

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 941760 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **941760**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12N 9/42
D21C 9/10
C12S 3/08**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **14.10.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.04.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.04.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **14.10.1992 PCT/DK1992/000300**
Internationell ansökan - International
application

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

18.10.1991 DK 1753/91

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Dahlberg, Leif Arne Lennart, Sverige, SVERIGE, (SE)

2 •Holst, Olof Peder, Sverige, SVERIGE, (SE)

3 •Anker, Lisbeth, Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Lämmönkestävä ksylaanaasi kannasta Rhodothermus marinus

Termoresistent xylanas från en stam av Rhodothermus marinus

Lämmönkestävä ksylaanaasi kannasta *Rhodothermus marinus*-
Termoresistent xylanase från en stam av *Rhodothermus marinus*

- 5 Tämä keksintö kohdistuu uusiin entsyymeihin. Erityisemmin keksintö saa aikaan uusia ksylanaaseja, jotka ovat saatavissa kannoista, jotka kuuluvat sukuun *Rhodothermus*. Keksintö kohdistuu myös ksylanaasien käyttöön lignoselluloosamassan käsittelyssä.

10

Ksylaani, kasvihemiselluloosan pääasiallinen komponentti, on beeta-1,4-ksylosididien kytkeä D-ksyloosin polymeeri. Ksylaani voidaan hajottaa ksyloosiksi ja ksylo-oligomeereiksi happo- tai entsyymihydrolyysillä. Ksylaanin entsyymaattinen hydrolyysi tuottaa vapaita sokereita ilman, että hapoilla muodostetaan sivutuotteita (esim. furaanit).

15

Ksylaanaasien pääasialliset käytöt ovat maanviljelysjätteen entsyymaattinen hajottaminen alkoholipolttoaineiden valmistamiseksi, eläinrehujen entsyymaattinen käsittely vapaiden pentoosisokerien vapauttamiseksi, selluloosaa tuottavien liuotusmassojen valmistaminen ja puumassan biovalkaisu [Detroy R.W., Organic Chemicals from Biomass, (CRC Press, Boca Raton, FL, 1981) 19-41, Paice, M.G. ja L. Jurasek., J. Wood Chem. Technol. 4: 1987-198, Pommier, J.C., J.L. Fuentes, G. Goma., Tappi Journal (1989); 187-191, Senior, D.J., et al., Biotechnol. Letters 10 (1988):907-912].

25

30

Massa- ja paperiteollisuudessa käytetään ksylaanikoostumuksia valkaisumenetelmissä parantamaan valkaistujen massojen valkoisuusastetta, vähentämään valkaisuvaiheissa käytetyn kloorin määrää ja lisäämään massojen jauhaantuneisuutta kierrätyspaperimenetelmässä [Eriksson, K.E.L., Wood Science and Technology 24 (1990), 79-101, Paice, M.G., R. Bernier ja L. Jurasek, Biotechnol. and Bioeng. 32 (1988), 235-239, Pommier, J.C., J.L. Fuentes, ja G. Goma, Tappi Journal (1989), 187-191].

35

- Sulfaattimassan valmistus, massa- ja paperiteollisuudessa laajalti käytetty menetelmä, käsittää massan alkalisulfaattikeittämisen 95 %:n ligniinistä poistamiseksi. Jäljelle jäänyt 5 % ligniiniä antaa massalle tumman ruskean värin, jolla on taipumus tummeta UV-valossa ja hapettumisesta. Valkean massan saamiseksi korkealaatuista paperia varten ruskea väri poistetaan monivaiheisella valkaisumenetelmällä käyttäen kloori ja/tai klooridioksidia.
- 10 Viimeaikoina on huolehdittu paljon valkaisumenetelmässä syntyvien kemikaalien ympäristövaikutuksesta. Entsyymit voivat auttaa ligniinin poistamisessa massasta ilman haitallisia sivuvaikutuksia. Raportit osoittavat, että puussa oleva ligniini on liittynyt ksylaaniin [Eriksson, O., et al., Wood Sci. Technol 14 (1980), 267, Takashi, N., ja T. Koshijima, Wood Sci. Technol. 22 (1988) 177-189]. Ksylaenin rajoitetulla hydrolyysillä esiintyy valkaisemisen aikana suurempi ligniinin vapautuminen. Täten käsittelemällä massa entsyymaattisesti ennen valkaisua tarvittavan aktiivisen kloorin määrä puolestaan vähenee [Viikari, L., et al., Proceedings of the 3rd International Symposium on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (1986), 67].
- 25 Viimeaikoina uusia termofiilisiä bakteereita nimeltään *Rhodothermus* on eristetty alkalisesta kuumasta lähteestä Islannissa [Alfredsson, G.A., Kristjansson, J.K., Hjörleifsdottir, S., Stetter, K.O. (1988): *Rhodothermus marinus*, gen.nov., sp.nov., a thermophilic, halophilic bacterium from submarine hot springs in Iceland, J. Gen. Microbiol 134, 299-306]. Olemme nyt havainneet, että nämä bakteerit tuottavat erittäin lämmönkestäviä ksylanolyttisiä entsyymeitä, joiden stabiilius on hyvä laajalla pH-alueella.
- 35 Näin ollen keksintö saa aikaan ensimmäisessä kohteessa ksylanaseja, jotka ovat aktiivisia lämpötiloissa alle 60-^{yli} 100 °C, joiden suhteellinen aktiivisuus on yli 50 % välillä pH 5 - pH 8 5 minuuttia 65 °C:ssa inkuboinnin jälkeen, suhteellinen lämpötilastabiilius 80 °C:ssa yli 80 % pH:ssa 7 3 tuntia inkuboinnin jälkeen ja jotka ovat kykene-

viä hydrolysoimaan koivupuuksyylaaneja ja joilla on immuno-
kemiallisia ominaisuuksia, jotka ovat identtisiä tai osit-
tain identtisiä niiden ksylanaasien immunokemiallisten omi-
naisuuksien kanssa, jotka on johdettu kannasta ATCC 43812
5 tai kannasta ATCC 43813 tai kannasta DSM 4252.

Toisena kohteena keksintö saa aikaan menetelmän keksinnön
mukaisen ksylanaasin valmistamiseksi, joka menetelmä käsit-
tää ksylanaasia tuottavan kannan suvusta *Rhodothermus vil-*
10 *jelemisen* sopivassa ravintoväliaineessa, joka sisältää hii-
li- ja typpilähteitä ja ei-orgaanisia suoloja, mitä seuraa
halutun entsyymin talteenotto.

Muuna kohteena keksintö saa aikaan menetelmän lignosellu-
15 loosamassan käsittelymiseksi, jossa lignoselluloosamassaa
käsitellään keksinnön mukaisella entsyymillä.

Esillä olevaa keksintöä valaistaan lisäksi viitaten oheis-
tettuihin piirustuksiin, joissa:
20 kuvio 1 esittää keksinnön mukaisen ksylanaasin lämpötila-
stabiiliutta esitettynä suhteellisen jäännösaktiivisuuden
prosenttina vs. aika erilaisissa lämpötiloissa ($\square$ 80 °C; $\diamond$
90 °C, $\blacksquare$ 100 °C) ja pH 7,
kuvio 2 esittää keksinnön mukaisen ksylanaasin lämpötilaop-
25 timia esitettynä spesifisenä ksylanaasiaktiivisuutena vs.
erilaiset 5 min. inkubointilämpötilat ja pH 7,
kuvio 3 esittää keksinnön mukaisen ksylanaasin pH-stabiili-
liutta absorbanssina 540 nm:ssä (so. ksylanaasiaktiivisuus)
vs. erilaiset pH-arvot ja erilaisina inkubointiaikoina ($\square$ 0
30 h, inkub., $\diamond$ 4 h inkub., $\blacksquare$ 8 h inkub.) ja 65 °C, ja
kuvio 4 esittää keksinnön mukaisen ksylanaasin pH-aktiivi-
suutta 5 min 65 °C:ssa inkuboinnin jälkeen esitettynä ab-
sorbanssina 540 nm:ssä mitattuna pH-arvoissa 4-11,

35 Organismi

Rhodothermus marinus, suvun *Rhodothermus* edustaja, on ter-
mofiilinen bakteerikanta, joka voidaan eristää merenalai-
sista alkalisisista kuumista lähteistä Islannissa. Organismi
on aerobinen, heterotrooppinen, gram-negatiivinen, tangon-

muotoinen ja ei-liikkuva. Kanta on punapigmenttinen, kasvulta suolasta riippuva ja siinä on solunulkoista ksylanaasiaktiivisuutta.

- 5 Kaksi *Rhodothermus marinus* -kannan edustajaa on talletettu tyyppiviljelminä ja ne on julkisesti saatavissa Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH:sta, Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, Saksa talletusnumerolla DSM 4252 ja/tai American Type Culture Collectionista, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, 10 talletusnumeroilla ATCC 43812 ja ATCC 43813. Talletus ATCC 43812 on todettu identtiseksi talletuksen DSM 4252 kanssa.

- Organismit kykenevät kasvamaan agar-levyillä ja nestemäisessä väliaineessa sopivalla täydennyksellä, esim. esimerkiksi 1 kuvatussa väliaineessa. Solunulkoinen ksylanaasiaktiivisuus voidaan indusoida ksylaanilla. Viljelyjärjestelmän valinta vaikuttaa suuresti spesifiseen kasvunopeuteen ja kasvu kompleksi- tai synteettisessä väliaineessa vaikuttaa myös tuottavuuteen. 20

Entsyymit

- .. Tämän keksinnön mukaiset ksylanaasit ovat saatavissa suvun
Rhodothermus jäsenistä ja ne voidaan valmistaa viljelemällä
25 kantaa, joka kuuluu sukuun *Rhodothermus*, erityisesti kantaan *Rhodothermus marinus*, edullisimmin kantoja ATCC 43813 ja ATCC 43812 viimeksi mainitun ollessa identtinen kannan DSM 4252 kanssa, tai niiden mutantteja tai variantteja sopivassa ravintoväliaineessa, joka sisältää hiili- ja typ-
30 pilähteitä ja ei-orgaanisia suoloja, mitä seuraa halutun entsyymin talteenotto. Entsyymi voidaan saada myös yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

- .. Tämän keksinnön mukaista ksylanaasia voidaan kuvata seuraavilla piirteillä. 35

Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Tämän keksinnön mukaisella entsyymillä on ksylanolyttistä aktiivisuutta lämpötiloissa alle 60 - yli 100 °C. Mitään

selvää lämpötilaoptimia ei ole havaittu mutta ilmeisesti (ks. kuvio 2) entsyymillä on optimaalinen aktiivisuus laajalla lämpötila-alueella 80 °C - yli 100 °C, erityisemmin alueella 85 °C - 100 °C.

5

Keksinnön mukaisen entsyymin suhteellinen aktiivisuus on yli 50 % alueella pH - pH 8 15 minuuttia 65 °C:ssa inkuboinnin jälkeen. Lisäksi näyttää (ks. kuvio 4), että entsyymien pH-optimi on alueella pH 5-7, erityisesti noin pH 10 mitattuna 5 minuuttia 65 °C:ssa inkuboinnin jälkeen. Keksinnön mukaisella entsyymillä on välillä pH 5 - pH 8 suhteellisen ksylanolyttinen aktiivisuus yli 50 %, kuten todistetaan kuviossa 4.

15 Keksinnön mukaisella entsyymillä on suhteellinen jäännösaktiivisuus (lämpötilastabiilius) 3 tunnin inkuboinnin, edullisesti 5 tunnin inkuboinnin, pH:ssa 7 ja 80 °C:ssa jälkeen yli 80 %. 3 tunnin inkuboinnin, edullisesti 5 tunnin inkuboinnin, pH:ssa 7 ja 90 °C:ssa jälkeen keksinnön mukaisen 20 entsyymin suhteellinen jäännösaktiivisuus on yli 60 %. 3 tunnin inkuboinnin, edullisesti 5 tunnin inkuboinnin, pH:ssa 7 ja 100 °C:ssa jälkeen keksinnön mukaisen entsyymin suhteellinen jäännösaktiivisuus on yli 40 %.

25 24 tunnin inkuboinnin pH:ssa 7 ja 80 °C:ssa jälkeen on havaittavissa suhteellinen jäännösaktiivisuus yli 60 %. 24 tunnin inkuboinnin pH:ssa 7 ja 90 °C:ssa jälkeen on havaittavissa suhteellinen jäännösaktiivisuus yli 40 %. 24 tunnin inkuboinnin pH:ssa 7 ja 100 °C:ssa jälkeen on havaittavissa suhteellinen jäännösaktiivisuus yli 30 %.

35 Keksinnön mukaisen entsyymin aktiivisuuden puoliintumisikä ($T_{1/2}$) on suunnilleen 3 tuntia keitetessä (100 °C) ja 90 °C:ssa puoliintumisikä voidaan arvioida suunnilleen 24 tunniksi.

Keksinnön mukaisella entsyymillä on erinomainen pH-stabiilius hyvin laajalla pH-välillä, nimittäin alle pH 5 - suunnilleen pH 12, kun mitataan niinkin pitkän inkuboinnin kuin

8 tuntia 65 °C:ssa jälkeen. Keksinnön mukaisella entsyymillä on yli puolet sen suhteellisesta aktiivisuudesta välillä pH 5 - pH 10 65 °C:ssa 4 tuntia inkuboinnin jälkeen.

- 5 Keksinnön mukainen entsyymi kykenee hydrolysoimaan koivupuuksylaaneja sekä sahareake- (oatspelt) että lehtikuusiksiylaaneja.

Immunokemialliset ominaisuudet

- 10 Keksinnön mukaisilla ksylanaaseilla on immunokemiallisia ominaisuuksia, jotka ovat identtisiä tai osittain identtisiä (so. vähintään osittain identtisiä) kannasta ATCC 43812 tai kannasta ATCC 43813 tai kannasta DSM 4252 johdettujen ksylanaasien immunokemiallisten ominaisuuksien kanssa.

15

Immunokemialliset ominaisuudet voidaan määrittää immunologisesti ristireaktioidenttisyystesteillä. Identtisyystesti voidaan suorittaa hyvin tunnetulla Ouchterlony-kaksoisimmuunidiffuusiomenetelmällä tai peräkkäisristiöidyllä immunoelektroforeesilla Axelsen N.H.:n mukaisesti, Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques; Blackwell Scientific Publications (1983), kappaleet 5 ja 14. Termit "antigeeninen identtisyys" ja "osittainen antigeeninen identtisyys" on kuvattu samassa kirjassa, kappaleet 5, 19 ja 20.

25

Teolliset käytöt

Johtuen erinomaisesta lämpö- ja pH-stabiiliudesta tämän keksinnön mukaiset entsyymit sopivat hyvin erilaisiin teollisiin käyttöihin mukaan lukien tässä selityksessä aiemmin mainitut ksylanaasien pääkäytöt. Entsyymit sopivat erityisen hyvin lignoselluloosamassan käsittelyyn. Siten muussa kohteessaan keksintö kohdistuu ksylanaasien käyttöön lignoselluloosamassan käsittelymiseksi.

30

- 35 Lignoselluloosamassan entsymaattinen käyttö parantaa massan valkaistavuutta ja/tai vähentää tyydyttävän valkaisun saamiseen tarvittavan aktiivisen kloorin määrää.

käsittelymiseksi, kuten on kuvattu esimerkiksi kansainvälisissä patenttihakemuksissa WO 91/02839 ja WO 92/03608.

Seuraavat esimerkit valaisevat edelleen esillä olevaa keksintöä ja niiden ei ole tarkoitettu rajoittavan millään tavalla esillä olevan keksinnön piiriä.

Esimerkki 1

Seulontaesimerkki

10 Suvusta *Rhodothermus* saatavien ksylanaasien seulomiseksi voidaan suorittaa eräviljely seuraavassa kompleksiväliaineessa (alunperin Degryse et al:n kuvaamaan väliaine 162:n modifiointi) [Degryse, E., Glansdorff N., Pierard a. (1978), Arch. Microbiol. 117 189-196]:

15

Tryptone, Difco ^R	2,5
Hiivauute, Sigma ^R	2,5
Perusliuos, pH 7,2(1)	100 ml
Puskuriliuos, pH 7,2(2)	100 ml

20

Tätä väliainetta täydennettiin 2,0 % NaCl ja 0,5 % koivuksyylaania (Roth^R 7500).

(1) Koostuu (g/litrasta)

25 Nitriiloetikkahappoa (Titriplex 1)	1,0
NaOH	0,2
CaSO ₂ ·2H ₂ O	0,4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,0
Fe-sitraatti (0,01 M)	5,0 ml

30

(2) Koostuu (g/litrasta):

KH ₂ PO ₄	5,44
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	21,40

35

Kaikki komponentit steriloidtiin autoklavoimalla 121 °C:ssa 20 min. Fe-sitraatti steriloidtiin erikseen.

Väliaine voidaan tehdä kiinteäksi 2,8 % /paino/til.) agar-ia, Difco^R.

Väliaine voidaan tehdä kiinteäksi 2,8 % /paino/til.) agar-
ria, Difco^R.

Havaitseminen:

- Agar-levyillä olevien pesäkkeiden solunulkoisen ksylanaasi-
5 aktiivisuuden havaitsemiseksi kannat juovitettiin kiinteik-
si tehdyille väliainelevyille ja niitä inkuboitiin 65 °C:s-
sa yön ajan. Sitten levyjä huuhdottiin 0,05 % (paino/til)
Congo Redin vesiliuoksella 10 minuuttia. Ylimääräisen Congo
Red -liuoksen kaatamisen jälkeen jokaista levyä pestiin
10 kahdesti 1 M NaCl 10 minuuttia.

- Ksylanaasia tuottavat kannat on havaittavissa kirkkaasta
alueesta näiden pesäkkeiden ympärillä. Täten saatuja kan-
toja voidaan viljellä esimerkissä 2 kuvatun menetelmän mu-
15 kaisesti raa'an ksylanaasivalmisteen saamiseksi.

- Aktiivisuuden koivupuuksylaanisiin ja saahake (oatspelt)ksy-
laaniin havaitsemiseksi 20 mikrolitran ksylanaasinäyttei-
tä, jotka sisälsivät viljelynestettä, levitettiin halkai-
20 sijaltaan 4 mm koloihin agar-väliainelevyillä, jotka sisäl-
sivät vastaavia ksylaaneja levyjen ollessa inkuboitu yön
ajan 55 °C:ssa ja kirkastuvat alueet tehtiin näkyviksi,
kuten edellä kuvataan.

- 25 Kirkastuvat alueet havaittiin sekä koivuksylaanissa että
saahakeksylaanissa (oatspelt xylan).

Esimerkki 2

Viljelyesimerkki

- 30 Kannan DSM 4252 Rhodothermus-eräviljelystä saatavissa ole-
vien ksylanaasien alustavat tutkimukset ja karakterisointi
suoritettiin esiemrkissä 1 kuvatun koostumuksen nestemäi-
sessä kompleksiväliaineessa.

- 35 Kantoja esi-inokuloitiin 20 tuntia pyörivissä ravistuspul-
loissa glysorolikylvyssä 65 °C:ssa. 5 ml tätä viljelmää
käytettiin 50 ml:n kasvuväliainetta inokuloimiseksi 500
ml:n kavennetuissa ravistuspulloissa. 18 tuntia 65 °C:ssa
jälkeen viljelmä sentrifugoitiin (Wifug^R-sentrifugissa 6000

Näitä entsyymivalmisteita käytettiin keksinnön mukaisten ksylanaasien karakterisointiin.

Samanlaisissa eräviljelykokeista osoittautui, että solunul-
5 koinen ksylanaasiaktiivisuus indusoidaan lisäämällä ksylaa-
nia.

Esimerkki 3

Karakterisointiesimerkki

10 Ksylanolyttisen aktiivisuuden testi suoritettiin oleelli-
sesti siten kuin Bailey & Poutanen ja Khan et al. kuvanneet
[Bailey M.J, Poutanen K. (1989), Appl. Microbiol. Biotech-
nol. 30 5-10, ja Khan A.W., Tremblay D., & Leduy Anh
(1986), Enzyme Microbio. Technol. 8 373-377]

15

1,8 ml:n substraattiin, joka sisälsi 1 % (paino/til.) koi-
vuksylaania (Roth^r 75500) 25 mM natriumfosfaattipuskurissa,
pH 7,1, lisättiin esimerkin 2 mukaisesti saatua entsyymi-
valmistetta. 5 minuuttia 65 °C:ssa inkuboinnin jälkeen 3,0
20 ml 3,5-dinitrosalisyylihappoa (DNS) lisättiin ja liuosta
keitettiin 15 minuuttia.

25 Huoneenlämpötilaan jäähdyttämisen jälkeen tuotetun värin
määrä mitattiin A_{540nm}:nä.

Lämpötilasta riippuvuus

Keksinnön mukaisen entsyymin lämpöstabiiliuden tutkimiseksi
esimerkin 2 mukaisesti saatua entsyymivalmistetta inkuboi-
ttiin 80 °C:ssa, 90 °C:ssa ja 100 °C:ssa vastaavasti ja
30 näytteet otettiin erilaisina ajanjaksoina (1, 3, 5 ja 24
tuntia). Entsyymin aktiivisuus määritettiin edellä
kuvatulla menetelmällä ja tulokset on esitetty kuviossa.
10.

35 Kuten tämä kuvio osoittaa, keksinnön mukaisella ksylanaa-
silla on huomattava lämpötilastabiilius. 24 tuntia pH:ssa
7 ja 80 °C:ssa inkuboinnin jälkeen on havaittavissa suh-
teellinen jäännösaktiivisuus yli 60 %. 24 tuntia pH:ssa 7
ja 90 °C:ssa inkuboinnin jälkeen on havaittavissa suh-

teellinen jäännösaktiivisuus yli 40 %. 24 tuntia pH:ssa 7 ja 100 °C:ssa inkuboinnin jälkeen on havaittavissa suhteellinen jäännösaktiivisuus yli 30 %.

- 5 Kuviosta 1 ilmenee aktiivisuuden puoliintumisikä ($T_{1/2}$) olevan suunnilleen 3 tuntia 100 °C:ssa ja 90 °C:ssa puoliintumisikä arvioidaan suunnilleen 24 tunniksi.

- 10 Keksinnön mukaisten ksylanaasien lämpötilaoptimin tutkimiseksi entsymaattinen aktiivisuus määritettiin esimerkin 2 mukaisesti saadun entsyymivalmisteen erilaisissa lämpötiloissa (60-100 °C, pH 7) 5 minuuttia inkuboinnin jälkeen. Nämä tulokset on esitetty kuviossa 2.

- 15 Tästä kuviosta ilmenee, että keksinnön mukaisella entsyymillä on ksylanolyttinen aktiivisuus lämpötiloissa alle 60 °C - yli 100 °C. Mitään selvää lämpötilaoptimia ei havaittu mutta ilmeisesti entsyymin optimaaktiivisuus on laajalla alueella 80 - yli 100 °C, erityisemmin 85-100 °C.

20

pH-riippuvuus

- 25 Keksinnön mukaisen entsyymin pH-stabiiliuden tutkimiseksi esimerkin 2 mukaisesti saatua entsyymivalmistetta inkuboitettiin erilaisissa pH-arvoissa (5-12) 65 °C:ssa ja näytteitä otettiin erilaisina aikaväleinä (0, 4 ja 8 tuntia). Ksylanolyttinen aktiivisuus määritettiin edellä kuvatulla menetelmällä. Tulokset on esitetty kuviossa 3.

- 30 Tästä kuviosta ilmenee, että 8 tuntiin saakka inkuboinnin jälkeen entsyymillä on pH-stabiilius erittäin laajalla pH-välillä, nimittäin alle pH 5 - suunnilleen pH 11 mitattuna 60 °C:ssa.

- 35 Keksinnön mukaisten ksylanaasien pH-optimin tutkimiseksi entsymaattinen aktiivisuus määritettiin entsyymivalmisteen erilaisissa pH-arvoissa (4-11) 65 °C:ssa 5 minuuttia inkuboinnin jälkeen. Tulokset on esitetty kuviossa 4. Tässä kuviossa esitetty aktiivisuuskäyrä perustuu tuloksiin käyttäen seuraavaa neljää puskuriliuosta; sitraatti-fosfaattipusku-

ri, pH 4-7, fosfaattipuskuri, pH 6-8, tris-puskuri, pH 7-9 ja glysiini-NaOH, pH 9-11.

5 Negatiivisen häiriön DNS:n kanssa välttämiseksi eliminoimiseksi näytteet laimennettiin vedellä ennen aktiivisuuden mittaamista.

10 Kuviosta 4 ilmenee, että keksinnön mukaisella entsyymillä on ksylanolyttistä aktiivisuutta alueella alle pH 4 - yli pH 11. Kuitenkin ilmenee, että entsyymi pH-optimi on alueella 5-7, erityisemmin noin pH mitattuna 65 °C:ssa 5 minuuttia inkuboinnin jälkeen. Välillä pH 5 - pH 8 keksinnön mukaisella entsyymillä on suhteellinen ksylanolyttinen aktiivisuus yli 50 %.

15

Ksylanaasiaktiivisuuden pI

Jauhemainen ksylanaasivalmiste tehtiin lyofilisoimalla esi-
merkin 2 mukaisesti saatu raaka viljelyliemi.

20 Ksylanaasiaktiivisuuden pI määritettiin käyttäen LKB-amfo-
liini-PAG-levyjä pH 3,5-9,5 ja lyofilisoidusta jauhemaises-
ta ksylanaasivalmisteesta tehtiin liuos. Elektroforeesin
jälkeen geeliä pestiin kahdesti 15 minuuttia, kerran ve-
dessä, kerran tris-puskurissa pH 9, ja se päällystettiin
25 havainnointiagarin ohuella päällysteellä, joka sisälsi 0,5
% koivuksylaania (Roth^R 7500), 1 % agarosia, pH 9. Pää-
lystettyä geeliä inkuboitiin yön ajan 50 °C:ssa. Ksylanaa-
siaktiivisuus tehtiin näkyväksi käyttäen Congo Red -vär-
jäystä (värjääminen 10 minuuttia 0,1 % Congo Redillä ja
30 värjäyksen poisto 2 x 15 minuuttia 1 M NaCl:ssa).

Voitiin havaita vähintään 2 komponenttia, joissa on ksyla-
nolyttistä aktiivisuutta alueella 3-7.

Patenttivaatimukset 19

1. Ksylanaasi, t u n n e t t u siitä, että sillä on seuraavat ominaisuudet:

- (a) optimaalinen aktiivisuus lämpötiloissa 80-100 °C,
- 5 (b) suhteellinen aktiivisuus yli 50 % alueella pH 5 - pH 8 5 minuuttia 65 °C:ssa inkuboinnin jälkeen,
- (c) suhteellinen lämpötilastabiilius 80 °C:ssa yli 80 % pH:ssa 7 3 tuntia inkuboinnin jälkeen,
- (d) kykenevä hydrolysoimaan koivupuuksylaaneja, ja
- 10 (e) immunokemialliset ominaisuudet ovat identtiset tai osittain identtiset kannasta ATCC 43812 tai kannasta ATCC 43813 tai kannasta DSM 4252 johdetun ksylanaasin immunokemiallisten ominaisuuksien kanssa.

15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen ksylanaasi, t u n n e t t u siitä, että ksylanaasi on saatavissa kannasta, joka kuuluu sukuun Rhodotermus.

20 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen ksylanaasi, t u n n e t t u siitä, että se on saatavissa Rhodotermus marinus -kannasta.

25 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen ksylanaasi, t u n n e t t u siitä, että se on saatavissa kannasta ATCC 42812 tai kannasta ATCC 43813 tai kannasta DSM 4252 tai niiden mutantista tai variantista.

30 5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen ksylanaasi, t u n n e t t u siitä, että sillä on:
(a) pH-optimi alueella pH 5 - pH 7, ja pI alueella 3-7.

35 6. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksista 1-5 mukaisen ksylanaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää sukuun Rhodothermus kuuluvan ksylanaasia tuottavan kannan viljelemisen sopivassa ravintoväliaineessa, joka sisältää hiili- ja typpilähteen ja ei-orgaanisia suoloja, mitä seuraa halutun entsyymin talteenottaminen.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljellään Rhodothermus marinus -kantaa, edullisesti kantaa ATCC 43812 tai kantaa ATCC 43813 tai kantaa DSM 4252 tai niiden mutanttia tai varianttia.

8. Menetelmä lignoselluloosamassan käsittelymiseksi, t u n n e t t u siitä, että lignoselluloosamassa käsitellään jonkin patenttivaatimuksista 1-5 mukaisella entsyymillä.

15

1/4

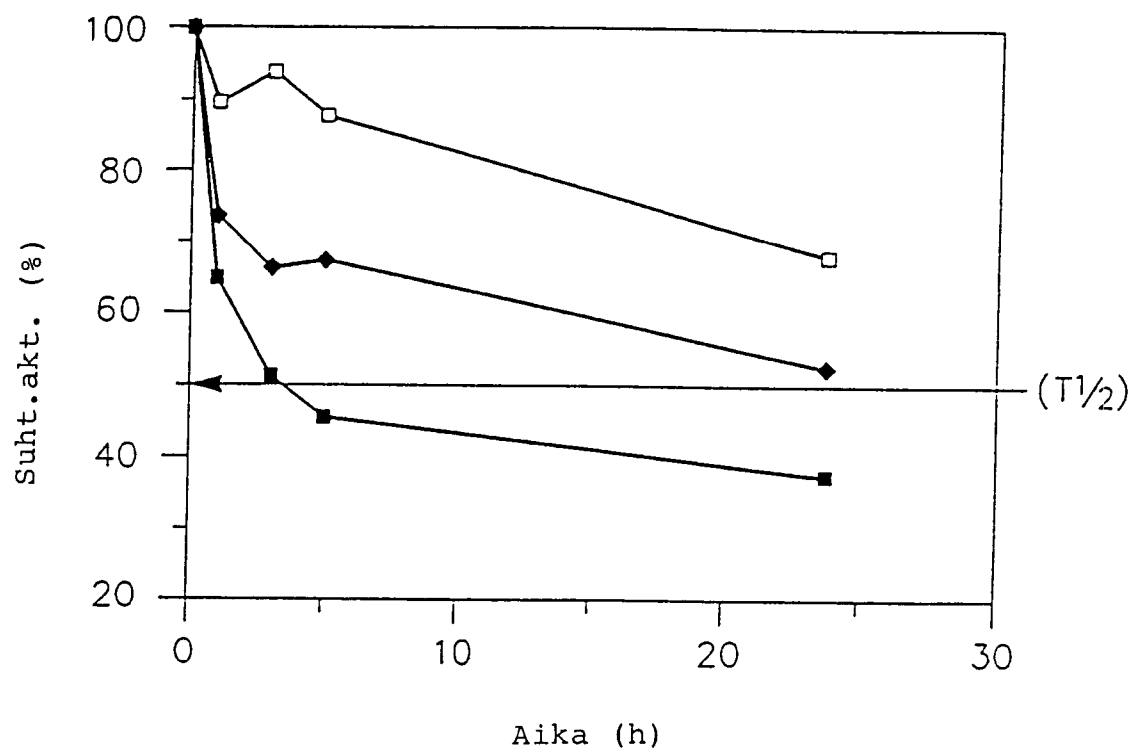


Fig. 1

2/4

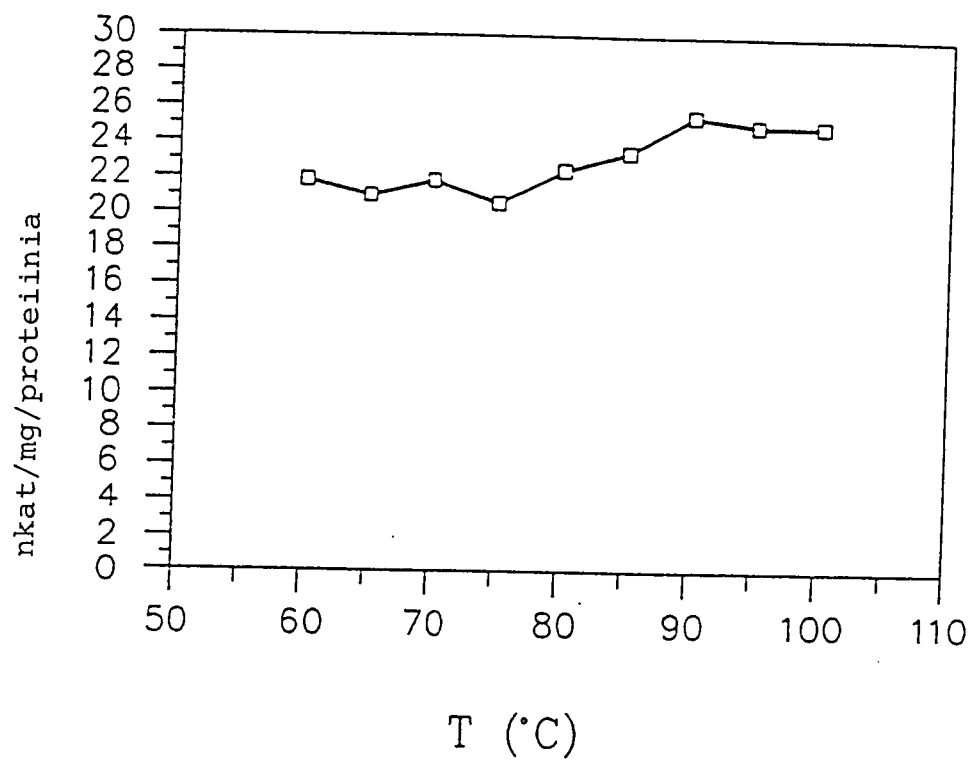


Fig. 2

3/4

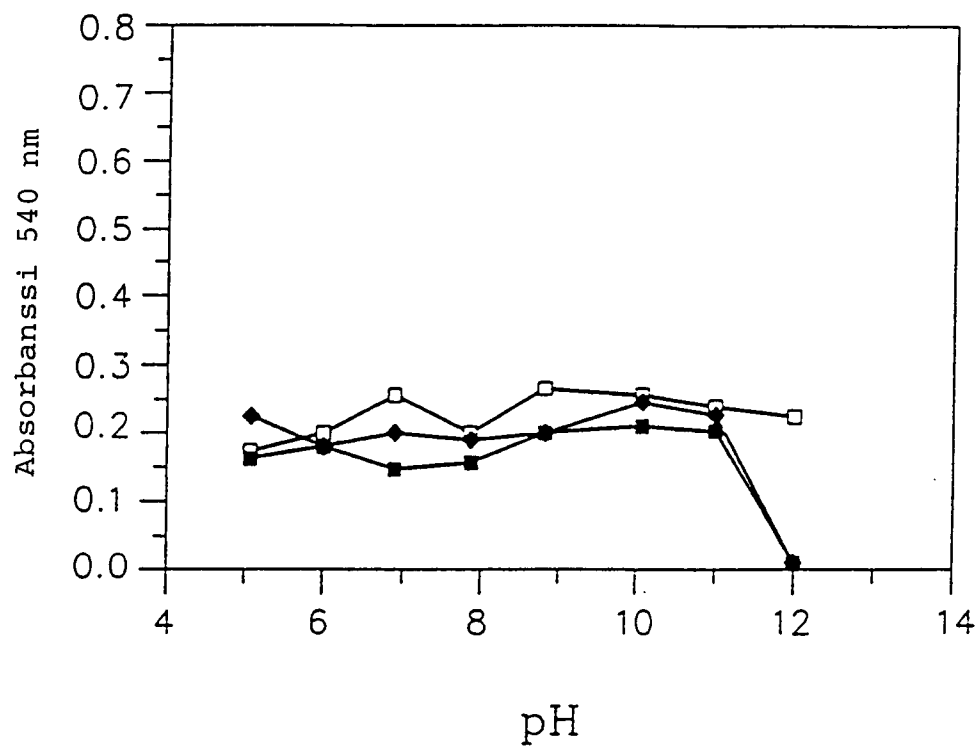


Fig. 3

4/4

Absorbanssi 540 nm

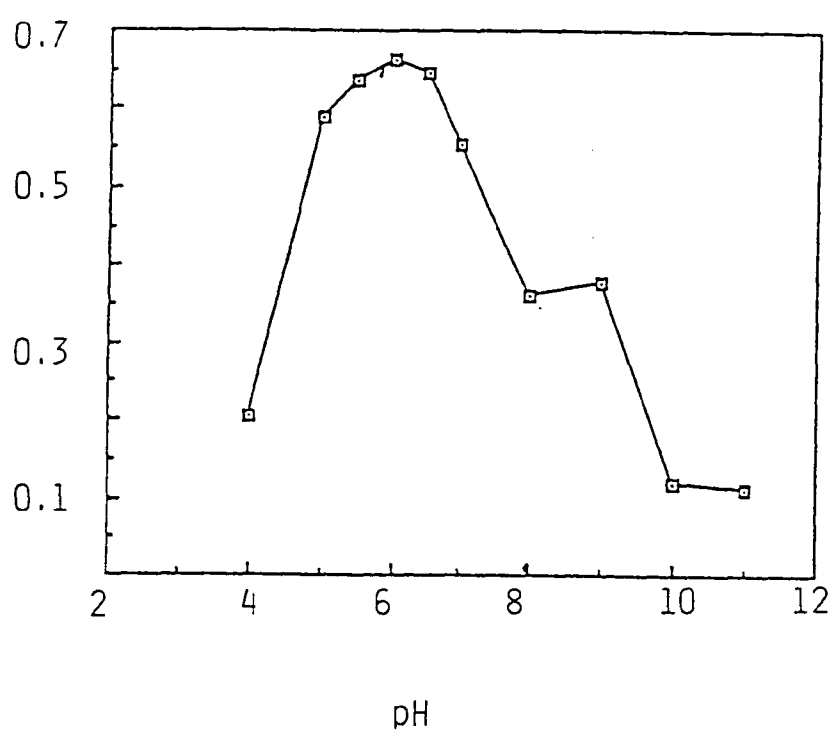


Fig. 4