asetyyliksylaaniesteraasia. Tämä keksintö tarjoaa myöskin käyttöön menetelmän vähentää ksylaania sisältävien koostumusten viskositeettia siten, että lisätään tehokas määrä asetyyliksylaaniesteraasia.

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön edelleen menetelmän ligniinin vapauttamiseksi sulfaattimassasta paperituotteiden valmistuksessa.

Lyhyt esitys kuvien sisällöstä

Kuva 1 esittää restriktiokartan 3,4 ke:n Sst1 DNA-fragmentista, joka sisältää Aspergillus nigerin axeA-geenin.

Kuva 2 esittää etikkahapon (HAc) ja ksyloosioligomeerien (X_1, X_2, X_3 ja X_4) vapautumisen 0,2-prosenttisesta (w/v) höyrytetystä koivun puun ksylaaniliuoksesta asetyylieste-raasin (1 μg/ml) ja endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:n (0,1 μg/ml) yhdistetyn toiminnan seurauksena.

Yksityiskohtainen kuvaus keksinnöstä

Rihmasienet tunnetaan laajalti niiden kapasiteetista erittää suuria määriä erilaisia hydrolyyttisiä entsyymejä, kuten α-amylaaseja, proteaaseja ja glukoamylaaseja, ja erilaisia kasvien soluseiniä hajottavia entsyymejä, kuten sellulaaseja, hemisellulaaseja ja pektinaaseja.

Tämä keksintö kuvaa puhdistetun ja eristetyn DNA-molekyylin, joka käsittää sienialkuperää olevan asetyyliksylaaniesteraasin geenisekvenssin ja sen geneettiset variantit. Geneettiset variantit ovat niitä DNA-sekvenssejä, jotka koodaavat mutanttiasetyyliksylaaniesteraaseja. Tämän keksinnön piiriin kuuluvat myös sienten DNA-sekvenssit, jotka hybridisoituvat tässä esitettyjen sekvenssien kanssa ankarissa olosuhteissa, ja jotka ekspressoitaessa tuottavat proteiinia, joka osoittaa esteraasiak-

tiivisuutta. Erityisesti A. nigerin asetyyliksylaaniesteraasigeenin, eristetty yhdessä esimerkeistä, osoitettiin hybridisoituvan T. reesein kromosomaalisen DNA:n kanssa.

Tähän keksintöön kuuluvat myös homologiset tai heterologiset isännät, jotka on transformoitu edellä kuvatut DNA-sekvenssit sisältävillä yhdistelmä-DNA-molekyyleillä. "Homologisella isännällä" tarkoitetaan lajia, josta geeni on saatu. "Heterologiselle isännälle" on ominaista, että se on muu kuin se lähde, josta geeni on saatu. Heterologiset isännät voidaan valita bakteereista, hiivoista tai sienistä. Määritelmiä homologinen ja heterologinen käytetään myös säätelysekvenssien yhteydessä. Tässä tapauksessa "homologinen" tarkoittaa säätelysekvenssejä, jotka ovat luontaisia kloonatulle geenille, ja "heterologinen" säätelysekvenssejä muista geeneistä tai samasta geenistä, joka on saatu eri lajista.

Erityisen kiinnostavia asetyyliksylaaniesteraaseja ovat ne, jotka saadaan seuraaviin sukuihin kuuluvista sienistä: Aspergillus, Trichoderma ja Schizophyllum. Edullisia lajeja ovat Trichoderma reesei, Aspergillus niger ja Schizophyllum commune.

Asetyyliksylaaniesteraasiaktiivisuutta osoittavia sieniä voidaan käyttää proteiinin eristämiseen menetelmillä, jotka ovat alalla hyvin tunnettuja. Esitetyissä esimerkeissä käytetään Aspergillus nigeriä asetyyliksylaaniesteraasin lähteenä.

Asetyyliksylaaniesteraasi tuotetaan viljelemällä Aspergillus-kantaa. Proteiini puhdistetaan tunnetuilla menetelmillä, ja puhdistuksen saanto saatetaan sopivaan aktiivisuusanalyysiin.

Proteiinirakenteen karakterisoinnin ensimmäisessä vaiheessa määritetään osa eristetyn proteiinin aminohap-

posekvenssistä. Kun käytetään N-terminaalisten aminohappojen sekvensointitekniikkoja, tämä voi olla kypsän proteiinin N-terminaalinen osa, mutta tämä voi myös olla N-pää sisäisestä peptidistä, joka on saatu puhdistetun proteiinin pilkkomisen jälkeen spesifisellä proteinaasilla, kuten trypsiini, kymotrypsiini jne. tai kemiallisella reagenssilla, esim. CNBr. Kun käytetään C-pään sekvensointimenetelmiä, on mahdollista määrittää proteiinin tai peptidien C-terminaaliset sekvenssit. Kun tällainen sekvenssi on tunnettu, on mahdollista johtaa tähän sekvenssiin perustuva nukleotidikoetin. Edullisesti tämä koetin on suunniteltu vastaamaan sellaista osaa proteiinista, joka sisältää aminohappoja, joita koodaavat vähän degeneraatiota osoittavat kodonit.

Tällä tavoin saadut koettimet voivat olla leimattuja, ja niitä voidaan käyttää hybridisaatiossa cDNA:sta tai genomisesta kirjastosta saatujen kloonien kanssa. Vektori eristetään klooneista, jotka osoittavat positiivisen hybridisaatiosignaalin, ja insertin nukleotidisekvenssi määritetään. Hybridisaatio ja sekvensointi voidaan toistaa, ellei löydetä täysipituista kloonia. Täysipituisia klooneja voidaan saada myös yhdistämällä osittain päällekkäisiä restriktiofragmentteja, jotka kaikki koodaavat osaa halutusta proteiinisekvenssistä. Saatu DNA-sekvenssi voidaan kloonata sopivissa ekspressiovektoreissa. Jos se on tarkoituksenmukaista, se voi liittyä ekspressioisäntäorganismin valintaan. Tämä kloonaus voidaan myös suorittaa määrittämättä nukleotidisekvenssiä, tällöin luultavasti kuitenkin luodaan ei-optimaalinen rakenne. Edullisia ekspressioisäntiä voivat olla bakteerit, hiivat tai sienet. Erityisesti käytetään Kluyveromycesiä, Bacillusta, Aspergillusta tai E.colia.

Ekspression säätelemiseksi säätelyalueet kloonataan sellaisella tavalla, että geeni on toiminnallisesti liitettynä niihin. Näinä säätelyalueina voidaan käyttää homolo-

gisia ja heterologisia promoottoreita, operaattoreita, tehostajia, signaalisekvenssejä ja ribosomaalisia sitoutumiskohtia. Edelleen geeni voidaan kloonata itsereplikoituvassa vektorissa, tai se voidaan liittää isäntäorganismin genomiin, edullisesti käytetään useampia geenin kopioita.

Saatua geeniä voidaan lopulta puolestaan käyttää koettimena, hybridisoitumaan lähisukuisista lajeista saatujen DNA-kirjastojen kanssa. Erityisesti A. nigerin asetyyliksylaaniesteraasigeenin, joka eristettiin yhdessä esimerkeistä, osoitettiin hybridisoituvan T. reesein kromosomaaliseen DNA:han.

Esimerkeissä kuvataan Aspergillus nigeristä saadun 3,4 ke:n Sst1 DNA-fragmentin kloonaus ja ekspressio. Ekspressio toteutetaan käyttäen täydellistä geeniä A. nigerissä.

Kuten edellä on kuvattu, asetyyliksylaaniesteraasia voidaan käyttää ksylaanin deasetylointiin. Koska havaittiin, että asetyyliksylaaniesteraasin aktiivisuus yksittäisenä entsyyminä voi johtaa saadun polymeerin saostumiseen, on edullisinta käyttää entsyymiä yhdessä muiden ksylaania pilkkovien entsyymien kanssa, kuten ksylanaasien, arabinofuranosidaasien, ksylosidaasien ja glukuronidaasien kanssa, näiden ollessa edullisesti valitut ryhmästä, johon kuuluvat ksylanaasi, α-arabinofuranosidaasi, β-ksylosidaasi ja α-glukuronidaasi. Esimerkissä 5 kuvataan asetyyliksylaaniesteraasin ja β-(1,4)-ksylanaasin ja β-(1,4)-ksylosidaasin yhdistetty vaikutus.

Asetyyliksylaaniesteraaseja voidaan edullisesti käyttää prosesseissa, joissa tulee hajottaa ksylaania. Deasylaatioreaktion seurauksena ksylaani tulee helpommin saavutettavaksi ksylanaaseille.

Spesifisiin asetyyliksylaaniesteraasien sovellutuksiin, tai tämän entsyymin sovellutuksiin yhdessä muiden ksylaania hajottavien entsyymien kanssa kuuluvat;

- eläinten rehun esikäsittely sulavuuden parantamiseksi,
- näiden entsyymien lisääminen rehuun 'käsittelemällä in situ',
- hedelmämehujen ja oluen käsittely, jotta parannetaan reologisia ominaisuuksia ja kirkkautta,
- paperimassan ja (jäte-) paperin prosessointi, jotta parannetaan valkaisu- ja vedenpoistoprosessia.

Yleisesti ottaen tätä entsyymiä, tai tämän entsyymin yhdistelmiä muiden entsyymien kanssa, voidaan käyttää pilkkomaan biologista soluseinämateriaalia, jotta edistetään sulavuutta tai juoksevuusominaisuuksia teollisuuden sovellutuksissa, jotka liittyvät hedelmämehujen tai oluen valmistukseen.

Toinen tärkeä näkökohta, joka koskee asetyyliksylaaniesteraasin käyttöä rehuissa, on sen vaikutus viskositeettiin.

Ksylaanin deasetylaatio vähentää rehun aineosien liukoisuutta, ja siten viskositeetti pienenee. Tämä johtaa käsittelyn helppouden lisääntymiseen, ja pentosaanien pienentyneeseen ravinteisuutta vähentävään vaikutukseen. Tämän mukaisesti tämä keksintö tarjoaa käyttöön eläinten rehukoostumuksia, jotka sisältävät asetyyliksylaaniesteraasia.

Edelleen, ksylaanin saavutettavuus ksylanaaseille lisääntyy. Tämä on tärkeää ligniinin vapauttamisessa paperimassasta. Yleensä sulfaattimassa käsitellään ksylanaaseilla, jotta poistetaan ligniini paperituotteiden valmistuksesta. Ksylaanin korkean asetylaatiotason vuoksi ksylanaasia ei käytetä optimaalisesti. Ksylanaasien tehokkuus lisään-

tyy suuresti, kun massa käsitellään asetyyliksylaanieste-raasilla joko ennen tai samanaikaisesti kuin ksylanaasi-käsittely.

Edellä esitetyn mukaisesti tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän rehun sulavuuden parantamiseksi, jota menetelmää luonnehtii, että tehokas määrä asetyyliksylaanieste-raasia lisätään rehuun. Tämä keksintö tarjoaa myös käyttöön menetelmän ksylaania sisältävien koostumusten viskositeetin vähentämiseksi, jossa menetelmässä lisätään tehokas määrä asetyyliksylaaniesteraasia. Tämä keksintö tarjoaa myös käyttöön menetelmän ligniinin vapauttamiseksi sulfaattimassasta paperituotteiden valmistuksessa.

Seuraavat esimerkit tarjotaan valaisemaan keksintöä, eikä niiden ole tarkoitus rajoittaa tämän keksinnön piiriä millään tavalla.

Kokeellinen osa

Puskurit ja kantaliuokset

Sopivia kantaliuoksia käytettiin esimerkeissä kuvatuissa kokeissa.

Seuraavat kantaliuokset tehtiin Maniatis'in et al. mukaan ('Molecular Cloning' Cold Spring Harbor, 1982 ja 1989, 2. painos);

TE-puskuri, 20 x SSC, hybridisaatiopuskuri, 100 x Denhardtin liuos, SM-puskuri, 50 x TAE-puskuri, DNA:n pipetointipuskuri (ksyleenisyanoli ja bromofenolisini), NCZYM-alusta, LB-alusta. Ligaatiopuskuri valmistettiin, kuten entsyymin tuottaja on esittänyt.

Muut liuokset sisälsivät seuraavat aineosat;

5 x RNB 1000 ml:aa kohti:

121,10 g Tris, 73,04 g NaCl, 95,10 g EGTA, pH 8,5

Visniac-liuos:

10 g EDTA, 4,4 g $ZnSO_4x7H_2O$, 1,0 g $MnCl_2x4H_2O$
0,32 g $CoCl_2x6H_2O$, 0,32 g $CuSO_4x5H_2O$
0,22 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}x4H_2O$, 1,47 g $CaCl_2x2H_2O$
1,0 g $FeSO_4x7H_2O$, pH 4,0
(Visniac ja Santer, 1957, Bact. Rev., 21: 195 - 213)

Minimialusta, 1000 ml:aa kohti:

6,0 g $NaNO_3$, 1,5 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4x7H_2O$
0,5 g KCl, 1 ml Visniac-liuosta
hiilenlähde, kuten esitetty, pH 6,0

Esimerkeissä käytetyt kannat:

E. coli JM101 (Yanisch-Perron et al., 1985, Gene 33: 103)
E. coli LE 392 (Murray, 1977, Mol. Gen. Genet. 150: 53 - 58)
Aspergillus niger N402 (Goosen et al., 1987, Curr. Genet. 11: 499 - 503)
Aspergillus niger N593 (Goosen et al., 1987, supra)

Esimerkeissä käytetyt vektorit:

pUC9 (Vieirra ja Messing, 1982, Gene 19: 259 - 268 ja Yanisch-Perron et al., 1985)
M13mp18/M13mp19 (Messing, J., 1983, IOIC: 10 - 78, Norrander et al., 1983, Gene 26: 101 - 106)

Asetyyliesteraasianalyysi:

Analyysi tehtiin, kuten Biely et al. (1985, supra) ovat kuvanneet. Entsyymiliuos (10 - 50 µl) sekoitettiin 1 ml:n juuri valmistettua kyllästettyä 4-nitrofenyyliasetaattiliuosta (SIGMA) kanssa 0,2 M fosfaattipuskurissa, pH 6,5 ja inkuboitiin 22 °C:ssa. 4-nitrofenolin vapautumista seurattiin fotometrisesti 410 nm:ssa ajan funktiona. Yksi yksikkö asetyyliesteraasaktiivisuutta hydrolysoi 1 µmoolin substraattia minuutissa.

Entsyymit

Endo-(1,4)-β-ksylanaasi I, II, III (E.C. 3.2.1.8) ja β-(1,4)-ksylosidaasi (E.C. 3.2.1.37) puhdistettiin, kuten Kormelink et al. ovat kuvanneet (1990, julkaisussa Proc. 5th European Congress on Biomass and Bioenergy, Lissabon 9 - 13.10.1989) Aspergillus awamorista CMI 142717.

Asetyyliesteraasin ja ksylaania hajottavien entsyymien yhdistetty vaikutus

Etikkahapon ja ksyloosioligomeerien vapautuminen määritettiin HPLC:llä höyrytetyn koivupuun ksylaanin hajotuksen jälkeen asetyyliesteraasin ja endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi II:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi III:n ja β-(1,4)-ksylosidaasin toiminnan jälkeen yksin tai yhdistettynä. 0,2 % (w/v) höyrytettyä koivun ksylaaniliuosta inkuboitiin 1,0 µg/ml asetyyliesteraasin ja 0,1 µg/ml endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi II:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi III:n tai β-(1,4)-ksylosidaasin kanssa 30 °C:ssa. Pilkkoutumista seurattiin ajanjaksolla 0 - 8 tuntia. Reaktio lopetettiin laittamalla näyte 5 minuutiksi kiehuvaan vesihauteeseen.

Höyrytetty koivupuu valmistettiin, kuten Puls et al. (1985, Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 416 - 423) ovat kuvanneet.

HPLC - neutraalit sokerit

Endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:n, II:n, III:n, β-(1,4)-ksylosidaasin ja asetyyliesteraasin vaikututuksella yksin tai yhdessä höyrytetystä koivupuusta vapautetut neutraalit sokerit määritettiin HPLC:llä. Näytteet esikäsiteltiin $Pb(NO_3)_2$:lla Voragenin et al. mukaisesti (1986, Food Hydrocolloids 1: 65 - 70) ja injektoitiin CH-Pb-pylvääseen (Merck, Darmstadt, Saksan Liittotasavalta), eluoitiin millipore-vedellä (0,4 ml/min) 85 °C:ssa. Sokerit määritettiin Shodex SE-61 RI-detektorilla.

Esimerkit

Esimerkki I

A. nigerin asetyyliksylaaniesteraasin AXE I puhdistus

Aspergillus niger-kannan DS16813 kasvatuksen jälkeen viljelmä sentrifugoitiin ja supernatantti konsentroitiin ultrasuodattamalla. 73 ml:n näyte lisättiin DEAE-trisakryyli- (IBF) pylvääseen (XK 50 Pharmacia-pylväs, joka oli täytetty 400 ml:lla DEAE-trisakryyliä ja puskuroitu Tris-HCl:lla 0,05 M, pH 7,8) ja eluoitiin lineaarisella gradientilla 0,0 - 1,0 M NaCl Tris-HCl:ssa 0,05 M, pH 7,8. Fraktiot analysoitiin asetyyliesteraasiaktiivisuuden suhteen, kuten edellä on kuvattu.

Asetyyliesteraasiaktiivisuutta sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lisättiin semipreparatiiviseen DEAE-HPLC-pylvääseen (Waters DEAE 5 PW 21,5 mm x 15 cm), joka oli tasapainotettu fosfaatilla 0,05 M, pH 7,5. Eluutio tehtiin lineaarisella 0,0 - 1,0 M NaCl-gradientilla samassa puskurissa. Lopullinen puhdistus tehtiin analyyttisellä DEAE-HPLC-pylväällä (sama kuin edellä, mutta tässä tapauksessa 7,5 mm x 7,5 cm) tai käyttämällä SDS-PAA-geelielektroforeesia. Saatuja fraktioita käytettiin aminohapposekvensointiin sellaisenaan, tai proteiini pilkottiin ensin sopivalla proteolyyttisellä entsyymillä. Jälkimmäisessä tapauksessa saadut peptidit erotettiin HPLC:llä ennen aminohapposekvensoinnin suorittamista.

Esimerkki 1.2

Asetyyliksylaaniesteraasin N-pään ja sisäisten peptidien aminohapposekvensointi

A. nigerin asetyyliksylaaniesteraasin AXE I N-pään aminohapposekvensointi käyttämällä Applied Biosystems kaasufaasisekvensoijaa, antoi seuraavan sekvenssin:

Ser-Gly-Ser-Leu-Gln-Gln-Val-Thr-Asp-Phe-Gly-Asp-Asn-Pro-Thr-Asn-Val-(Gly)-Met-Tyr-(Ile) (kaava 1)

Asetyyliksylaaniesteraasin AXE I CNBr-peptidien aminohapposekvenssin määritys HPLC:tä käyttäen tehdyn erottelun jälkeen antoi seuraavat sekvenssit:

CNBr-peptidi 1:
Tyr-Ile-Tyr-Val-Pro-Asn-Asn-Leu-Ala-Ser-Asn-Pro-Gly-Ile-Val-Val-Ala-Ile-His-Tyr (kaava 2)

CNBr-peptidi 2:
?-Ser-Gly-Tyr-Ser-Gly-Ser-Phe-Pro-Thr-?-Gln-(Ile)-Tyr-(His/Thr)-(Ser)-Gly-(Ser)-(Ser)-Asp- (kaava 3)

Esimerkki 2

A.nigerin genomisen kirjaston seulonta asetyyliksylaaniesteraasigeenin sunteen (axeA) ja geenin eristys

Esimerkki 2.1

Synteettisten oligonukleotidien ^{32}P-leimaus

Esimerkissä 1.2 esitettyä aminohapposekvenssiä (kaava 1) käytettiin johdettaessa oligonukleotidiseoksia, jotka vastasivat N-terminaalista aminohapposekvenssiä. Oligonukleotidit syntetoitiin fosfoamidiittimenetelmällä, jonka ovat kuvanneet Crea et al. (1979, Tetrahedron Lett. 5: 395 - 398) käyttäen Applied Biosystems oligonukleotidisyntetoijaa.

Käytettiin seuraavaa oligonukleotidiseosta;

GGATTATCIC CAAAATCIGT IACCTGCTG 29 (kaava 4)
G G G G

lopullisessa konsentraatiossa 37 pmol oligonukleotidia per µl.

Tämä oligonukleotidiseos leimattiin reaktioseoksessa, jolla oli seuraava koostumus; 37 pmol oligonukleotidiseosta, 66 mM Tris-HCl:oa pH 7,6, 1 mM ATP:ta, 1 mM spermidiiniä, 10 mM $MgCl_2$, 15 mM ditiotreitolia, 200 µg/ml BSA, 34 pmol τ^{32}-P ATP (NEN, 600 Ci/mMol) ja 30 U T_4-polynukleotidikinaasia (BRL) lopullisessa tilavuudessa 50 µl. Reaktio lopetettiin lisäämällä 4 µl 0,5 M EDTA:a, pH 8,0. Leimattua oligonukleotidiseosta käytettiin ilman puhdistusta edelleen, genomisen kirjaston seulomiseen (esimerkki 2.3) ja Southern-blottingeissa (esimerkit 2.5 ja 2.6).

Esimerkki 2.2

Aspergillus niger-kannan DS16813 (CBS 323.90) genomisen kirjaston rakentaminen

DNA Aspergillus niger-kannasta DS16813 (talletettu talletuslaitokseen Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Alankomaat, 20.7.1990 (CBS 323.90), eristettiin käyttämällä Graaffin et al. menetelmää (1988, Curr. Genet. 13: 315 - 321). Lyhyesti, yli yön kasvatettu rihmasto kerättiin talteen ja varastoitiin -80 °C:seen. Nukleiinihapot eristettiin hajottamalla 0,5 g jäädytettyä rihmastoa mikro-membraanihajottajalla (microdismembrator) (Braun). Rihmastojauhe uutettiin uuttopuskurilla, joka sisälsi:
1 ml tri-isopropyylinaftaleenisulfonihappoa (TNS) (20 mg/ml), 1 ml p-aminosalisyylihappoa (PAS) (120 mg/ml) ja 0,5 ml 5 x RNB-puskuria, ja joka tasapainotettiin 1,5 ml:lla fenolia. Uuttopuskuri lisättiin rihmastojauheeseen ja tehtiin fenoli/kloroformi, kloroformiuutto. DNA eristettiin sen jälkeen etanolisaostuksella. RNA poistettiin liuoksesta käsittelemällä RNaasi A:lla.

DNA, joka oli eristetty Aspergillus nigeristä DS16813, kuten edellä on kuvattu, pilkottiin osittain Sau 3A:lla. Saadut fragmentit kokofraktioitiin elektroforeesilla 0,4-prosenttisessa agaroosissa TAE:ssa. Fragmentit, joiden

koko oli 14 - 22 kb, otettiin talteen geelistä leikkaamalla oikea alue geelistä ja elektroeluoimalla sen jälkeen.

Fragmentit ligatoitiin bakteriofagi lambda EMBL 3:n BamHI-käsivarsiin, hankittu Promegalta, käyttäen tavanomaista menettelyä. Ligatoitu DNA pakattiin in vitro käyttäen Gigapak II Gold -pakkausuutetta (Stratagene), ja maljattiin E. coli-kannalle LE392 käyttäen NZYCM-alustaa toimittajan ohjeiden mukaisesti.

Täten saatu primaarinen kirjasto titrattiin ja amplifioitiin. Tehtiin faagivarasto, joka sisälsi noin 10^{10} pfu/ml.

Esimerkki 2.3

A. nigerin genomisen kirjaston seulonta axeA-geenin suhteen.

A. nigerin genominen kirjasto rakennettiin edellä kuvatulla tavalla. Jotta saadaan axeA-geeni, 3 x 10^3 pfu per malja maljataan NZYCM top-agaroosille, joka sisältää 0,7 % agaroosia, neljälle läpimitaltaan 85 mm NZYCM-maljalle (1,2-prosenttinen agar), kuten on kuvattu (Maniatis et al., 1982, supra, s. 64), käyttäen E. coli-kantaa LE392 maljausbakteerina.

Maljojen yli yön 37 °C:ssa kestäneen inkubaation jälkeen tehtiin kaksi replikaa kustakin maljasta HybondN$^+$-suodattimille (Amersham), kuten Maniatis et al. ovat kuvanneet (1982, supra, s. 320 - 321).

Suodattimien kostutuksen jälkeen 3 x SSC:ssä niitä pestiin 60 minuuttia huoneenlämmössä 65 °C:ssa kaksi tuntia esihybridisaatiopuskurissa, joka sisälsi; 6 x SSC, 0,5 % SDS, 10 x Denhardt'in liuosta ja 100 µg/ml lämpödenaturoitua lohen maidin DNA:ta (Boehringer Mannheim). Kahden tunnin esihybridisaation jälkeen puskuri korvattiin hyb-

ridisaatiopuskurilla, joka on identtinen esihybridisaatiopuskurin kanssa, paitsi että tämä puskuri ei sisällä lohen maidin DNA:ta, vaan ^{32}P-leimattua oligonukleotidiseosta, kaava I, joka on valmistettu kuten esimerkissä 2.1 on kuvattu. Suodattimia hybridisoitiin 18 tuntia lopullisessa lämpötilassa 47 °C, joka saavutettiin hitaasti alkulämpötilasta 65 °C.

Hybridisaation jälkeen suodattimet pestiin 2 x SSC:llä, minkä jälkeen suodattimet pestiin esilämmitetyssä hybridisaatiopuskurissa 47 °C:ssa. Lopulta suodattimia pestiin kahdesti 30 minuutin ajan 56 °C:ssa 6 x SSC:ssä, 0,5-prosenttisessa natriumpyrofosfaatissa. Ilmakuivatut suodattimet teipattiin arkille Whatman 3MM-paperia, avainnosmerkit tehtiin radioaktiivisella musteella ja Whatman-paperi ja suodattimet peitettiin Saran Wrapilla.

Hybridisoituvat plakit tunnistettiin ja nimettiin lambda$_{axc1}$ - lambda$_{axc7}$. Kukin positiivinen plakki poimittiin maljalta Pasteur-pipettiä käyttäen ja faagit eluoitiin agarpalasta 1 ml:aan SM-puskuria, joka sisälsi 20 µl kloroformia, kuten Maniatis et al. (1982, supra, s. 64 ovat kuvanneet). Saadut faagit puhdistettiin toistamalla edellä kuvattu menettely käyttäen suodatinreplikoita maljoilta, jotka sisälsivät 50 - 100 plakkia eristettyjä faageja.

Puhdistuksen jälkeen faageja kasvatettiin maljaamalla 5 x 10^3 faagia NZYCM-alustalle. Inkubaation jälkeen yli yön 37 °C:ssa saatiin maljoja, joilla plakit olivat yhteenkasvaneet; näistä maljoista eluoitiin faagit lisäämällä 5 ml SM-puskuria ja säilyttämällä maljoja 2 tuntia 4 °C:ssa toistuvassa ravistelussa. Supernatantin keräämisen jälkeen pipetillä, bakteerit poistettiin liuoksesta sentrifugoimalla 4 000 x g 10 minuuttia 4 °C:ssa. Supernatanttiin lisättiin 0,3 % kloroformia ja pfu:ien määrä laskettiin. Nämä faagivarastot sisältävät noin 10^{10} pfu/ml.

Esimerkki 2.4

DNA:n eristys bakteriofagi lambdasta.

Kutakin eristetyistä faageista kasvatettiin yhdistämällä $5x10^9$ E. coli-kannan LE392 bakteeria 300 µl:ssa SM-puskuria $2x10^6$ pfu:n kanssa 15 minuutin ajan. Inkubaation jälkeen infektoituja bakteereja käytettiin ymppäämään 100 ml esilämmitettyä (37 °C) NZYCM-alustaa ja inkuboitiin sen jälkeen 9 - 12 tuntia 37 °C:ssa New Brunswick pyöröravistelijassa 250 rpm, minkä ajan jälkeen bakteerit olivat lyysoituneet. Bakteerijäte poistettiin sentrifugoimalla 10 minuuttia 10 krpm 4 °C:ssa Sorvall high speed -sentrifugissa. Faagit saostettiin saadusta supernatantista (100 ml) lisäämällä 10 g polyetyleeniglykoli-6000:tta ja 11,7 g NaCl:ia ja pitämällä liuosta 4 °C:ssa yli yön. Saostuneet faagit kerättiin sentrifugoimalla 14 000 x g 4 °C:ssa 20 minuuttia. Supernatantti poistettiin imulla, ja loput liuoksesta poistettiin paperipyyhkeellä. Faagit suspendoitiin huolellisesti uudelleen 4 ml:aan SM-puskuria ja uutettiin kerran samalla määrällä kloroformia.

Ennen kuin DNA uutettiin faagipartikkeleista, DNA ja RNA, jotka olivat peräisin lyysatuista bakteereista, poistettiin inkuboimalla faagisuspensiota DNaasi I:llä ja RNaasi A:lla (kumpaakin 100 µg/ml) 30 minuutin ajan 37 °C:ssa. Faagi-DNA vapautettiin sen jälkeen faageista lisäämällä EDTA:a lopulliseen konsentraatioon 20 mM, kun taas proteiini poistettiin liuoksesta uuttamalla kahdesti samalla määrällä fenoli/kloroformi/isoamyylialkoholia (25:24:1). Faasien erottelun jälkeen sentrifugoimalla, käyttäen Sorvall-sentrifugia (14 000 x g, 10 min), vesifaasi uutettiin kerran samalla määrällä kloroformia/isoamyylialkoholia (24:1). Faasit erotettiin sentrifugoimalla, minkä jälkeen DNA saostettiin vesifaasista lisäämällä 0,1 tilavuutta 5 M natriumperkloraattia ja 0,1 tilavuutta isopropanolia, ja inkuboimalla jäissä 30 minuuttia. DNA otettiin talteen sentrifugoimalla 10 min 4 °C:ssa (14 000 x

g). Supernatantti poistettiin imulla, minkä jälkeen DNA suspendoitiin uudelleen 400 µl:aan TE-puskuria. DNA saostettiin vielä kerran tästä liuoksesta lisäämällä 0,1 tilavuutta 3 M natriumasetaattia ja 2 tilavuutta etanolia. DNA kerättiin sentrifugoimalla 10 minuuttia 4 °C:ssa (14 000 x g). Supernatantti poistettiin imulla, jäljelle jäänyt pelletti kuivattiin lyhyessä ajassa tyhjiössä, minkä jälkeen DNA suspendoitiin uudelleen 125 µl:aan TE-puskuria, joka sisälsi 0,1 µg/ml RNaasi A:ta. Tämä puhdistusmenettely johti noin 10 - 100 µg:n DNA:ta eristykseen joka faagista.

Esimerkki 2.5

axeA:n sisältävien faagien restriktioanalyysi.

Faagien $lambda_{axe1}$ - $lambda_{axe7}$ eristetty DNA analysoitiin Southern-analyysillä käyttäen seuraavia restriktioentsyymejä; EcoRI, HinDIII, SphI ja HinCII. DNA:ta pilkottiin 3 tuntia 37 °C:ssa reaktioseoksessa, joka koostui seuraavista liuoksista; 5 µl (≈ 1 µg) DNA-liuosta; 2 µl soveltuvaa 10 x reaktiopuskuria (BRL); 10 U restriktioentsyymiä (BRL) ja steriiliä tislattua vettä, jotta saatiin lopullinen tilavuus 20 µl. Pilkkomisen jälkeen DNA saostettiin lisäämällä 0,1 tilavuutta 3 M NaAc ja 2 tilavuutta etanolia. DNA kerättiin sentrifugoimalla 10 min huoneenlämmössä (14 000 x g). Supernatantti poistettiin imulla, jäljelle jäänyt pelletti kuivattiin lyhyesti tyhjiössä ja suspendoitiin uudelleen steriiliin tislattuun veteen. Sen jälkeen kun oli lisätty 4 µl DNA:n pipetointipuskuria, näytteitä inkuboitiin 10 min 65 °C:ssa ja jäähdytettiin nopeasti jäissä ennen näytteiden pipetoimista 0,6-prosenttiseen agaroosigeeliin TAE-puskuriin. DNA-fragmentit erotettiin elektroforeesilla 25 V:lla 15 - 18 tuntia.

Elektroforeesin jälkeen DNA siirrettiin ja denaturoitiin alkalisella tyhjiöblottauksella (VacuGene XL, Pharmacia

LKB) nylonmembraanille (Gene Bind 45, Pharmacia LKB), kuten ohjekirjassa on kuvattu (s. 25 - 26) ja sen jälkeen esihybridisoitiin ja hybridisoitiin käyttäen leimattua oligonukleotidiseosta, kaava 1, kuten esimerkissä 2.1 on kuvattu, ja hybridisaatio-olosuhteita, jotka on kuvattu esimerkissä 2.2. Hybridisaatiokuvio saatiin altistamalla Kodak XAR-5 röntgenfilmi 18 tunniksi -70 °C:ssa käyttäen tehostinlevyjä.

Saaduista tuloksista päätellään, että seitsemästä eristetystä kloonista viiden DNA hybridisoituu oligonukleotidiseoksen kanssa, joka saatiin N-terminaalisesta aminohapposekvenssistä. Kaikissa viidessä kloonissa havaittiin olevan fragmentit, jotka olivat peräisin samasta genomisesta alueesta. Kattavammassa Southern-analyysissä, käyttäen entsyymejä BglII, EcoRV, NcoI, PstI, SstI ja XbaI, rakennettiin tämän genomisen alueen osittainen restriktiokartta. Tästä kokeesta voidaan päätellä, että 3,4 ke:n SstI-fragmentti sisältää A. nigerin axeA-geenin.

Esimerkki 2.6

A. nigerin axeA-geenin alakloonaus.

Faagista lambda$_{axe3}$ eristettiin 3.4 ke:n SstI-fragmentti pilkkomalla faagi-DNA SstI:llä ja erottamalla fragmentit kuten esimerkissä 2.4 on kuvattu. Fragmentti pilkottiin agaroosigeelistä, minkä jälkeen se otettiin talteen agaroosipalasta elektroeluutiolla käyttämällä ISCO-kuppeja. Dialyysimembraani asetettiin tämän kupin sekä suureen että pieneen säiliöön, kuppi täytettiin 0,005 x TAE:lla ja agaroosipala asetettiin kupin suureen säiliöön. Tämän jälkeen kuppi asetettiin elektroeluutiolaitteeseen, suuri säiliö katodikammioon, joka sisälsi TAE:ta, ja pieni säiliö anodikammioon, joka sisälsi TAE/3 M NaCl:ia. Fragmentteja elektroeluoitiin 100 V:lla 2 tunnin ajan. Tämän ajan jälkeen kuppi otettiin elektroeluutiolaitteesta ja puskuri poistettiin suuresta säiliöstä, kun taas pienestä

säiliöstä puskuri poistettiin vain yläosasta. Jäljelle jäänyttä puskuria (200 µl), joka sisälsi DNA-fragmentit, dialysoitiin kupissa tislattua vettä vastaan, 30 minuutin ajan. Lopulta DNA saostettiin lisäämällä 0,1 tilavuutta 3 M NaAc, pH 5,6 ja 2 tilavuudella kylmää (-20 °C) etanolia. DNA kerättiin sentrifugoimalla (Eppendorf-sentrifugi) 30 minuuttia 14 000 x g 4 °C:ssa. Supernatantin poiston jälkeen DNA-pelletti kuivattiin käyttäen Savant Speedvac vakuumisentrifugia. DNA liuotettiin 10 µl:aan TE-puskuria ja konsentraatio määritettiin agaroosielektroforeesilla käyttäen tunnettuja konsentraatioita Lambda-DNA:ta vertailunäytteinä ja etidiumbromidivärjäystä DNA:n osoittamiseksi.

Saatu fragmentti ligatoitiin vektoriin pEMBL18, joka oli pilkottu SstI:llä ja defosforyloitu alkalisella fosfataasilla, joka oli valmistettu seuraavalla tavalla; 1 µl (1 µg/µl) pEMBL18:aa sekoitettiin 2 µl:n 10 x reakt. 10 (BRL), 1 µl:n (1 U/µl) SstI ja 16 µl:n steriiliä tislattua vettä kanssa. DNA:ta pilkottiin 1 tunti 37 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 0,5 µl alkalista fosfataasia (1 U/µl) (Pharmacia LKB), mitä seurasi inkubaatio edelleen 37 °C:ssa vielä 30 minuuttia. Linearisoitu vektori eristettiin 0,6-prosenttisesta agaroosigeelistä, kuten edellä on kuvattu.

3,4 ke:n SstI-fragmentti ligatoitiin vektoriin, joka saatiin plasmidista pIM150 seuraavalla menettelytavalla. 100 ng pEMBL18-fragmenttia sekoitettiin seuraavien kanssa: 100 ng 3,4 ke:n SstI-fragmenttia ja 4 µl 5 x ligaatiopuskuria (koostumus; 500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP, 10 mM ditiotreitolia, 25 % PEG-6000), ja 1 µl (1,2 U/µl) DNA-ligaasia (BRL) lisättiin tähän seokseen lopulliseen tilavuuteen 20 µl. Inkubaation jälkeen, 16 tuntia 14 °C:ssa, seos laimennettiin 100 µl:aan steriilillä vedellä. 10 µl laimennettua seosta käytettiin transformoimaan E. coli-kannan JM101 vastaanottavat so-

lut, jotka oli valmisteltu CM1, CM2 -menetelmällä, kuten on kuvattu Pharmacian ohjekirjassa M13 kloonaus/sekvensointimenetelmälle. Saaduista pesäkkeistä valittua kuutta kasvatettiin yli yön LB-alustalla, joka sisälsi 100 µg/ml ampisilliinia. Viljelmistä eristettiin plasmidi-DNA Maniatis'in et al. (1982, s. 368 - 369) kuvaamalla alkalisella lyysimenetelmällä, jota käytettiin restriktioanalyysiin, kuten esimerkissä 2.4 on kuvattu, valitsemaan klooni, joka sisälsi halutun plasmidin. Plasmidi-DNA eristettiin suuressa mittakaavassa 500 ml viljelmistä plasmidin pIM150 sisältävää E. coli-kantaa JM101, jota kasvatettiin ampisilliinia 100 µg/ml sisältävällä LB-alustalla (Maniatis et al., 1982, s. 86). Plasmidi puhdistettiin CsCl-sentrifugoinnilla, fenoloitiin, saostettiin etanolilla ja liuotettiin 400 µl:aan TE:tä. Saanto oli noin 500 µg.

Plasmidia pIM150 analysoitiin edelleen restriktioentsyymeillä, ja saatiin restriktiokartta, joka on esitetty kuvassa 1.

Tämä plasmidi talletettiin talletuslaitokseen Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, Alankomaat E. coli:ssa DH5α 11.3.1991 numerolla CBS 157.91.

Esimerkki 3

A. nigerin axeA-geenin sekvenssin määritys.

A. nigerin axeA-geenin sekvenssi, sen promoottori-säätelyalue, geenin rakenneosa ja lopetusalue, määritettiin alakloonaamalla fragmentit pIM150:stä M13mp18/mp19:aan, yhdessä spesifisten oligonukleotidien käytön kanssa alukkeina sekvensointireaktioissa.

Nukleotidisekvenssianalyysiä varten eristettiin restriktiofragmentit, kuten esimerkissä 2.5 on kuvattu ja kloonattiin bakteriofagi M13 mp18/19 RF DNA-vektoreissa (Mes-

sing, 1983, supra; Norrander et al., supra, 1983), jotka oli pilkottu sopivilla restriktioentsyymeillä, kuten esimerkissä 2.5 on kuvattu. Nukleotidisekvenssit määritettiin dideoksinukleotidi-ketjunpäätösmenetelmällä (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 - 5467) käyttäen Pharmacia T_7 DNA-polymeraasisekvensointipakkausta. Tietokoneanalyysi tehtiin käyttäen PC/GENE -ohjelmaa. Määritetty sekvenssi on esitetty SEKV. ID. nro 7:na (sekvenssiluettelossa). Intronien asema johdettiin konsensussekvenssin perusteella 5'- ja 3'-liitoskohdista.

Esimerkki 4

Kloonatun axeA-geenin ekspressio A. niger-kannassa N593.

Esimerkki 4.1

axeA-geenin liittäminen A. niger-kantaan N593 kotransformaatiolla.

Plasmidi pIM150, saatu esimerkissä 2.5 kuvatulla tavalla, vietiin A. nigeriin kotransformoimalla A. niger-kanta N593 (A. niger-kannan N402 pyr$^-$-mutantti) käyttäen A. nigerin pyrA:ta valintamerkkinä plasmidissa pGW635 (Goosen et al., 1989, Mol. Gen. Genet. 219: 282 - 288) ja plasmidia pIM150 kotransformaatioplasmidina.

Rihmastosta valmistettiin protoplastit kasvattamalla A. niger-kantaa N593 minimialustalla, johon oli lisätty 0,5 % hiivauutetta, 0,2 % kasaminohappoja, 50 mM glukoosia ja 10 mM uridiinia, 20 tuntia 30 °C:ssa. A. niger-kannan N593 protoplastien valmistaminen ja transformaatiomenettely tehtiin, kuten Goosen et al., 1987 (supra) ovat kuvanneet. Saadut pyr$^+$-transformantit analysoitiin axeA-geenin ekspression suhteen Western blot -analyysillä.

Esimerkki 4.2

Transformanttien seulonta axeA-geenin ekspression suhteen.

Esimerkissä 4.1 saadut transformantit analysoitiin axeA-geenituotteen, AXE I -proteiinin, muodostuksen suhteen. Valittiin kaksikymmentä transformanttia, ja niitä kasvatettiin 72 tuntia alustalla, joka sisälsi litraa kohti; 30 g koivupuun ksylaania (Roth); 6 g $NaNO_3$, 0,5 g KCl, 0,5 g $MgSO_4$ x $7H_2O$, 0,5 g $CaCl_2$, 1,5 g KH_2PO_4 ja 0,1 g hiivauutetta ja 1 ml/l Visniac-liuosta (pH 6,0). Kasvatuksen jälkeen rihmasto poistettiin suodattamalla, ja viljelmäsuodos analysoitiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla käyttäen geeliä, joka sisälsi 12 % akryyliamidia. AXE I -proteiini osoitettiin nitroselluloosalla, sen jälkeen kun oli tehty elektroblottaus ja inkubaatio polyklonaalisilla vasta-aineilla, jotka oli aikaansaatu esimerkissä 1.1 kuvatulla tavalla puhdistettua AXE I -proteiinia vastaan. Sitoutunut vasta-aine osoitettiin, kun oli inkuboitu vuohi-antikaniini-vasta-aineen kanssa, joka oli liitetty alkaliseen fosfataasiin, Bioradin ohjekirjan mukaisesti.

Neljä analysoiduista kahdestakymmenestä transformantista ylituotti AXE I -proteiinia tällä menetelmällä määritettynä. Proteiini erittyi alustaan. Analysoiduista transformanteista valittiin yksi, joka antoi suurimmat saannot AXE I -proteiinia, transformantti TrA10.

Esimerkki 5

Asetyyliksylaaniesteraasin ja endo-(1,4)-β-ksylanaasin, ja vastaavasti β-(1,4)-ksylosidaasin yhdistetty vaikutus.

0,2-prosenttista (w/v) höyrytettyä koivupuun ksylaaniliuosta inkuboitiin asetyyliesteraasin kanssa, sekä yhdistelmien asetyyliesteraasia ja joko endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:tä, endo-(1,4)-β-ksylanaasi II:ta, endo-(1,4)-β-ksylanaasi III:a tai β-(1,4)-ksylosidaasia kanssa. Aikakäyrät (kuten endo-(1,4)-β-ksylanaasille on esitetty kuvassa 2) osoittavat, että endo-(1,4)-β-ksylanaasi I, II ja III alkavat vapauttaa huomattavia määriä ksyloosia ja

ksyloosioligomeerejä (X2, X3 ja X4) vasta kun suurin osa asetyyliryhmistä on vapautettu. Asetyyliesteraasi ei vapauta enempää etikkahappoa kuin käytettynä yhdessä ksylaania hajottavien entsyymien kanssa. Ksyloosin vapautuminen β-(1,4)-ksylosidaasilla höyrytetystä koivupuun ksylaanista on hidasta mutta vakaata.

Ilman asetyyliksylaaniesteraasia endo-(1,4)-β-ksylanaasit ja β-(1,4)-ksylosidaasi eivät pilko höyrytettyä koivupuun ksylaania, se on, ne eivät vapauta huomionarvoisia määriä X1:tä, X2:ta, X3:a ja X4:ää. Asetyyliryhmät voivat sen vuoksi estää endo-(1,4)-β-ksylanaasien tai β-(1,4)-ksylosidaasin entsyymiaktiivisuuden.

Jotta tehostettaisiin höyrytetyn koivun puun ksylaanin hajotusta, vertailevat tutkimukset tehtiin inkuboimalla höyrytettyä koivupuun ksylaania 24 tuntia ainoastaan asetyyliesteraasin, endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi II:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi III:n tai β-(1,4)-ksylosidaasin kanssa, ja yhdistelmien asetyylieste-raasia ja näitä ksylaania hajottavia entsyymejä kanssa. Myöskin toteutettiin esi-inkubaatiot asetyyliesteraasin kanssa 1 tunnin ajan, mitä seurasi 24 tunnin inkubaatiot ksylaania hajottavien entsyymien kanssa. Taulukossa 1 esitetään tulokset etikkahapon, ksyloosin ja ksyloosioligomeerien vapautumisesta 24 tunnin inkubaation jälkeen.

Asetyyliksylaaniesteraasi vapauttaa 2,60 - 2,80 ja 4,30 μmoolia/ml asetyyliryhmiä 1 tunnin ja vastaavasti 24 tunnin jälkeen (4,30 μmoolia/ml vastaa kaikkien asetyyliryhmien vapautumista 80 - 90-prosenttisesti). Käyttämällä ksylaania hajottavien entsyymien ja asetyyliksylaanieste-raasien yhdistelmää ei tapahdu lisääntymistä etikkahapon vapautumisen alkutasossa.

Ilman asetyyliksylaaniesteraasia endo-(1,4)-β-ksylanaasit ja β-(1,4)-ksylosidaasi A. awamorista eivät vapauta, tai

vapauttavat vain hyvin pieniä määriä ksyloosioligomeerejä höyrytetystä koivun puun ksylaanista (se on X_1 tai X_1, X_2 ja X_3, β-(1,4)-ksylosidaasilla ja vastaavasti endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:llä). Yhdessä asetyyliksylaaniesteraasin kanssa nämä ksylaania hajottavat entsyymit vapauttavat melko suuria määriä ksyloosioligomeerejä 24 tunnin inkubaation jälkeen. Kuitenkin, esikäsittelemällä höyrytettyä koivupuun ksylaania asetyyliesteraasilla vain 1 tunti, ksyloosioligomeerien määrä on jonkin verran alhaisempi. Asetyyliksylaaniesteraasin ja ksylaania hajottavien entsyymien yhdistelmä vapauttaa siten suurimmat määrät X_1:tä, X_2:ta, X_3:a ja X_4:ää. Tämä eroavaisuus voidaan selittää ksyloosioligomeerien linearisaatiolla höyrytetyn koivun puun ksylaanin deasetylaatiossa. Jos suuremmat ksyloosioligomeerit eivät pilkkoudu pienemmiksi oligomeereiksi ksylaania hajottavilla entsyymeillä, suuret ksyloosioligomeerit voivat aggregoitua tämän linearisaation seurauksena, ja aiheuttaa saostumisen. Tämä saostuma on vähemmän altis hajotukselle (Poutanen et al., 1989 ja 1990).

Tässä esitetyistä tuloksista on selvää, että asetyyliryhmien alkuvapautumisella asetyyliesteraasin avulla luodaan uusia kohtia polysakkaridirankaan, näiden kohtien ollessa soveltuvia endo-(1,4)-β-ksylanaasien sitoutumiselle. Tosiseikka, että puhdistetut ksylaania hajottavat entsyymit Aspergillus awamorista eivät pilkkoneet höyrytettyä koivupuun ksylaania merkittävästi, vastaa Poutasen et al. (supra) havaintoja, että raakauute A. awamorista ei pilkkonut höyrytettyä koivupuun ksylaania merkittävästi.

Taulukko 1

Etikkahapon, ksyloosin ja ksyloosioligomeerien vapautuminen 0,2 -prosenttisesta (w/v) höyrytetystä koivupuun ksylaaniliuoksesta asetyyliesteraasin, 1,0 µg/ml, vaikutuksella yksin ja yhdessä endo-(1,4)-β-ksylanaasi I:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi II:n, endo-(1,4)-β-ksylanaasi III:n tai β-(1,4)-ksylosidaasin kanssa, 0,1 µg/ml.

Inkubaation tyyppi	Tuotteen muodostus Etikkahappo[1]	X[2]	X2[2]	X3[2]	X4[2]
Nolla	0,0	0,008	0,002	0,003	0,000
AE	4,30				
Endo I	0,06	0,022	0,027	0,079	0,000
Endo II	0,12	0,010	0,011	0,011	0,000
Endo III	0,02	0,010	0,010	0,011	0,000
β-ksylosidaasi	0,16	0,065	0,000	0,000	0,000
AE + Endo I	4.30	0,043	0,210	0,265	0,048
AE + Endo II	4,30	0,010	0,104	0,252	0,105
AE + Endo III	4,30	0,020	0,209	0,222	0,054
AE+β-ksylosidaasi	4,30	0,237	0,006	0,007	0,006
AE[3]+Endo[4] I	2,64	0,036	0,149	0,253	0,063
AE[3]+Endo[4] II	2,76	0,010	0,038	0,080	0,045
AE[3]+Endo[4] III	2,55	0,012	0,067	0,077	0,042
AE[3]+β-ksylosidaasi[4]	2,99	0,113	0,005	0,005	0,000

[1] µmol/ml

[2] mg/ml

[3] Esi-inkubaatio 1 h

[4] Esi-inkubaatio 24 h

Esimerkki 6

Asetyyliksylaaniesteraasiaktiivisuuden tutkiminen in vitro olosuhteissa, jotka simuloivat siipikarjan ruoansulatuskanavaa

1,1 grammaa rehua ja rehun aineosia (asetyyliksylaaniesteraasin kanssa tai ilman sitä) inkuboitiin 1 tunti 50 mM natriumasetaattipuskurissa, pH 5,5, 39 °C:ssa, joka simuloi kananpojan kupua. Kun pH oli laskettu 3,0:aan HCl:lla ja lisätty 5 ml pepsiiniliuosta (Merck: 5,28 g/l), seosta

inkuboitiin 1,5 tuntia 39 °C:ssa, kuten mahassa. Lintujen ohutsuolta simuloitiin nostamalla pH 6,5:een lisäämällä natriumfosfaattia (2,5 ml, 1 M) ja 2,5 ml pankreatiinia/-sappihappoja. Toisen 1,5 tunnin inkubaation jälkeen 39 °C:ssa seos sentrifugoitiin, pelletti kuivattiin ja sen paino määritettiin. Eroa käsiteltyjen ja käsittelemättömien pellettien painossa käytettiin mittana entsymaattiselle aktiivisuudelle standardioloissa.

Esimerkkeinä rehun aineosista vehnänleseitä ja maissijauhoja inkuboitiin asetyyliksylaaniesteraasin kanssa edellä esitetyn kuvauksen mukaisesti. Kuiva-aineen sulavuutta parannettiin monella prosentilla.

Tämä osoittaa, että asetyyliksylaaniesteraasia voidaan käyttää muun kuin puusta peräisin olevan hemiselluloosa-aineksen hajotuksessa.

SEKVENSSILUETTELO

SEKV. ID. NRO: 1
SEKVENSSITYYPPI: aminohappo-
SEKVENSSIN PITUUS: 21 aminohappoa
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: N-terminaaliset aminohapot asetyyliksylaaniesteraasista
ORGANISMI: Aspergillus niger

Ser Gly Ser Leu Gln Gln Val Thr Asp Phe Gly
1
Asp Asn Pro Thr Asn Val (Gly) Met Tyr (Ile)
12 21

SEKV. ID. NRO: 2
SEKVENSSITYYPPI: aminohappo-
SEKVENSSIN PITUUS: 20 aminohappoa
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: CNBr-peptidin N-terminaaliset aminohapot asetyyliksylaaniesteraasista (CNBR-peptidi 1)
ORGANISMI: Aspergillus niger

Tyr Ile Tyr Val Pro Asn Asn Leu Ala Ser Asn
1
Pro Gly Ile Val Val Ala Ile His Tyr
12 20

SEKV. ID. NRO: 3
SEKVENSSITYYPPI: aminohappo-
SEKVENSSIN PITUUS: 20 aminohappoa
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: CNBr-peptidin N-terminaaliset aminohapot asetyyliksylaaniesteraasista (CNBR-peptidi 2)
ORGANISMI: Aspergillus niger

? Ser Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Pro Thr ?
1 11
Gln (Ile) Tyr (His/Thr) (Ser) Gly (Ser) (Ser) Asp
12 20

SEKV. ID. NRO: 4
SEKVENSSITYYPPI: nukleotidi-
SEKVENSSIN PITUUS: 29 nukleotidia
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: oligonukleotidiseos, johdettu asetyyli-ksylaaniesteraasin N-terminaalisista aminohapoista
ORGANISMI: Aspergillus niger

GGATTATCIC CAAAATCIGT IACCTGCTG 29
G G G G

SEKV. ID. NRO: 5
SEKVENSSITYYPPI: nukleotidi-
SEKVENSSIN PITUUS: 20 nukleotidia
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: oligonukleotidiseos, johdettu asetyyli-ksylaaniesteraasin N-terminaalisista aminohapoista
ORGANISMI: Aspergillus niger

CCAAAATCIG TIACTTGTTG 20
G G G G

SEKV. ID. NRO: 6
SEKVENSSITYYPPI: nukleotidi-
SEKVENSSIN PITUUS: 20 nukleotidia
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: oligonukleotidiseos, johdettu asetyyli-ksylaaniesteraasin CNBr-peptidin 1 N-terminaalisista aminohapoista
ORGANISMI: Aspergillus niger

TTATTIGGIA CATAGATATA 20
G G G G

SEKV. ID. NRO: 7
SEKVENSSITYYPPI: nukleotidi-, ja vastaava proteiini
SEKVENSSIN PITUUS: 1943 emäsparia
TOPOLOGIA: lineaarinen
MOLEKYYLITYYPPI: genominen DNA
ALKUPERÄINEN LÄHDE
ORGANISMI: Aspergillus niger
VÄLITÖN LÄHDE KOKEISSA
SOLULINJAN NIMI: E. coli JM101::pGW150

YKSITYISKOHDAT: 606 - 612 TATA-signaali
534 - 538 CCAAT-box
713 - 1756 koodaava sekvenssi
918 - 970 introni 1
1228 - 1305 introni 2
713 - 800 prepropeptidi
801 - 1756 kypsä peptidi
OMINAISUUDET: Aspergillus nigerin asetyyliksylaanieste-raasin (axe A) geeni

AA ATATGTCTTT TATTACCTTG TTCTGTTGAC TGGTGCATTA CTTAAAACTA 52

GAACAGTTGT TCAAACACAA GTTGGACCTA TACCTGTCAT AACTCGCCTC 102

GTCGCGTTAT TCATCATGCA AAAACTATCC GTTATCAGCG CCGGGAGTAT 152

ACTCCCAAGA AGCTCACTCA CATGCAAAGA AATGTGCCGA TTGCTTAAGC 202

TTTACCCCAG ATTATTCCGT AACCATATAT CCATTCTGGC TGAATACCGG 252

CTATTTGATG CTGCATACTC TCACATTCCG CACAGCCGCC AGTGTGAAGA 302

ATCACCAGTG GTCCAGCCCT GCAGTGGCTC TAACGGGATC TGTTACGGAG 352

TTCGGCCCGC AACGTCGATC TCTAACCATT TCGATCTGGA GTTCCCACTC 402

```
CGTGCCGTCT ATCCCAGACT CCTCATGTCG GAGCTGTCAC GGCTGTCACA   452

TTAGCCCTGC TTAATTTCCG TGATGAAATC AGCCTACACT GTCATTTCTA   502

TGTCTAGACC ACTGCCAAAT ACCCACTGAA CCCAATACTT CCCACAACTA   552

TAGAAACATA CTATTACTCC ATAATGTTTC AATTTACCCG CTCTCTGCAG   602

CGCTATAAAT CGTCTTCAAA TCCTCTGGCG TCTTTCCTAC TGCCCAAGCT   652

GCATCTCTTT TCACCTAGCA GGATTCAAGC GTAGTGCCTA GCACGGCAGA   702

AGAAACCACC                                               712

ATG CTA CTA TCA ACC CAC CTC CTC TTC GTC ATC ACC ACC TTC TTA 757
Met Leu Leu Ser Thr His Leu Leu Phe Val Ile Thr Thr Phe Leu
-25                 -20                 -15

ACC TCC CTC CTC CAC CCC ATC GCC GCC CAT GCT GTC AAG CGC AGT 802
Thr Ser Leu Leu His Pro Ile Ala Ala His Ala Val Lys Arg Ser
-10                  -5                   1                5

GGC AGT CTT CAA CAG GTC ACC GAT TTC GGT GAC AAC CCT ACA AAT 847
Gly Ser Leu Gln Gln Val Thr Asp Phe Gly Asp Asn Pro Thr Asn
                10                  15                  20

GTA GGC ATG TAC ATC TAC GTG CCT AAC AAC TTG GCC TCA AAT CCA 892
Val Gly Met Tyr Ile Tyr Val Pro Asn Asn Leu Ala Ser Asn Pro
                25                  30                  35

GGT ATC GTG GTT GCA ATC CAC TAC TGTACG TTCCCCCACA TTTCTACAAT 942
Gly Ile Val Val Ala Ile His Tyr
                40

ATAAACCACA ATACTAAGCA TGGCATAG GC ACC GGT ACC GGC CCC GGC TAC993
                                  Leu Thr Gly Thr Gly Pro Gly Tyr
                                       45                  50

TAC AGC GCC TCC CCC TAC GCC ACC CTC TCC GAG CAA TAC GGC TTT 1038
Tyr Ser Ala Ser Pro Tyr Ala Thr Leu Ser Glu Gln Tyr Gly Phe
            55                  60                  65
```

```
ATC GTG ATC TAC CCG TCC AGC CCA TAC TCC GGT GGC TGT TGG GAC 1083
Ile Val Ile Tyr Pro Ser Ser Pro Tyr Ser Gly Gly Cys Trp Asp
             70                  75                  80

GTG AGT TCA CAG GCA ACG TTA ACA CAC AAC GGG GGC GGA AAC AGT 1128
Val Ser Ser Gln Ala Thr Leu Thr His Asn Gly Gly Gly Asn Ser
             85                  90                  95

AAC TCC ATT GCC AAC ATG GTC ACC TGG ACG ATT AGC GAG TAC GGG 1173
Asn Ser Ile Ala Asn Met Val Thr Trp Thr Ile Ser Glu Tyr Gly
            100                 105                 110

GCC GAT AGT AGC AAG GTG TTC GTG ACG GGA TCG AGT TCG GGG GCT 1218
Ala Asp Ser Ser Lys Val Phe Val Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ala
            115                 120                 125

ATG TTG ACG GTATTTCCTC TTCCCTTCCA ACCGTTCCCC CTCTCTACAA     1267
Met Leu Thr
        129

ATTAAAATAG TAAAAGTTGT GCATGCTAAT AAAATTAG AAC GTA ATG GCA   1317
                                      Asn Val Met Ala
                                                  133

GCA ACC TAC CCC GAA CTC TTC GCC GCC GCC ACC GTC TAC TCC GGA 1362
Ala Thr Tyr Pro Glu Leu Phe Ala Ala Ala Thr Val Tyr Ser Gly
                        140                 145

GTC TCA GCC GGG TGC TTC TAC TCG AAC ACC AAC CAA GTA GAT GGA 1407
Val Ser Ala Gly Cys Phe Tyr Ser Asn Thr Asn Gln Val Asp Gly
    150                 155                 160

TGG AAT TCC ACT TGC GCC CAG GGT GAT GTA ATC ACC ACC CCC GAG 1452
Trp Asn Ser Thr Cys Ala Gln Gly Asp Val Ile Thr Thr Pro Glu
    165                 170                 175

CAC TGG GCC AGT ATT GCA GAG GCA ATG TAC TCG GGA TAC TCA GGA 1497
His Trp Ala Ser Ile Ala Glu Ala Met Tyr Ser Gly Tyr Ser Gly
    180                 185                 190

AGT CGT CCA AGG ATG CAG ATC TAC CAC GGT ACT CTC CAT ACG ACG 1542
Ser Arg Pro Arg Met Gln Ile Tyr His Gly Thr Leu His Thr Thr
    195                 200                 205

CTG TAT CCT CAG AAC TAC TAT GAG ACG TGC AAG CAG TGG TCT GGA 1587
Leu Tyr Pro Gln Asn Tyr Tyr Glu Thr Cys Lys Gln Trp Ser Gly
    210                 215                 220

GTG TTT GGA TAT GAT TAT AGC GCA CCG GAG AAG ACG GAG GCG AAT 1632
Val Phe Gly Tyr Asp Tyr Ser Ala Pro Glu Lys Thr Glu Ala Asn
    225                 230                 235
```

```
ACC CCA CAG ACG AAT TAC GAG ACG ACG ATT TGG GGA GAT AGT CTG 1677
Thr Pro Gln Thr Asn Tyr Glu Thr Thr Ile Trp Gly Asp Ser Leu
    240                 245                 250

CAG GGA ATC TTC GCG ACA GGC GTG GGT CAT ACG GTG CCG ATT CAT 1722
Gln Gly Ile Phe Ala Thr Gly Val Gly His Thr Val Pro Ile His
    255                 260                 265

GGG GAT AAG GAT ATG GAG TGG TTT GGG TTT GCT TGATTGGATG      1765
Gly Asp Lys Asp Met Glu Trp Phe Gly Phe Ala
    270                 275             279

ATCGAATGGT TTAGCCTGGG GGTATCTCGG AACCGGGAAT GATGAAACTT      1815

CTGAAGTATG ATATGTTAAC GATATCGCGT CAACGAGCGT TTGTTGAAGC      1865

TTTAGTGTGT AATGTGGAGT ATGAGCAAAA TGTGCGCTGC CCGTGTCTGA      1915

TGCCAAAACC AATGCAGCAC AAGAGCTC                              1943
```

Patenttivaatimukset

1. Rekombinantti-DNA-fragmentti, **tunnettu** siitä, että fragmentti koodaa proteiinia, jolla on asetyyliksylaaniesteraasiaktiivisuutta, joka DNA-fragmentti on esitetty sekvenssissä nro 7, tai on sieni-DNA-sekvenssi, joka hybridisoituu mainitun sekvenssin kanssa ankarissa olosuhteissa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen rekombinantti-DNA-fragmentti, **tunnettu** siitä, että sieni valitaan joukosta, johon kuuluvat seuraavat suvut: *Aspergillus*, *Trichoderma* ja *Schizophyllum*.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen rekombinantti-DNA-fragmentti, **tunnettu** siitä, että sieni valitaan joukosta, johon kuuluvat seuraavat lajit: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* ja *Schizophyllum commune*.

4. Ekspressiovektori, joka sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksista 1-3 mukaisen DNA-fragmentin, **tunnettu** siitä, että DNA-fragmentti on liittynyt toiminnallisesti ekspression säätelysekvensseihin.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen ekspressiovektori, **tunnettu** siitä, että säätelysekvenssit ovat heterologiset kloonatulle DNA-fragmentille.

6. Mikrobi-isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että se on transformoitu ekspressiovektorilla, joka sisältää asetyyliksylaaniesteraasiaktiivisuutta omaavaa proteiinia koodaavan, patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-fragmentin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen transformoitu mikrobi-isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että isäntäsolu on *Aspergillus*, *Bacillus* tai *Kluyveromyces*.

8. Menetelmä asetyyliksylaaniesteraasiaktiivisuutta omaavan proteiinin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että:
a) viljellään mikrobi-isäntää, joka on transformoitu ekspressiovektorilla, joka sisältää asetyyliksylaaniesteraasiaktiivisuutta omaavaa proteiinia koodaavan, patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-fragmentin, olosuhteissa, jotka saavat aikaan asetyyliksylaaniesteraasin tuoton,
b) valinnaisesti otetaan talteen asetyyliksylaaniesteraasi viljelmästä.

9. Plasmidi pIM150 (CBS 157.91).

Patentkrav

1. Rekombinant DNA-fragment, **kännetecknat** därav, att fragmentet kodar för ett protein med acetylxylanesterasaktivitet, vilket DNA-fragment representeras av sekvensen nr 7, eller är en DNA-sekvens från svamp som hybridiserar med nämnda sekvens vid stringenta betingelser.

2. Rekombinant DNA-fragment enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att svampen väljs bland släktena *Aspergillus*, *Trichoderma* och *Schizophyllum*.

3. Rekombinant DNA-fragment enligt patentkravet 2, **kännetecknat** därav, att svampen väljs bland arterna *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* och *Schizophyllum commune*.

4. Uttryckningsvektor, som innehåller ett DNA-fragment enligt något av patentkraven 1-3, **kännetecknat** därav, att DNA-fragmentet är operativt bundet till regulatorista sekvenser för uttryckningen.

5. Uttryckningsvektor enligt patentkravet 4, **kännetecknat** därav, att de regulatoriska sekvenserna är heterologiska till det klonade DNA-fragmentet.

6. Mikrobiell värdcell, **kännetecknad** därav, ett den transformerats med en uttryckningsvektor som innehåller ett DNA-fragment som kodar för ett protein med acetylxylanesterasaktivitet enligt patentkravet 1.

7. Transformerad mikrobiell värdcell enligt patentkravet 6, **kännetecknad** därav, att värdcellen är en *Aspergillus*, en *Bacillus* eller en *Kluyveromyces*.

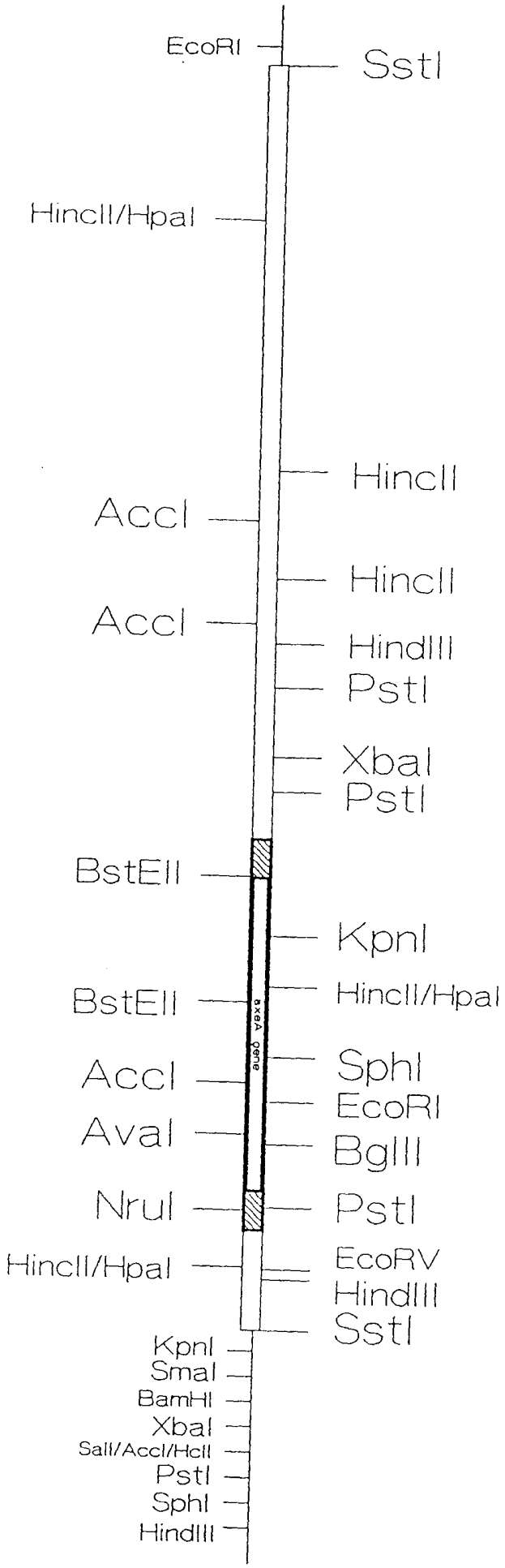
8. Förfarande för att producera ett protein med acetylxylanesterasaktivitet, **kännetecknat** därav, att

a) en mikrobiell värd, transformerad med en uttryckningsvektor som innehåller ett DNA-fragment som kodar för ett protein med acetylxylanesterasaktivitet enligt patentkravet 1, odlas vid betingelser som ger upphov till bildande av acetylxylanesteras, och

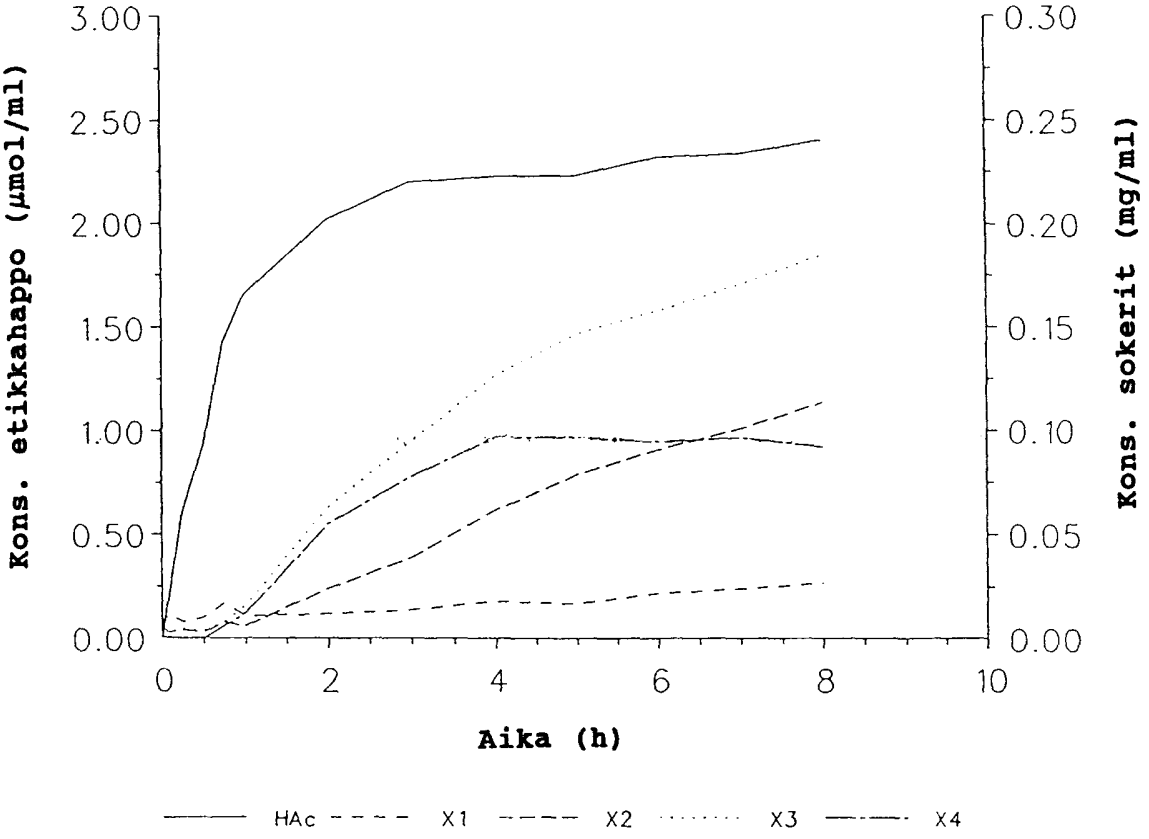
b) acetylxylanesteraset eventuellt utvinns från odlingen.

9. Plasmiden pIM150 (CBS 157.91).

110614



KUVA 1


Kons. etikkahappo (µmol/ml)
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Kons. sokerit (mg/ml)
0
2
4
6
8
10
Aika (h)
HAc
X1
X2
X3
X4

KUVA 2